

THE COVALENT GRAFTING OF ORGANIC AND BIOMOLECULES TO CARBON SURFACES USING AROMATIC DIAZONIUM SALTS AND PREPARATION OF ORGANO-MODIFIED CARBON COMPOSITE MATERIALS

V. D. Filimonov, P. S. Postnikov, M.E. Trusova, M.A. Uimin, A.E. Ermakov, A.G. Pershina, A.E. Sazonov

Tomsk Polytechnic University, Department of Biotechnology and Organic Chemistry, 634050, Tomsk, Lenin Avenue, 30, Russia.

filimonov@tpu.ru

Keywords: diazonium salts, surface functionalization, organo/carbon composite materials.

Abstract

The modification process of carbon-coated metal nanoparticles using unique arenediazonium tosylates was shown and review of potential applications was presented.

1 Introduction

The new composite materials with surface organic layers have a widely applications in various branches of science and technology [1; 2; 3; 4]. The synthesis of these type materials can be carried out using surfactants or amphiphilic polymers [5], organosilicon compounds [6] and arenediazonium salts (ADS) [7; 8].

The using of ADS has some advantages. It are simplicity of using, wide range of surface and especially high binding energy.

The most interesting area of surface modification is the interaction of diazonium salts with the surface of metal nanoparticles coated by carbon [9]. Metal nanoparticles coated by carbon are one of the most perspective nanomaterials, especially for medicine [10] and organic synthesis [11].

Previously we reported about synthesis and synthetic applicability of new diazonium salts – arenediazonium tosylates (ADT) [12; 13]. ADT have a good solubility in water and some organic solvents, high stability at storage and non-explosion properties.

In this paper we reported about functional derivatives of surface-modified iron-core carbon-shell metal nanoparticles.

The modified Fe-core carbon shell nanospheres were obtained as described previously [13] (figure 1.)

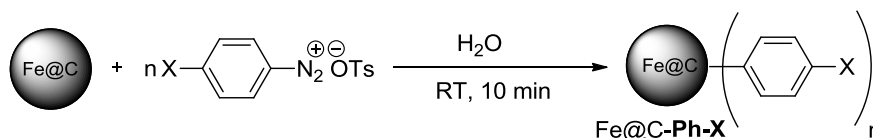


Figure 1. Spontaneous covalent modification of Fe-core carbon shell nanoparticles using arenediazonium tosylates (X= -NO₂, -COOH; -NH₂)

The obtained materials were used for further chemical reactions. Surface organic groups can be easily transformed into appropriate derivatives.

We used Fe@C-Ph-COOH nanoparticles for synthesis of biomolecular nanocomposites via EDC/NHS coupling (figure 2).

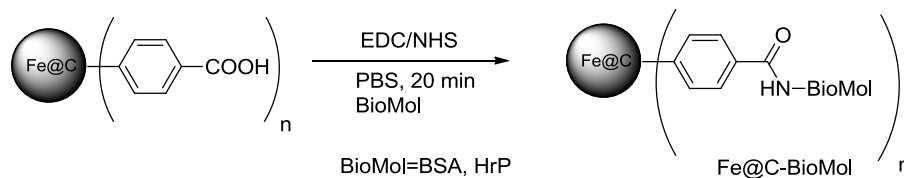


Figure 2. The scheme of biomolecules immobilisation on carbon-coated Fe-nanoparticles

After immobilisation the nanoparticles were separated from the solution using permanent magnet (0.2 T) and washed twice by PBS-buffer. The amount of proteins bound to nanoparticles was determined spectrophotometrically by solution depletion.

The materials Fe@C-BioMol were investigated by IR-ATR spectroscopy. In IR-spectra complexes characteristic absorption bands of protein appeared in the region of 1600-1500 cm^{-1} were found (figure 3).

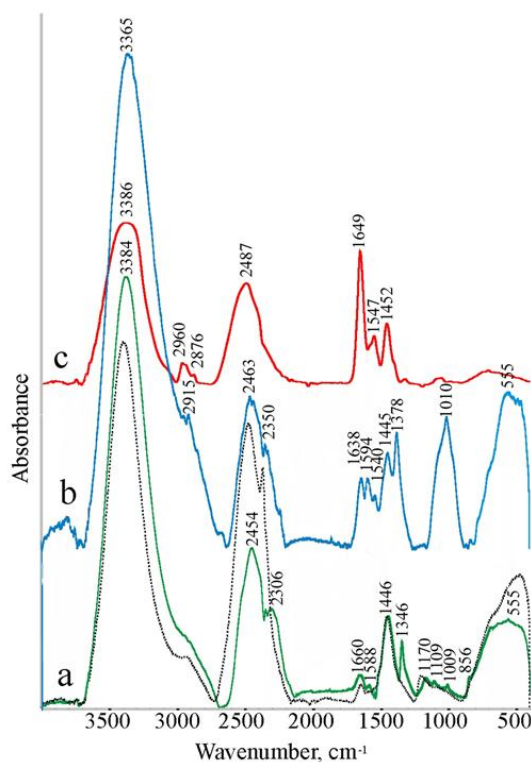


Figure 3. ATR-IR spectra of carbon coated iron nanoparticles (dashes black line), ADT-modified carbon coated iron nanoparticles (green line a), HRP immobilized onto carbon-coated iron nanoparticles (blue line b) and free HRP (red line c)

The IR-spectra of materials did not change after triple washing with PBS buffer. In supernatant the any concentration of BSA or HRP was not determined. Spectrophotometric analysis has shown that protein-binding capacity of nanoparticles constituted $0.1 \cdot 10^{-6}$ and

0.24*10⁻⁶ Mol per gram for BSA and HRP respectively. It was determined that horseradish peroxidase partially retained the specific enzymatic activity after immobilization.

This research is opening new potential applications of magnetically controlled immobilized biomolecules.

2 Materials and testing methods

The 4-carboxybenzenediazonium tosylate and Fe-core/carbon shell nanoparticles were obtained according to described procedures [12, 13]. The IR-ATR spectra were recorded on FT-IR spectrometer Nicolet 5700 with ATR unit equipped with diamond crystal. The amount of proteins bound to nanoparticles was determined spectrophotometrically by solution depletion (Unico 2800, United Product & Instrument INC, United States). The concentration of BSA was determined by Bradford method [14]. The concentration of HRP was determined using E403 = 95000 M⁻¹ cm⁻¹ [15]. HRP activity was measured using substrate solution containing 0,2 mM o-phenylenediamine (OPD), 17 mM H₂O₂ in 20 mM sodium citrate buffer, pH 5 [16].

The research was supported by State Contract of Russia Ministry of Education SC 16.512.11.2127 and Government Contract 3.308.2012

References

- [1] Davis M.E., Chen Z., Shin D.M. Nanoparticles therapeutics: an emerging treatment modality of cancer. *Nature Rev.*, **7**, pp. 771-782 (2008).
- [2] Xie J., Liu G., Eden H.S., Ai H., Chen X. Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. *Acc. Chem. Res.*, **44**, pp. 883-892 (2011).
- [3] Xu P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H., Lai C., Wei Z. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Sci. Tot. Envir.*, **424**, pp. 1-10 (2012).
- [4] Zhang Q., Xue C., Yuan Y., Lee J., Sun D., Xiong J. Fiber surface modification technology for fiber-optics localized surface plasmon resonance biosensors. *Sensors*, **12**, pp. 2729-2741 (2012).
- [5] Kim D.K., Mikhaylova M., Zhang Y., Muhammed M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Mater.*, **15**, pp. 1617-1627 (2002).
- [6] Ganesh A.V., Raut H.K., Nair A.S., Ramakrishna S. A review on self-cleaning coatings. *J. Mater. Chem.*, **21**, pp. 16304-16322 (2011).
- [7] Chemini M.M. Aryl Diazonium Salts. New coupling agents in polymer and surface science. Wiley-VCH, Weinheim (2012).
- [8] Mahouche-Chergui S., Gam-Derouich S., Mangeney C., Chehimi M.M. Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surface. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, pp. 4143-4166 (2011).
- [9] Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic separations in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, pp. 4909-4912 (2007).
- [10] Hermann I.K., Grass R.N., Stark W.J. High-strength metal nanomagnets for diagnostics and medicine: carbon shells allow long-term stability and reliable linker chemistry. *Nanomedicine*, **4**, pp. 787-798 (2009).
- [11] Wittmann S., Schatz A., Grass R., Stark W.J., Reiser O. A recyclable nanoparticle-supported palladium catalyst for the hydroxycarbonylation of aryl halides in water. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, pp. 1867-1870 (2010).
- [12] Filimonov V.D., Trusova M.E., Postnikov P.S., Krasnokutskaya E.A., Lee Y.M., Hwang H.Y., Kim H., Chi K.-W. Unusually stable, versatile, and pure arenediazonium tosylates:

- their preparation, structures and synthetic applicability. *Org. Lett.*, **10**, pp. 3961-3964 (2008).
- [13] Postnikov P.S., Trusova M.E., Fedushchak T.A., Uimin M.A., Ermakov A.E., Filimonov V.D. Aryldiazonium tosylates as new efficient agents for covalent grafting of aromatic groups on carbon coatings of metal nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia*, **5**, pp. 446-448 (2010).
- [14] Kruger N. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook. Part I*. pp. 15-21 (2002).
- [15] Ator M.A., David S.K., Ortiz de Montellan P.R. Structure and Catalytic Mechanism of Horseradish Peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **262**, pp. 14954-14960 (1987).
- [16] Hamilton T.M., Dobie-Galuska A.A., Wietstock S.M. The o-Phenylenediamine-Horseradish Peroxidase System: Enzyme Kinetics in the General Chemistry Laboratory. *J. Chem. Edu.*, **76**, 642-644 (1999).

Ковалентная прививки органических и биомолекул с углеродными поверхностями с использованием ароматических солей диазония и получение органо-модифицированных углеродных композиционных материалов

В.Д. Филимонов, П.С. Постников, М.Е. Трусова, М.А. Уйман, А.Е. Ермаков, А.Г. Першина, А.Э. Сазонов

Томский политехнический университет, Кафедра биотехнологии и органической химии, 634050 Томск, пр. Ленина 30, Россия

Ключевые слова: диазониевые соли, функционализация поверхности, органо/углеродные композитные материалы.

Аннотация

Показан процесс модификации металлических наноразмерных частиц покрытых углеродной оболочкой с использованием уникальных тозилатов арилдиазония и приведен обзор потенциальных путей применения полученных композитных материалов.

1. Введение

Новых композиционных материалов с поверхности органические слои имеют широкое применение в различных отраслях науки и техники [1, 2, 3, 4]. Синтез этих типов материалов может проводиться с использованием поверхностно-активных веществ или амфифильных полимеров [5], кремнийорганических соединений [6] и арилдиазония соли (ADS) [7, 8].

Использование ADS имеет ряд преимуществ. Это простота в использовании, широкий спектр создание связей с поверхностями и особенно с высокой энергией.

Самые интересные области модификации поверхности является взаимодействие солей диазония с поверхностью наночастиц металлов покрытые углеродом [9]. Металл наночастицы покрытые углеродом являются одной из самых перспективных наноматериалов, особенно в медицине [10] и органического синтеза [11].

Ранее мы сообщали о синтезе и синтетическом применении новых солей диазония - арилдиазония тозилаты (ADT) [12, 13]. ADT хорошо растворимы в воде и некоторых органических растворителях, обладают высокой стабильностью при хранении и взрывобезопасны.

В этой статье мы рассказываем о функциональных производных с модифицированной поверхностью с железными наночастицами покрытых углеродной оболочкой.

Модифицированный Fe@C наносферы были получены, как описано ранее [13] (рис. 1).

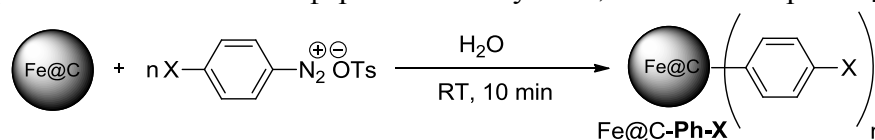


Рисунок 1. Спонтанная ковалентная модификация наночастиц Fe@C с использованием арилдиазония тозилаты (X = NO₂, -COOH, -NH₂)

Полученные материалы были использованы для дальнейших химических реакций. Органические группы на поверхности наночастицы могут быть легко преобразованы в соответствующие производные.

Мы использовали Fe@C-Ph-COOH наночастиц для синтеза биомолекул нанокомпозитов через EDC / NHS связи (рис. 2).

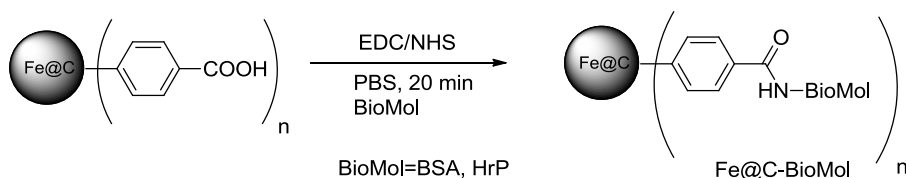


Рисунок 2. Схема иммобилизации биомолекул на углеродные наночастицы Fe@C-Ph-COOH

После иммобилизации наночастицы были выделены с использованием магнита (напряженность магнитного поля = 0,2 т) и промывали два раза PBS-буфере. Количество белков связанных с наночастиц определяли спектрофотометрическим методом.

Материалы Fe@C-BioMol были исследованы методом ИК-ATR-спектроскопии. В ИК-спектрах были обнаружены характерные полосы поглощения белка в области 1600-1500 см⁻¹ (рис. 3).

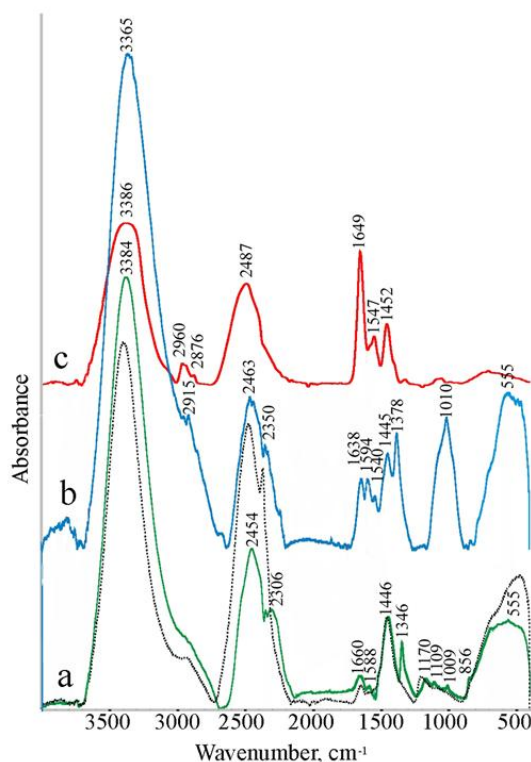


Рисунок 3. ИК-ATR-спектры Fe@C (черная линия), Fe@C-Ph-COOH (зеленая линия), Fe@C-BioMol (синяя линия б) и свободный HRP (красная линия С)

ИК-спектры материалов не изменились после тройной промывки PBS буфера. Спектрофотометрический анализ показал, количество связанных молекул белка, которая равна $0,1 \cdot 10^{-6}$ и $0,24 \cdot 10^{-6}$ моль на грамм для BSA и HRP соответственно. Было установлено, что пероксидаза хрена частично сохранила ферментативную активность после иммобилизации.

Эти исследования открывают новые возможности применения магнитоуправляемых иммобилизованных биомолекул.

2 Материалы и методы испытаний

4-карбоксихлорид азобензол и наночастицы Fe покрытые углеродной оболочкой были получены в соответствии с описанным методикам [12, 13]. ИК-ATR-спектры были записаны на ИК-Фурье спектрометр Nicolet 5700 с ATR блок оснащен кристалла алмаза. Количество белков связаны с наночастиц определяли спектрофотометрически (Unico 2800, Соединенных продукт и инструмент INC, США). Концентрация БСА определяли методом Bradford [14]. Концентрацию HRP определяли с помощью E403 = 95000 М⁻¹ см⁻¹ [15]. HRP активность измерялась с помощью подложки раствором, содержащим 0,2 мМ о-фенилендиамина (ОФД), 17 мМ H₂O₂ в 20 мМ буфера цитрата натрия, pH 5 [16]. Работа выполнена при поддержке ГК 16.512.11.2127 и ГК 3.308.2012

Литература

- [1] Davis M.E., Chen Z., Shin D.M.. Nanoparticles therapeutics: an emerging treatment modality of cancer. *Nature Rev.*, 7, pp. 771-782 (2008).
- [2] Xie J., Liu G., Eden H.S., Ai H., Chen X. Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. *Acc. Chem. Res.*, 44, pp. 883-892 (2011).
- [3] Xu P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H., Lai C., Wei Z. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Sci. Tot. Envir.*, 424, pp. 1-10 (2012).
- [4] Zhang Q., Xue C., Yuan Y., Lee J., Sun D., Xiong J. Fiber surface modification technology for fiber-optics localized surface plasmon resonance biosensors. *Sensors*, 12, pp. 2729-2741 (2012).
- [5] Kim D.K., Mikhaylova M., Zhang Y., Muhammed M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Mater.*, 15, pp. 1617-1627 (2002).
- [6] Ganesh A.V., Raut H.K., Nair A.S., Ramakrishna S. A review on self-cleaning coatings. *J. Mater. Chem.*, 21, pp. 16304-16322 (2011).
- [7] Chemini M.M. Aryl Diazonium Salts. New coupling agents in polymer and surface science. Wiley-VCH, Weinheim (2012).
- [8] Mahouche-Chergui S., Gam-Derouich S., Mangeney C., Chehimi M.M. Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surface. *Chem. Soc. Rev.*, 40, pp. 4143-4166 (2011).
- [9] Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic separations in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, pp. 4909-4912 (2007).
- [10] Hermann I.K., Grass R.N., Stark W.J. High-strength metal nanomagnets for diagnostics and medicine: carbon shells allow long-term stability and reliable linker chemistry. *Nanomedicine*, 4, pp. 787-798 (2009).
- [11] Wittmann S., Schatz A., Grass R., Stark W.J., Reiser O. A recyclable nanoparticle-supported palladium catalyst for the hydroxycarbonylation of aryl halides in water. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, pp. 1867-1870 (2010).
- [12] Filimonov V.D., Trusova M.E., Postnikov P.S., Krasnokutskaya E.A., Lee Y.M., Hwang H.Y., Kim H., Chi K.-W. Unusually stable, versatile, and pure arenediazonium tosylates: their preparation, structures and synthetic applicability. *Org. Lett.*, 10, pp. 3961-3964 (2008).
- [13] Postnikov P.S., Trusova M.E., Fedushchak T.A., Uimin M.A., Ermakov A.E., Filimonov V.D. Aryldiazonium tosylates as new efficient agents for covalent grafting of aromatic groups on carbon coatings of metal nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia*, 5, pp. 446-448 (2010).
- [14] Kruger N. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook. Part I.* pp. 15-21 (2002).
- [15] Ator M.A., David S.K., Ortiz de Montellan P.R. Structure and Catalytic Mechanism of Horseradish Peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 262, pp. 14954-14960 (1987).
- [16] Hamilton T.M., Dobie-Galuska A.A., Wietstock S.M. The o-Phenylenediamine-Horseradish Peroxidase System: Enzyme Kinetics in the General Chemistry Laboratory. *J. Chem. Edu.*, 76, 642-644 (1999).