

УДК 544.018.2

Новые нанобиокомпозитные материалы для биоэлектронных устройств

Д. В. Панкратов^{1,2,3}, Е. Гонзалез-Аррибас³, Ю. М. Парунова¹, М. А. Горбачева^{1,2},
Ю. С. Зейфман¹, С. В. Кузнецов⁴, А. В. Липкин¹, С. В. Шлеев^{1,2,3*}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

³Департамент биомедицинских исследований, Университет г. Мальмё, 20506, Мальмё, Швеция

⁴Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14

*E-mail: shleev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 12.11.2014

РЕФЕРАТ Разработаны и изготовлены нанобиокомпозитные материалы на основе графена, поли(3,4-этилендиокситиофена) и глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности наноматериалов различной природы (наночастицы золота и многостенные углеродные нанотрубки) и размера (нанотрубки различного диаметра). Сравнительное изучение возможного влияния природы наноматериала на биоэлектродокаталитические характеристики глюкозооксилирующих биоанодов в нейтральном фосфатном буферном растворе показало, что плотности биоэлектродокаталитических токов биоэлектродов на основе нанокомпозитов слабо зависят от размера наноматериала и в большей мере определяются его природой. Полученные нанобиокомпозиты являются перспективными материалами для новых биоэлектронных устройств из-за возможности легко варьировать емкостные и биоэлектродокаталитические характеристики, что позволяет использовать их для изготовления электродов с двойной функцией, а именно для одновременной генерации и накопления электрической мощности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глюкозооксидаза, графен, нанобиокомпозит, электропроводящий органический полимер, электрод с двойной функцией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ACN – ацетонитрил; GE – желатин; EDOT – 3,4-этилендиокситиофен; PEDOT – поли(3,4-этилендиокситиофен); PEG – полиэтиленгликоль; GA – глутаровый альдегид; TTF – тетратиафульвален; TCNQ – 7,7,8,8-тетрацианохинодиметан; THF – тетрагидрофуран; GOx – глюкозооксидаза; AuNP – наночастицы золота; GR – графен; CNT – углеродные нанотрубки; SCE – насыщенный каломельный электрод; SEM – сканирующая электронная микроскопия; Au – золотой электрод; CTC – комплекс с переносом заряда; PB – фосфатный буферный раствор; j – плотность биокаталитического тока; CV – циклическая вольтамперограмма.

ВВЕДЕНИЕ

Нанобиокомпозитные материалы находят все большее применение в различных областях науки и техники, в том числе и в новых биомедицинских технологиях [1]. Современные биоэлектронные устройства (биосенсоры, биотопливные элементы, биобатареи и т.п.), созданные на основе нанокомпозитных материалов, могут быть использованы для непрерывного мониторинга состояния организма, направленного воздействия на органы и ткани, а также для точечной доставки лекарственных препаратов. Сравнительные исследования особенностей функционирования на-

нобиокомпозитов в буферных растворах и сложных физиологических жидкостях человека служат основой для создания высокоэффективной и стабильной биоэлектроники для биомедицинского использования. В представленной работе созданы и изучены в условиях, близких к физиологическим, новые нанобиокомпозитные материалы на основе графена, поли(3,4-этилендиокситиофена) и глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности наноматериалов различной природы (наночастицы золота и многостенные углеродные нанотрубки) и размера (углеродные нанотрубки различного диаметра).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , LiClO_4 , цитрат натрия, ацетонитрил ($\geq 99.9\%$, ACN), толуол ($\geq 99.8\%$), желатин (GE), *D*-глюкоза, 3,4-этилендиокситиофен (EDOT), полиэтиленгликоль (PEG), 25% раствор глутарового альдегида (GA), тетратиафульвален (TTF), 7,7,8,8-тетрацианохинодиметан (TCNQ), тетрагидрофуран (THF), а также глюкозооксидаза (GOx) из *Aspergillus niger* получены из Sigma-Aldrich (США) и использовались без дополнительной очистки. Этанол (95%) и аргон куплены в компании Kemetyl AB (Швеция) и AGA Gas AB (Швеция) соответственно. Все растворы готовили на деионизированной воде (18 МОм · см), полученной с использованием системы PURELAB UHQ II из ELGA Labwater (Великобритания).

Для синтеза нанобиокомпозитов использовали наночастицы золота (AuNP) диаметром 20 нм и углеродные наноматериалы трех типов: графен (GR, толщина – 1.6 нм, менее трех углеродных слоев) и два типа многостенных углеродных нанотрубок (CNT): CNT₁ (внешний диаметр – 10–15 нм, внутренний диаметр – 2–6 нм, длина – 0.1–10 мкм) и CNT₂ (внешний диаметр – 20–30 нм, внутренний диаметр – 1–2 нм, длина – 0.5–2 мкм). GR был куплен в компании Graphene Supermarket (США), CNT – в Sigma-Aldrich. AuNP синтезированы с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя по методике, описанной в работе [2]. Раствор HAuCl_4 (50 мл, 250 мкМ) нагревали до кипения при постоянном перемешивании, затем добавляли 750 мкл водного раствора с массовой долей цитрата натрия 1%. После добавления цитрата натрия смесь выдерживали в течение 10 мин без нагревания при постоянном перемешивании. Полученную суспензию AuNP охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в 50 раз центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин [3], при этом 98% супернатанта удалялось, концентрат AuNP объединяли и ресуспензировали ультразвуковой обработкой.

Электрохимические измерения осуществляли при помощи потенциостата/гальваностата $\mu\text{Autolab Type III/FRA2}$ от Metrohm Autolab B.V. (Нидерланды) с использованием трехэлектродной схемы с насыщенным каломельным электродом сравнения (SCE, 242 мВ относительно нормального водородного электрода) и платиновой проволокой в качестве вспомогательного электрода. Все значения потенциалов, представленные в работе, даны относительно SCE, если об этом не упомянуто специально.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ванны Ultrasonic Cleaner XB2 от VWR

International Ltd. (Великобритания). Сканирующую электронную микроскопию (SEM) проводили на микроскопе высокого разрешения EVO LS 10 от Zeiss (Германия).

Изготовление электродов на основе нанобиокомпозитных материалов

Поликристаллические золотые дисковые электроды (Au) от компании Bioanalytical Systems (США) с геометрической площадью поверхности 0.031 см² механически очищали полировкой на бумаге Microcloth (Buehler, Великобритания) в суспензии оксида алюминия с размером частиц 0.1 мкм, купленной в Struers (Дания). Далее электроды промывали деионизированной водой и подвергали ультразвуковой обработке в этаноле в течение 5 мин для удаления остаточных частиц оксида алюминия, а затем электрохимически очищали циклированием в 0.5 М H_2SO_4 в диапазоне потенциалов от –0.2 до +1.7 В в течение 20 циклов со скоростью развертки потенциала 0.1 В/с, промывали водой и высушивали в потоке воздуха.

Далее на поверхности Au синтезировали нанокompозит поли(3,4-этилендиокситиофен)/графен (PEDOT/GR) потенциодинамическим циклированием в диапазоне от 200 до 1300 мВ (1 цикл при скорости развертки потенциала 100 мВ/с) в 0.1 М фосфатном буферном растворе (PB, pH 7.4), содержащем 20 мМ EDOT, 1 мМ PEG, 0.1 М LiClO_4 и GR в массовом соотношении с EDOT 1 : 5 [4]. До проведения электрополимеризации смесь подвергали обработке ультразвуком в течение 1 ч для получения устойчивой суспензии, после чего в течение 20 мин продували аргоном для удаления кислорода. Как видно из рис. 1А, полученный слой PEDOT/GR отличается достаточной однородностью с незначительными дефектами, заполненными полимером.

Затем на поверхности композитного материала PEDOT/GR синтезировали комплекс с переносом заряда (СТС) TCNQ/TTF – известный медиатор для обеспечения контакта между электродом и иммобилизованной GOx (см. ниже) [4]. TCNQ и TTF растворяли в THF и ACN соответственно для получения концентрации растворов 1.2 мг/мл. Растворы TCNQ (1 мкл) и TTF (2 мкл) смешивались на поверхности композита PEDOT/GR, избыток непрореагировавшего TTF смывали ACN по окончании процесса кристаллизации СТС. Полученные кристаллы СТС имеют характерную игольчатую форму, что согласуется с данными [5], однако достаточно неравномерно распределены по поверхности электрода, формируя островки, соответствующие центрам кристаллизации (рис. 1Б).

На поверхность комплекса TCNQ/TTF наносили 2 мкл суспензии наноматериала, CNT или AuNP.

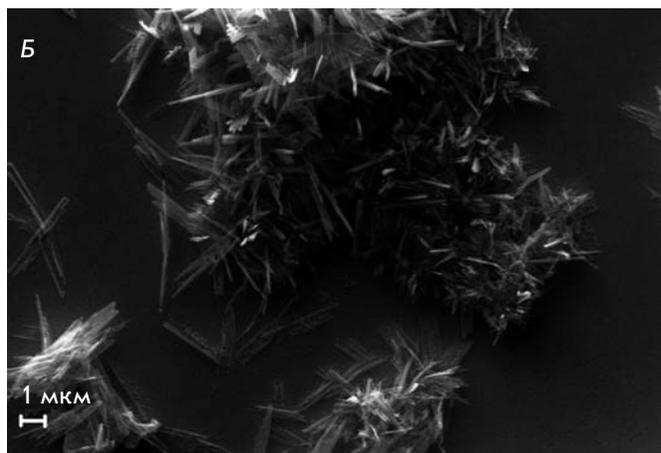
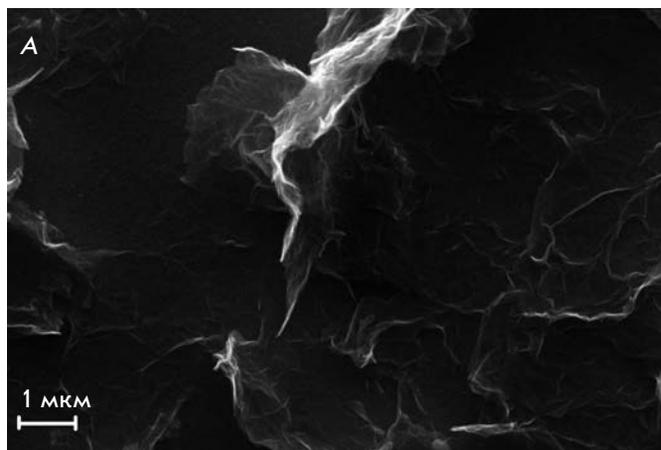


Рис. 1. SEM-изображения поверхности электрода Au|PEDOT/GR (А) и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF (Б)

Для получения устойчивой суспензии 1 мг CNT смешивали с 1 мл толуола, концентрат AuNP разводили деионизированной водой в 10 раз; полученные смеси подвергали ультразвуковой обработке в течение 20 мин.

Для биомодификации полученных наноконкомпозитов PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT и PEDOT/GR|TCNQ/TTF|AuNP 2 мкл раствора GOx (10 мг/мл в РВ) наносили на поверхность электрода и выдерживали при +4°C в течение 1 ч. Для оценки влияния наноматериала на биокаталитические свойства электрода был изготовлен биокомпозит PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx, в котором фермент был иммобилизован непосредственно на поверхности СТС. SEM-изображение поверхности нанобиоконкомпозита PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx представлено на рис. 2. Следует отметить развитую поверхность и достаточную однородность слоя CNT₁/GOx, равномерно покрывающего СТС.

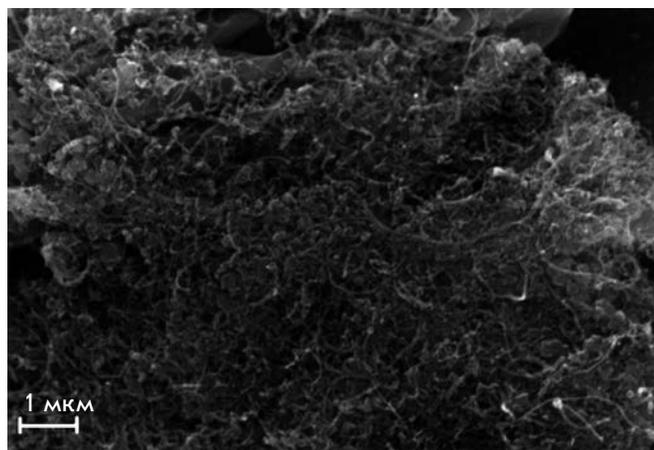


Рис. 2. SEM-изображение поверхности электрода Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx

Для стабилизации полученной структуры на поверхность электродов наносили 2 мл раствора желатина в воде (2.5 масс. %) с последующим высушиванием в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого электроды погружали в водный раствор GA (5 масс. %) на 60 с и промывали водой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биокаталитические свойства разработанных электродов изучали в 0.1 М РВ в интервале потенциалов от -0.2 до 0.2 В относительно SCE при скорости развертки 10 мВ/с. Циклические вольтамперограммы (CV) биоанодов различной структуры представлены на рис. 3.

Емкость полученных электродов не зависит от присутствия наноконкомпозита и находится в диапазоне 1.5–2.5 мФ/см² для всех типов структур. Следует отметить легкость изменения емкости нанобиоконкомпозитов как на этапе синтеза PEDOT/GR (количество циклов электрополимеризации), так и на этапе создания нанобиоконкомпозита. Данное свойство позволяет использовать разработанные материалы для создания и оптимизации гибридных биоэлектродов с двойной функцией – генерации и накопления электрической мощности [6].

Как видно из представленных данных, выраженный биоэлектродокаталитический отклик с начальным потенциалом электроокисления глюкозы около 0 В, возрастающий с повышением концентрации глюкозы до 50 мМ, был зафиксирован для всех использованных электродов в РВ, содержащем глюкозу, что согласуется с опубликованными для системы СТС/GOx данными [7].

Плотность биокаталитического тока (*j*) для электродов Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx|GE оказалась

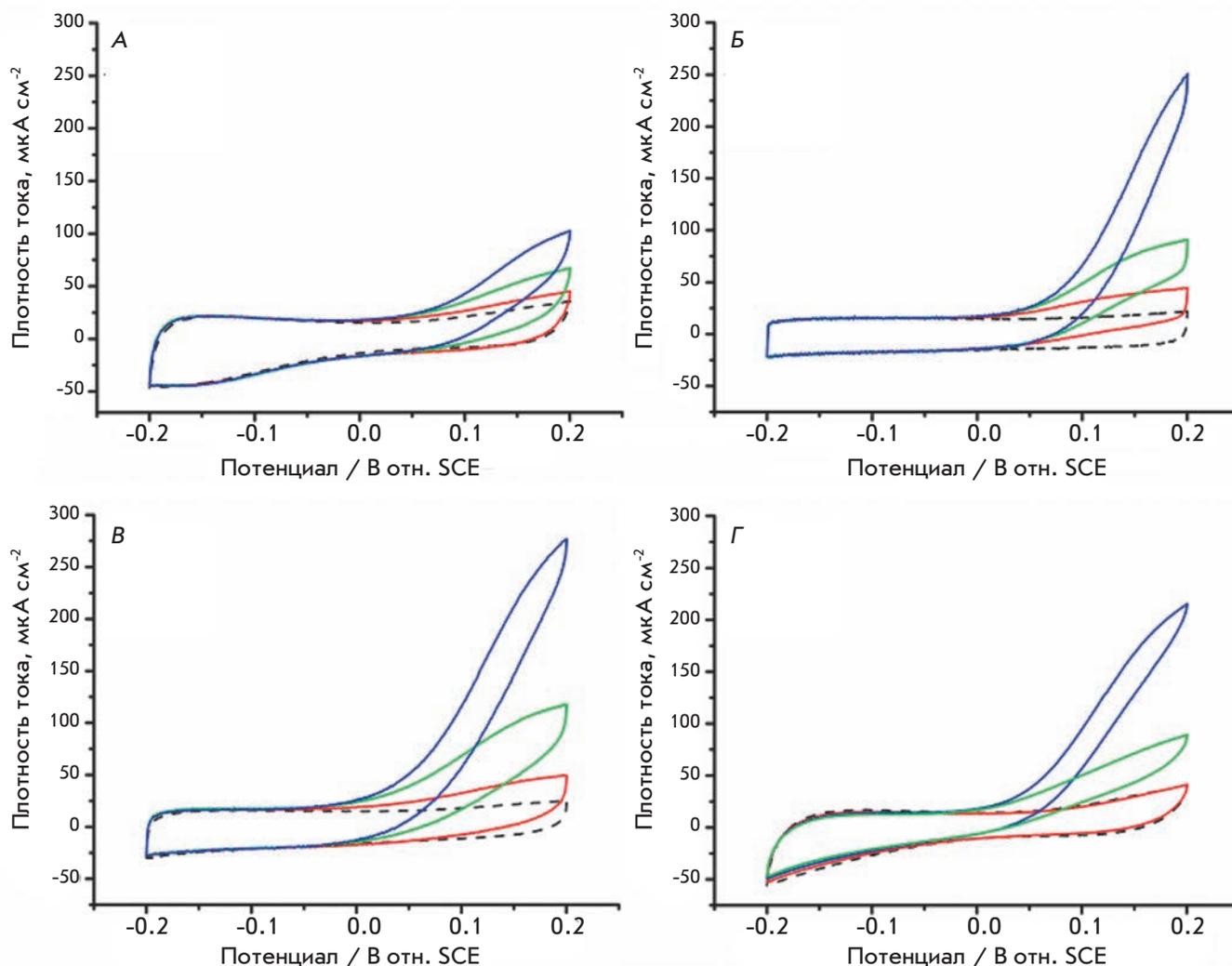


Рис. 3. CV биоанодов Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|GOx|GE (А) и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|Наноматериал|GOx|GE (Б–Г) в РВ (пунктирная кривая) и РВ, содержащем глюкозу различной концентрации (сплошные кривые), ммоль/л: 0.05 (красная кривая), 5 (зеленая кривая) и 50 (синяя кривая). Наноматериал: CNT₁ (Б), CNT₂ (В), AuNP (Г)

минимальной (67 ± 4 мкА/см² при концентрации глюкозы 50 мМ и потенциале 0.2 В) по сравнению с образцами, содержащими наноматериал, что может быть связано с неравномерностью распределения СТС на поверхности электрода (рис. 1Б). При адсорбции фермента на поверхности СТС медиаторный электронный перенос блокируется для молекул GOx, адсорбированных на нанокompозите PEDOT/GR, в связи с чем снижается доля биоэлектрохимически активного фермента.

В случае электродов типа Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|Наноматериал|GOx|GE полученная величина j составила 229 ± 13 и 251 ± 15 мкА/см² при использовании в качестве наноматериала CNT₁ и CNT₂ соответственно и 175 ± 8 мкА/см² при использовании

AuNP в условиях, аналогичных условиям для биоанодов, не содержащих наноматериал. Величина j при использовании в качестве наноматериала CNT₂ примерно на 10% выше j для электродов, основанных на CNT₁, что соответствует разнице в емкости Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₁/GOx|GE и Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT₂/GOx|GE (1.63 ± 0.05 и 1.85 ± 0.05 мФ/см² соответственно). Можно предположить, что увеличение j при использовании CNT₂ связано с большей удельной площадью поверхности, а не с лучшими условиями иммобилизации фермента. Это согласуется с данными, полученными ранее для билирубиноксидазы, адсорбированной на поверхности, модифицированной AuNP различного диаметра, превышающего размер фермента [8].

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований созданы многокомпонентные нанобиоконпозиты с возможностью контролируемой регуляции их емкостных и биоэлектрокаталитических параметров. Полученные материалы могут быть использованы для создания современных биоэлектронных

устройств, функционирующих в условиях, близких к физиологическим. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-14-00530).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanocomposites /Ed. C. S. S. R. Kumar. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. V. 8. 466 p.
2. Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. // Anal. Chem. 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221.
3. Wang X.J., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S. // Biosensors Bioelectronics. 2012. V. 31. № 1. P. 219–225.
4. Xiao X.X., Wang M.E., Li H., Si P.C. // Talanta. 2013. № 116. P. 1054–1059.
5. Sugimoto T., Tanaka H., de Caro D., Valade L. // Materials. 2010. V. 3. № 3. P. 1640–1673.
6. Pankratov D., Blum Z., Suyatin D.B., Popov V.O., Shleev S. // ChemElectroChem. 2014. V. 1. № 2. P. 343–346.
7. Khan G.F., Ohwa M., Wernet W. // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 17. P. 2939–2945.
8. Pankratov D.V., Zeifman Y.S., Dudareva A.V., Pankratova G.K., Khlopova M.E., Parunova Y.M., Zajtsev D.N., Bashirova N.F., Popov V.O., Shleev S.V. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 1. P. 102–106.