

19 Хемилюминесцентный сенсор пероксида водорода на основе люминола и коллоидного раствора металлических наночастиц

© Н.А. Вирц^{1,2}, Д.Р. Дададжанов¹, А.С. Яблоков³, Д.В. Шершнёв², Т.А. Вартамян¹

¹ Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

² Новосибирский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

³ ООО „Фармсинтэк“,
400075 Волгоград, Россия

e-mail: Tigran.Vartanyan@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

В окончательной редакции 18.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Исследовано влияние золотых и серебряных наночастиц, обладающих плазмонным резонансом, на хемилюминесценцию люминола в окислительной среде. Показано, что при добавлении к люминолу коллоидного раствора металлических наночастиц интенсивность хемилюминесценции, вызванная присутствием пероксида водорода и гипохлорита натрия, возрастает и может быть легко зарегистрирована при характерном для биологических сред близком к нейтральному уровне pH, при котором в отсутствие металлических наночастиц хемилюминесценция слаба.

Ключевые слова: хемилюминесценция, плазмонный резонанс, серебряные наночастицы, золотые наночастицы, водородный показатель pH.

DOI: 10.61011/OS.2023.11.57033.5767-23

Введение

Обнаружение и определение уровня пероксида водорода (H_2O_2) и гипохлоритов (солей $HOClO$) в биологической системе может играть жизненно важную роль в мониторинге различных патологических изменений. Высокие уровни данных активных форм кислорода могут нанести вред организму, вызывая повреждение клеток, воспалительные заболевания и онкологию [1–12]. Хотя большинство используемых методов мониторинга H_2O_2 и OCI^- [13–18] основано на электрохимических процессах, в последнее время получили развитие оптические методы обнаружения АФК, обладающие такими преимуществами, как высокая чувствительность, селективность, быстродействие и портативность [19]. Особенно привлекательной представляется возможность использования хемилюминесценции (ХЛ) молекул хемилуминофоров, поскольку для ее возбуждения не требуется источник света. Источником энергии для ХЛ является экзотермическая химическая реакция, сопровождающаяся испусканием фотонов, тогда как для работы оптических датчиков, основанных на фотолюминесценции, необходим внешний источник света [20]. К достоинствам метода детектирования на основе ХЛ относится также сравнительная простота подготовки исследуемых веществ к анализу [21–24].

Наряду с перечисленными выше достоинствами сенсорные системы на основе ХЛ имеют существенный недостаток, заключающийся в низкой интенсивности ХЛ-сигнала, ведущей к необходимости использования

чувствительных приемников оптического излучения и дополнительного усиления слабых детектируемых сигналов [25,26]. В связи с этим выбор хемилуминофоров, пригодных для практического использования, невелик. К наиболее эффективным относятся люминол и люцигенин. ХЛ выбранного хемилуминофора может быть усилена в присутствии в растворе дополнительных веществ-активаторов, в частности ионов металлов, а также некоторых ферментов [27–29].

Альтернативный подход к усилению ХЛ состоит в увеличении скорости радиационных переходов возбужденной молекулы хемилуминофора, что позволяет уменьшить вероятность безызлучательной дезактивации возбужденной молекулы. Реализация этого подхода стала возможной с развитием методов создания металлических наночастиц, обладающих плазмонным резонансом. Для эффективного ускорения радиационных переходов необходимо выполнение двух условий: полоса поглощения поверхностного плазмонного резонанса (ППР) металлической наночастицы должна быть спектрально близка и перекрываться с полосой излучения хемилуминофора, а сама молекула хемилуминофора должна находиться вблизи поверхности наночастицы на расстояниях порядка размеров наночастицы [30]. В этом случае скорость радиационных переходов в молекуле люминофора может быть увеличена за счет эффекта Парселла. Для реализации этого подхода использовались различные типы металлических наноструктур, включая наночастицы, нанокристаллы, нанокластеры и

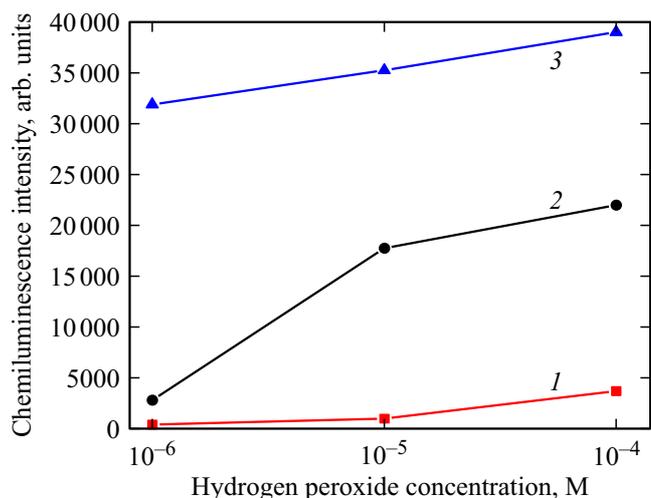


Рис. 1. Интенсивность ХЛ люминола в зависимости от концентрации пероксида водорода при различных концентрациях серебряных наночастиц: 1 — без наночастиц, 2 — при концентрации серебряных наночастиц 10^9 ml^{-1} , 3 — при концентрации серебряных наночастиц 10^{10} ml^{-1} .

нанопленки [30–37]. Положение полос ППР наночастиц благородных металлов благоприятно для усиления ХЛ люминола. Полоса ППР наночастиц серебра (AgNP) в воде с максимумом на длине волны 400 nm значительно перекрывается с полосой ХЛ люминола, максимум которой приходится на 425 nm. Полоса ППР наночастиц золота (AuNP) в воде с максимумом на длине волны 520 nm также перекрывается с полосой ХЛ люминола, хотя и несколько хуже.

ХЛ люминола, усиленная в присутствии серебряных наночастиц в виде коллоидного раствора и гранулированной пленки, наблюдалась нами ранее [34,38]. В настоящей работе сообщается о зависимости интенсивности ХЛ люминола от концентрации пероксида водорода в присутствии наночастиц серебра и золота. Благодаря плазмонному усилению доступными для наблюдения и регистрации становятся меньшие концентрации пероксида водорода.

Материалы и методы экспериментального исследования

Для проведения исследований ХЛ был приготовлен раствор люминола (Ленреактив) с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ М (водный раствор люминола имел pH 6, pH 7 достигался добавлением NaOH). Концентрации водных растворов NaOCl и H_2O_2 определялись спектрофотометрически перед использованием ($\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при pH 12 и $\epsilon_{230} = 74 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для NaOCl и H_2O_2 соответственно [39]). Для проведения реакции подготавливались смеси раствора люминола (1 ml) с H_2O_2 нужной концентрации. Раствор NaOCl (400 μl) вводился с помощью шприца (1 ml) через тонкую пластиковую

трубочку. Концентрация NaOCl в рабочем объеме смеси была 10^{-4} М, концентрация H_2O_2 варьировала от 10^{-4} до 10^{-6} М.

Водный раствор NaOCl с концентрацией 10^{-4} М имеет pH 8.5. При его добавлении в раствор люминола pH рабочей смеси составляет около 7.5.

Для изучения влияния плазмонных эффектов на интенсивность ХЛ использовались серебряные и золотые наночастицы. Коллоидный раствор золотых наночастиц был подготовлен следующим образом. В колбу Эрленмейера наливали точно 240 ml деионизованной воды; воду доводили до кипения с обратным водяным холодильником на магнитной мешалке с электроподогревом; добавляли 2.5 ml 1%-раствора HAuCl₄; добавляли 7.5 ml 1%-раствора цитрата натрия; продолжали кипячение еще 30 min; наблюдали образование золь ярко-красного цвета.

Диаметр синтезированных золотых наночастиц (15 nm) определяли с использованием UV-Vis спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) и анализатора размера частиц. Во всех экспериментах использовалась деионизованная вода MilliQ, свежеприготовленные отфильтрованные растворы цитрата натрия (Sigma) и HAuCl₄ (Sigma, Aldrich). Концентрация данного раствора составила $1.6 \cdot 10^{12} \text{ ml}^{-1}$. Концентрация наночастиц в полученном коллоидном растворе оценивалась с помощью коэффициента экстинкции. В рабочем объеме концентрация составляла 10^{10} ml^{-1} и 10^{11} ml^{-1} .

Наночастицы серебра были синтезированы методом лазерной абляции. Серебряная мишень помещалась на дно кварцевой кюветы, заполненной дистиллированной водой. Излучение импульсного Nd:YAG-лазера (Солар ЛС) фокусировалось на поверхности мишени. Длина волны второй гармоники составляла 532 nm, энергия в импульсе была 50 mJ, длительность импульса 7 ns. Облучение производилось в течение 15 min.

Концентрация наночастиц серебра в полученном коллоидном растворе теоретически оценивалась с учетом размерного распределения частиц (по изображениям, полученным в сканирующем электронном микроскопе) методом сравнения спектров оптического поглощения с теорией рассеяния Ми. Концентрация составила $6 \cdot 10^{10} \text{ ml}^{-1}$. В рабочем объеме концентрация наночастиц серебра составляла 10^9 и 10^{10} ml^{-1} .

Для исследования кинетики ХЛ люминола при разных концентрациях пероксида водорода был использован фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) с АЦП H9305-04 (Hamamatsu), помещенный в темный контейнер с кюветодержателем. Время экспозиции составляло 100 ms. Смесь люминола с перекисью водорода необходимой концентрации в объеме 1 ml и с добавлением наночастиц серебра или золота помещалась в пластиковую кювету (1 cm) и устанавливалась в кюветодержатель перед окном ФЭУ. Введение раствора NaOCl инициировало реакцию окисления молекул люминола. Возникающая в результате реакции ХЛ люминола регистрировалась ФЭУ и передавалась на компьютер с помощью программного

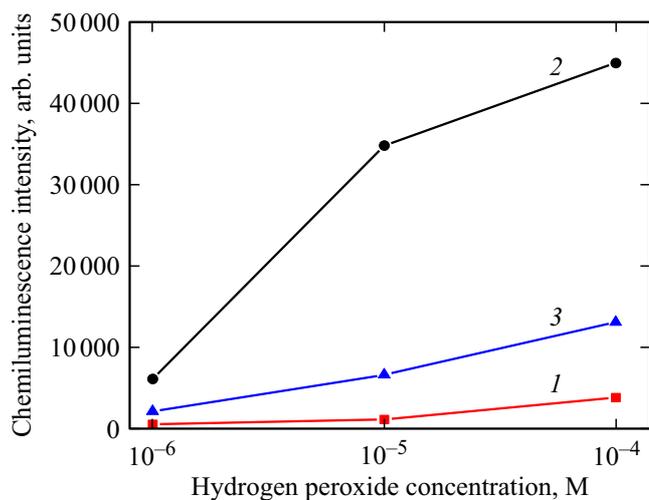


Рис. 2. Интенсивность ХЛ люминола в зависимости от концентрации перекиси водорода при различных концентрациях золотых наночастиц: 1 — без наночастиц, 2 — при концентрации золотых наночастиц 10^{10} ml^{-1} , 3 — при концентрации золотых наночастиц 10^{11} ml^{-1} .

обеспечения, написанного на языке Python. С началом реакции окисления интенсивность ХЛ люминола быстро возрастала, достигала максимума и начинала спадать вследствие израсходования реагентов. В качестве меры интенсивности ХЛ принималось ее пиковое значение.

Результаты

На рис. 1 представлены зависимости интенсивности ХЛ люминола от концентрации перекиси водорода при различных концентрациях серебряных наночастиц и при их отсутствии. Рост интенсивности ХЛ люминола с ростом концентрации перекиси водорода регистрируется и при отсутствии серебряных наночастиц, однако сигнал мал и при минимальных концентрациях перекиси водорода 10^{-6} – 10^{-5} М не может быть надежно измерен. При введении в реакцию смесь серебряных наночастиц интенсивность ХЛ увеличивается в десятки раз, причем ее зависимость от концентрации перекиси водорода становится более выраженной. С увеличением концентрации серебряных наночастиц интенсивность ХЛ растет, однако ее зависимость от концентрации перекиси водорода в области малых концентраций становится менее резкой.

На рис. 2 представлены зависимости интенсивности ХЛ люминола от концентрации перекиси водорода при различных концентрациях золотых наночастиц. Для сравнения воспроизведена также зависимость интенсивности ХЛ люминола при отсутствии металлических наночастиц.

Введение в реакцию смесь золотых наночастиц в концентрации 10^{10} ml^{-1} приводит к росту интенсивности ХЛ, сравнимому с ростом при введении серебряных на-

ночастиц. Однако при увеличении концентрации золотых наночастиц до 10^{11} ml^{-1} эффект усиления не растет, как в присутствии серебряных наночастиц, а падает.

Обсуждение результатов

В настоящей работе основное внимание было уделено возможности обнаружения и определения концентрации пероксида водорода по ХЛ люминола. В связи с этим реакция окисления запускалась добавлением в заранее приготовленную реакционную смесь с переменной концентрацией пероксида водорода фиксированного количества гипохлорита натрия. Поскольку для имитации условий, благоприятных для проведения биохимических исследований, водородный показатель реакционной смеси поддерживался на нейтральном уровне (рН 7.5), интенсивность ХЛ без введения металлических наночастиц была мала. Из-за этого сравнение интенсивностей ХЛ, вызванной присутствием пероксида водорода в различных концентрациях, было затруднено. Введение в реакционную смесь металлических наночастиц (как серебряных, так и золотых) приводит к значительному усилению ХЛ люминола в присутствии окислителей, что облегчает ее регистрацию и делает возможной сравнение интенсивностей ХЛ при различных концентрациях пероксида водорода.

Результаты проведенных экспериментов недостаточны для однозначного определения механизма усиления ХЛ золотыми и серебряными наночастицами и связи его с эффектом Парселла. Изменение интенсивности ХЛ во времени определяется кинетикой химической реакции окисления, что исключает использование этой зависимости для выяснения скорости радиационных переходов в возбужденной молекуле хемилуминофора. Другой характерный признак плазмонного механизма усиления связан со степенью перекрывания полос плазмонного резонанса и ХЛ люминола. В этом отношении серебряные наночастицы превосходят золотые наночастицы, поскольку полоса ППП золотых наночастиц с максимумом на длине волны 520 nm перекрывается полосой ХЛ люминола с максимумом на длине волны 425 nm значительно хуже, чем полоса ППП серебряных наночастиц с максимумом на длине волны 400 nm. В соответствии с этим максимальное усиление ХЛ серебряными наночастицами превышало 30 раз, а золотыми наночастицами — только 10 раз. Дополнительные свидетельства в пользу плазмонного механизма усиления ХЛ серебряными наночастицами были получены в [38] путем изоляции поверхности наночастиц от непосредственного контакта с молекулами хемилуминофора. Поскольку это приводило только к ослаблению эффекта усиления, но не к его полному исчезновению, плазмонный механизм усиления ХЛ представляется гораздо более вероятным, чем химический катализ, требующий непосредственного контакта молекулы люминофора с металлической поверхностью.

Заключение

Использование коллоидных растворов золотых и серебряных наночастиц позволяет увеличить интенсивность ХЛ люминола в окислительной среде в десятки раз. Что особенно важно, это усиление наблюдается в благоприятных для исследования биологических проб условиях, близких к нейтральным (pH 7.5), в которых интенсивность ХЛ люминола без усиления металлическими наночастицами мала, что затрудняет ее использование для обнаружения и определения концентрации пероксида водорода.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-72-00045, <https://rscf.ru/project/23-72-00045/>

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J. Meier, E.M. Hoerber, J.A. Stapleton, N.M. Iverson. *Chemosensors*, **7**, 64 (2019). DOI: 10.3390/chemosensors7040064
- [2] M. Mittal, M.R. Siddiqui, Kh. Tran, S.P. Reddy, A.B. Malik. *Antioxid. Redox Signal.*, **20** (7), 1126 (2014). DOI: 10.1089/ars.2012.5149
- [3] S. Sen, R. Chakraborty, C. Sridhar, Y.S.R. Reddy, B. De. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **3**, 91 (2010).
- [4] S. Parvez, M.J.C. Long, J.R. Poganik, Y. Aye. *Chem. Rev.*, **118** (18), 8798 (2018).
- [5] D.P. Jones, H. Sies. *Antioxidants Redox Signal.*, **23** (9), 734 (2015).
- [6] J.C. Morris. *J. Phys. Chem.*, **70**, 3798–3805 (1966).
- [7] L.J. Hazell, L. Arnold, D. Flowers, G. Waeg, E. Malle, R. Stocker. *Clin. Investig.*, **97**, 1535 (1996). DOI: 1172/JCII18576
- [8] I.H. Buss, R. Senthilmohan, B.A. Darlow, N. Mogridge, A.J. Kettle, C. C. Winterbourn. *Pediatr. Res.*, **53**, 455 (2003). DOI: 10.1203/01.PDR.0000050655.25689.CE
- [9] J.K. Andersen. *Nat. Med.* **10**, 18 (2004). DOI:10.1038/nrn1434
- [10] J. Perez-Vilar, R.C. Boucher. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 1564 (2004). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.027
- [11] L. Gebicka, E. Banasiak. *Toxicology in Vitro*, **26**, 924 (2012).
- [12] Y. Yue, F. Huo, C. Yin, J. O. Escobedo, R. M. Strongin. *Analyst*, **141**, 1859 (2016).
- [13] M. Feizabadi, A.Soleymanpour, H. Faridnouri, D. Ajloo. *Int. J. Biol. Macromol.*, **136**, 597 (2019).
- [14] B. Narayana, M. Mathew, K. Vipin, N. Sreekumar, T. Cherian. *J. Anal. Chem.*, **60**, 706 (2005). DOI: 10.1007/s10809-005-0166-y
- [15] T. Watanabe, T. Idehara, Y. Yoshimura, H. Nakazawa. *J. Chromatogr. A*, **796**, 397 (1998). DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01009-1
- [16] F.B. Gonzaga, L.R. Cordeiro. *Qual. Assur.*, **19**, 283 (2014). DOI: 10.1007/s00769-014-1059-2
- [17] J. March, B. Simonet. *Talanta*, **73**, 232 (2007). DOI:10.1016/j.talanta.2007.03.027
- [18] C.S. Pundir, R. Deswal, V. Narwal. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **41**, 313 (2018).
- [19] J.V. Jun, D.M. Chenoweth, E.J. Petersson. *Org. Biomol. Chem.*, **18**, 5747 (2020). DOI: 10.1039/D0OB01131B
- [20] S. Xu, Y. Wang, D. Zhou et al. *Sci. Rep.*, **6** (1), 1 (2016).
- [21] Y. Zhang, J. Liu, T. Liu, H. Li, Q. Xue, R. Li, L. Wang, Q. Yue, S. Wang. *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 111 (2016).
- [22] X. Wei, Y. Xia, M. Shen, Y. Yang, J. Jin, H. Xu, Z.Li. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **19**, 1971 (2019).
- [23] F. Li, L. Guo, Y. Hu, Z. Li, J. Liu, J. He, H. Cui. *Talanta*, **207**, 120346 (2020).
- [24] R. Yang, F. Li, W. Zhang, W. Shen, D. Yang, Z. Bian, H. Cui. *Anal. Chem.*, **91**, 13006 (2019).
- [25] N. Hananya, E. Boock, C.R. Bauer, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat. *J. American Chem. Soc.*, **138** (40), 13438 (2016).
- [26] Y.A. Vladimirov, E.V. Proskurnina. *Biochem.*, **74** (13), 1545 (2009).
- [27] Ю.Б. Цаплев. *Люминесцентный анализ. Проблемы аналитической химии*, Т. 19, под ред. Г.И. Романовской (Наука, М., 2015), с. 228-244.
- [28] R. Wang, N. Yue, A. Fan. *Analyst*, **145**, 7488 (2020).
- [29] H. Zhu, X. Huang, Y. Deng, H. Chen, M. Fan, Zh. Gong. *Trends in Analytical Chem.*, **158**, 116879 (2023).
- [30] F. Jiang, P. Li, C. Zong, H. Yang. *Analytica Chim. Acta.*, **1114**, 58–65 (2020).
- [31] K. Aslan, C.D. Geddes. *Chem. Soc. Rev.*, **38** (9), 2556 (2009).
- [32] M. Iranifam. *Trac. Trends Anal. Chem.*, **82**, 126 (2016).
- [33] Z. Wang, B. Dong, X. Cui, Q. Fan, Y. Huan, H. Shan, G. Feng, Q. Fei. *Anal. Sci.*, **36**, 1045 (2020).
- [34] A. Karabchevsky, A. Mosayyebi, A.V. Kavokin. *Light Sci. Appl.*, **5** (11), 16164 (2016).
- [35] Wen-Sheng Zhang, Jun-Tao Cao, Yu-Xiang Dong, Hui Wang, Shu-Hui Ma, Yan-Ming Liu. *J. Luminescence*, **201**, 163 (2018).
- [36] Z. Abolghasemi-Fakhri. *Spectrochimica Acta A*, **216**, 85 (2019).
- [37] C. Zong, D. Zhang, F. Jiang et al. *Talanta*, **199**, 164 (2019).
- [38] D.R. Dadadzhyanov, I. A. Gladskikh, M. A. Baranov, T. A. Vartanyan, A.Karabchevsky. *Sensors and Actuators B: Chem.*, **333**, 129453 (2021).
- [39] J. Arnhold, S. Mueller, K. Arnold, E. Grimm. *J. Bioluminesc. Chemiluminesc.*, **6**, 189 (1991).