

УДК 541.138 (661.666:577.17)

**ГРАФИТОВЫЕ ГРИФЕЛИ И КОРОНЕН КАК НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ****О.Н. Понаморева<sup>1</sup>, С.В. Алферов<sup>1</sup>, А.В. Абдуллатыпов<sup>2</sup>, Т.П. Дьячкова<sup>3</sup>, Л.И. Трубицина<sup>4</sup>,  
В.А. Алферов<sup>1</sup>**<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Тульский государственный университет», Тула, Россия<sup>2</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцзино, Россия<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет», Тамбов, Россия<sup>4</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцзино, Россия**Введение**

Электрохимические биосенсоры на основе ферментов класса оксидоредуктаз нашли широкое применение в различных областях жизнедеятельности человека. Лакказы – типичные медьсодержащие оксидоредуктазы, катализирующие окисление целого ряда фенолов и других ароматических соединений, с использованием молекулярного кислорода. Продуктом восстановления кислорода является вода. В одном из последних обзоров суммирована информация об использовании лакказ и других типичных медьсодержащих оксидаз в биоэлектрохимии [1], в котором, в частности, обсуждаются материалы электродов и их модификация для эффективного взаимодействия с лакказам. В нашей работе именно лакказы использовались для изучения процессов биоэлектрокатализа.

Материал электрода имеет первостепенное значение для электрохимического устройства. Большинство электродных материалов, используемых в биоэлектрохимии, являются углеродными материалами. Их применение связано не только с превосходными физическими и химическими свойствами, такими как электропроводность, теплопроводность, химическая стабильность и низкая плотность, но и с широкой доступностью [2]. Электроды с трафаретной печатью (печатные электроды, ПЭ) часто используются для разработки электрохимических биосенсоров. Большинство ПЭ являются одноразовыми, поскольку их поверхность не может быть легко обновлена [4]. Электроды на основе графитовых стержней (ГГЭ) привлекают повышенное внимание исследователей в последнее время из-за их широкой доступности при низкой стоимости, простоты использования, химической инертности, низкого фонового тока, работы в широком диапазоне потенциалов, низкой токсичности, лёгкой утилизации, адсорбции электрохимических веществ на поверхности и простоты модификации [3]. ГГЭ как правило состоят из графита и глины. Большее содержание графита делает стержень мягче (В, от английского «blackness» – чернота), а большее содержание глины делает его тверже (Н, от английского «hardness» – твердость). Кажется очевидным, что высокое содержание графита в стержне делает его наиболее удачным выбором в качестве рабочего электрода из-за высокой электропроводимости. Это утверждение верно лишь для некоторых случаев, выбор же подходящей твёрдости в основном зависит от специфического взаимодействия между анализируемым веществом и системой графит/глина.

Для биоэлектрохимических целей поверхность углеродных электродов химически модифицируют: окислением поверхности сильными кислотами [5]; углеродными нанотрубками (УНТ) и другими углеродными наноматериалами (графеном, оксидом графена) [3]; а в случае лакказных электродов – различными полиароматическими углеводородами (ПАУ) и их производными для направленной ориентации лакказ у поверхности электрода [1]. В зависимости от расположения атомов по окружности УНТ изменяется их электронная структура, которая варьируется от металлической до полупроводниковой, поэтому УНТ в настоящее время занимают ведущее место при разработке электрохимических устройств. Помимо уникальной электронной структуры, возникающей в результате трубчатого расположения атомов, нанометровое расстояние, присущее УНТ, также позволяет образовывать интересный класс соединений, состоящих из УНТ и инкапсулированных в них молекул. Электронные структуры этих гибридных систем не являются простой суммой составляющих. Во внутреннее пространство УНТ инкапсулируют молекулы ПАУ, среди которых особое место занимает коронен. Коронен – ПАУ, состоящий из семи конденсированных ароматических колец и имеющий D<sub>6h</sub>-симметрию, можно рассматривать как элементарный фрагмент графена.

Теоретические расчеты взаимодействия коронена с одностенными УНТ показали, что он может встраиваться в них упорядоченным образом, что способствует резкому увеличению проводимости гибридного материала [6]. Нами было высказано предположение, что коронен способен одновременно взаимодействовать с УНТ и ориентировать молекулы лакказы к электроду; благодаря своей полиароматической структуре. Следует отметить, что нам удалось найти лишь единичные публикации об экспериментальных исследованиях по взаимодействию коронена с углеродными наноматериалами. В работе [9] сообщается о простом электрохимическом подходе для превращения электронеактивного коронена в высоко активное редокс-соединение ( $E = +0,235\text{В}/+0,005\text{В}$  относительно  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) после адсорбции на углеродном наноматериале со структурой графита и экспозиции электрода при приложенном потенциале  $+1,2\text{В}$  (относительно хлорсеребряного электрода). Исследования электрохимической реакции коронена на различных углеродных наноматериалах, таких как многослойный углерод, однослойный углерод, графит, оксид графена и углеродное нановолокно, показали, что графитовая структура (при отсутствии кислородсодержащих функциональных групп) и  $\pi$ - $\pi$  – связи являются ключевыми факторами успеха такого превращения. Совсем недавно в продолжении этих исследований коронен был иммобилизован посредством  $\pi$ -укладки на электродах из УНТ и подвергся электроокислению в водных растворах с образованием соответствующего хинона, который участвовал в опосредованном переносе электронов на электрод от ФАД-зависимой глюкозодегидрогеназы при каталитическом окислении глюкозы [10]. При постановке задач этого исследования нами было выдвинуто предположение, что печатные электроды и грифели, модифицированные помимо нанотрубок короненом, окажутся самыми электроактивными системами.

Целью работы является электрохимическое обоснование разработки лакказных электродов на основе углеродных материалов, в том числе углеродных нанотрубок и коронена, для дальнейшего использования в биоэлектрохимических системах (биосенсорах и биотопливных элементах).

#### **Влияние модификации поверхности графитовых электродов углеродными нанотрубками.**

Исследования проводили в трехэлектродных электрохимических системах. Одна система включала в себя рабочий электрод в виде графитового грифеля (изготовитель Bruno Visconti Graphix, твердость НВ, диаметр 2,0 мм) (далее грифель), хлорсеребряный электрод сравнения и стандартный платиновый электрод (ЭПВ-1 СР). Вторая система – электрод с трафаретной печатью или так называемый печатный электрод (Русенс, Россия). Он представлял из себя единое устройство, в котором используются три разных электрода: рабочий графитовый электрод, хлоридсеребряный электрод сравнения и вспомогательный электрод. В качестве рабочей части грифеля использовали торец, боковую поверхность изолировали лаковым покрытием. Геометрическая площадь рабочего углеродного электрода у ПЭ в четыре раза больше площади грифельного электрода ( $0,12\text{ см}^2$  против  $0,03\text{ см}^2$ ). Для модификации поверхности рабочих электродов использовали окисленные многостенные углеродные нанотрубки серии «Таунит-М» (ООО «НаноТехЦентр») и 0,5 % раствор коронена в толуоле (Sigma-Aldrich). Содержание функциональных групп в окисленных УНТ по данным титриметрии составило (ммоль/г): фенольных – 0,7; лактонных – 0,6; карбоксильных – 0,4. Подготовку УНТ и модификацию поверхности электродов проводили, как описано в работе [7].

Электрохимические свойства электродов изучали методом циклической вольтамперометрии-на-гальванопотенциостате IPC-micro (ООО «Вольта») в электролитической ячейке, заполненной Na-ацетатным буферным раствором ( $\text{pH} = 5,0$ ) при постоянном перемешивании (среда, насыщенная кислородом) и при пропускании аргона (среда аргона). Электрокаталитические процессы на углеродных электродах изучали в присутствии редокс-соединения – метиленового синего (МС) (Sigma-Aldrich) в концентрации 0,001 М. Биоэлектрокаталитические процессы изучали после иммобилизации лакказы *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 (1300), лакказы, полученной путем сайт-направленного мутагенза *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 (1300Т) и лакказы *Catenuloplanes japonicus* ВКМ Ac-875 (875)) на поверхности модифицированных и немодифицированных электродов. Для адсорбции лакказы модифицированные электроды инкубировали в течение 24 ч при  $4^\circ\text{C}$  в растворе фермента. После инкубации электроды промывали буфером.

Влияние модифицирующих агентов на электрохимические свойства углеродных электродов выявляли методом циклической вольтамперометрии. На ПЭ модификация рабочего углеродного электрода путем адсорбции УНТ приводит к значительному увеличению фарадеевских токов во всем диапазоне потенциалов: максимальные токи окисления и восстановления  $+92\text{ мкА}$  (при  $E +1,2\text{ В}$ ) и  $10\text{ мкА}$  (при потенциале  $+0,4\text{ В}$ ), соответственно.

Адсорбция коронена уменьшает электрохимическую активность углеродных электродов. Аналогичные результаты получены и для модифицированных ГГЭ (табл. 1). Наилучшие электрохимические свойства проявляют электроды, модифицированные УНТ. Модификация короненом снижает эффективность электрокатализа. Этот результат противоречил ожиданиям. Для объяснения наблюдаемого явления предположили, что коронен встраивается между внутренними и наружными стенками нанотрубок и выступает в роли диэлектрика, приводя к увеличению омического сопротивления системы (рис. 1).

Таблица 1. Токи окисления и восстановления электродов (ГГЭ – электрод на основе графитового стрежня; ПЭ – печатный электрод)

| Система             | Ток окисления, мкА | Ток восстановления, мкА |
|---------------------|--------------------|-------------------------|
| ГГЭ                 | 13                 | 30                      |
| ГГЭ + коронен       | 19                 | 40                      |
| <b>ГГЭ + УНТ</b>    | <b>19</b>          | <b>77</b>               |
| ГГЭ + УНТ + коронен | 17                 | 44                      |
| ПЭ                  | 0,50               | 0,07                    |
| ПЭ + коронен        | 0,05               | 0,01                    |
| <b>ПЭ + УНТ</b>     | <b>92</b>          | <b>10,00</b>            |
| ПЭ + УНТ + коронен  | 5,62               | 2,29                    |

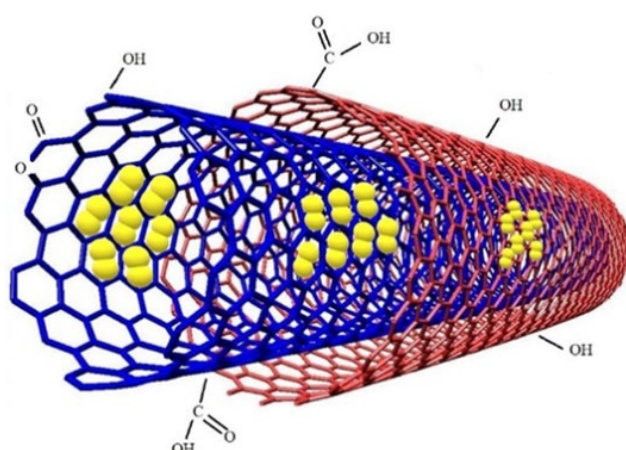


Рисунок 1. Предполагаемая схема взаимодействия коронена (жёлтые сферы) с МУНТ-ок: интеркаляция молекул коронена между внутренней и наружной стенками, адсорбция с внутренней и внешней стороны нанотрубок.

Следует отметить, что на вольтамперных зависимостях углеродных электродов, модифицированных одновременно УНТ и короненом, наблюдается пик окисления при потенциале +0,050 В (данные не показаны). В работе [9] продемонстрировано, что экспозиция коронена, первоначально электрохимически неактивного ПАУ, на поверхности определенных графитовых материалов при потенциале +1,2 В приводит к появлению новых анодных и катодных пиков, обусловленных, как считают авторы, обратимым окислением коронена. В присутствии редокс-соединения МС, который относится к классу фенотиазиновых красителей с окислительно-восстановительным потенциалом +0,011 В (при pH = 7, температуре 30 °С) (рис. 2А), способного к электрокаталитической полимеризации с образованием электроактивного полимера, наблюдали рост

пиковых анодного и катодного токов, как при использовании планарных электродов (рис. 2Б), так и при использовании ГГЭ (рис. 2В). В системах на основе планарных электродов отчетливо наблюдается расщепление анодного пика (рис. 2Б), которое отсутствует на ГГЭ. Расщепление анодного пика обусловлено одновременным окислением лейкоформы МС и его электрополимеризацией. В тоже время, на вольтамперных зависимостях, полученных с помощью ГГЭ, не происходит расщепления анодного пика, вольтамперограмма имеет классический для МС вид.

Возможности прямого переноса электронов у бактериальных двухдоменных лакказ определяли методами вольтамперометрии и амперометрии. Последний – основан на регистрации тока восстановления кислорода при участии лакказ при потенциале, близком к потенциалу Т1-центра фермента. Рабочий потенциал при измерении биокатодов с лакказой лежит в пределах от 0 до +0,4 В. Для определения прямого переноса электронов (ППЭ) в этих системах проводят измерения в анаэробном буфере, в который затем пропускают кислород. Увеличение тока восстановления указывает на наличие удачно ориентированных лакказ [11].

На амперограммах лакказных электродов на основе ГТЭ и УНТ-10 (в зависимости от конкретной бактериальной лакказы) при постоянном потенциале +170 мВ (1300Т) (рис. 3), +170 мВ (1300, +100 мВ (875) наблюдается уменьшение абсолютных значений тока (значение тока приближается к 0) (рис. 3а). При поступлении кислорода в ячейку увеличивается ток восстановления кислорода на лакказном электроде (рис. 3б).

Важно отметить, что адсорбированные на электроде лакказы практически не теряли своей активности при хранении в течении нескольких суток.

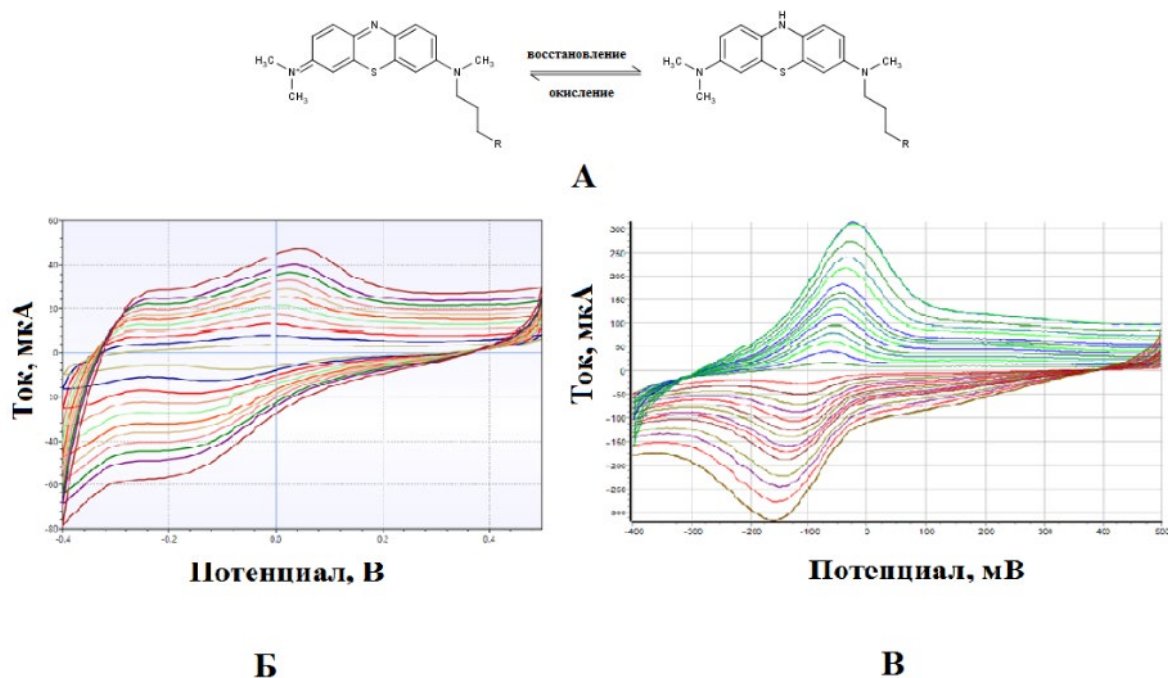


Рисунок 2. Вверху: окислительно-восстановительные полуреакции МС (А). Внизу: вольтамперные зависимости графитовых электродов, модифицированных УНТ, в присутствии МС (0,001М) при скоростях развёртки 10–120 мВ/с (шаг 10 мВ/с) – печатный электрод (Б); графитовый грифельный электрод (В).

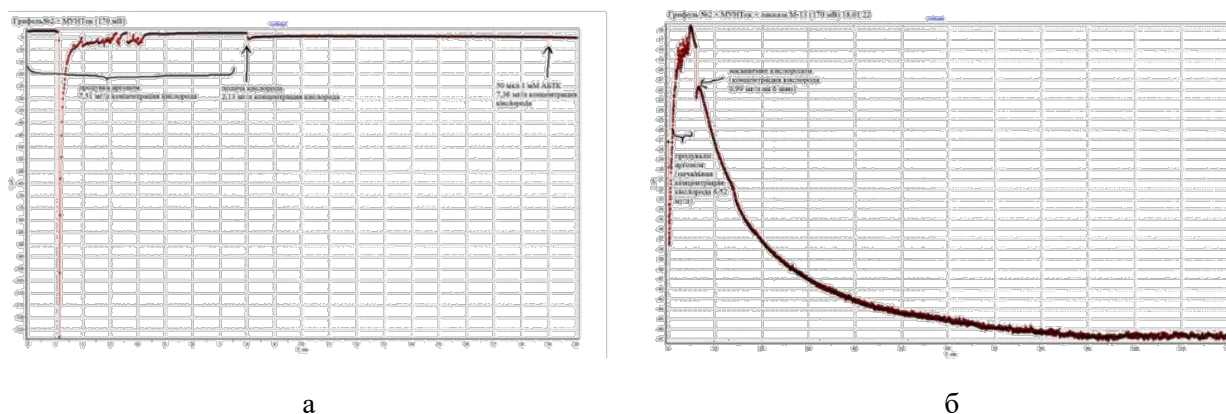


Рисунок 3. Амперометрическая характеристика графитовых грифельных электродов, модифицированных МУНТ, при потенциале +170 мВ: а) без фермента; б) с адсорбированной на поверхности лакказы 1300Т

### Заключение

Сравнительный анализ электрохимического поведения графитовых грифельных электродов и углеродных электродов, полученных трафаретной печатью, показал, что модификация обоих типов электродов окисленными многостенными углеродными нанотрубками приводит к многократному увеличению их активности в процессах электрокатализа. Таким образом, графитовые грифельные электроды, учитывая их широкую доступность при низкой стоимости, простоту использования, химическую инертность, низкий фоновый ток, работу в широком диапазоне потенциалов, низкую токсичность, способность адсорбировать электрохимические вещества на поверхности и простоту модификации, являются перспективными электродами для применения в электроанализе и биоэлектрокатализе. Предложена схема взаимодействия окисленных многостенных углеродных нанотрубок с короненом (полиароматическим углеводородом с элементарной структурой графена), объясняющая негативный эффект коронена в электрохимических системах на их основе. Однако электрохимическое окисление коронена при высоких потенциалах (+1,2В), адсорбированного на углеродных нанотрубках, продемонстрированное в работе, отрывает дополнительные возможности для увеличения эффективности переноса электронов от активного центра ферментов на электрод при разработке биосенсоров и биотопливных элементов (БТЭ). Важным результатом исследования является разработка методических подходов для создания лакказных электродов и выявления прямого переноса электронов в биоэлектрокаталитических системах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Госзадание № FEWG-2020–0008).*

### Литература

1. Dey B. and Dutta T. Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. // Bioelectrochemistry, 2022. V. 146. P. 108144.
2. Liang C., Li Z., Dai S. Mesoporous carbon materials: Synthesis and modification // Angewandte Chemie - International Edition. 2008. V. 47(20). P. 3696-3717.
3. Akanda M.R. et al. Recent Advances in Nanomaterial-Modified Pencil Graphite Electrodes for Electroanalysis // Electroanalysis. 2016. V. 28 (3). P. 408-424.
4. Nathani A., Vishnu N., Sharma C.S. Review—Pencil Graphite Electrodes as Platform for Enzyme and Enzyme-Like Protein Immobilization for Electrochemical Detection // J. Electrochem. Soc. 2020. V. 167 (3). P. 11.
5. Martinez-Ortiz J., Flores R., Vazquez-Duhalt R. Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26 (5). P. 2626-31.
6. Kigure S. et al. Energetics and electronic structures of carbon nanotubes encapsulating polycyclic aromatic hydrocarbon molecules // J. Phys. Soc. Japan. 2014. V. 83(12). P. 1–6.
8. Понаморева О.Н., Панковская В.И., Алферов С.В., Дьячкова Т.П., Алферов В.А. Взаимодействие окисленных многостенных углеродных нанотрубок с короненом на графитовых электродах: электрохимическое тестирование. // Материаловедение. 2022. №10. С.3-10.
9. Nisha S., Kumar A. S. pi-Self-Assembly of a Coronene on Carbon Nanomaterial-Modified Electrode and Its Symmetrical Redox and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Electrocatalytic Reduction Functionalities // Acs Omega. – 2020. – Т. 5, № 20. – С. 11817-11828.
10. Buzzetti P. H. M., Blanchard P.-Y., Girotto E. M., Nishina Y., Cosnier S., Le Goff A., Holzinger M. Insights into carbon nanotube-assisted electro-oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons for mediated bioelectrocatalysis // Chemical Communications. – 2021. – Т. 57, № 71. – С. 8957-8960.
11. Che A.-F., Germain V., Cretin M., Cornu D., Innocent C., Tingry S. Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis. // New Journal of Chemistry, 2011. V.35(12). P. 2848-2853