

Металл-усиленная хемилюминесценция люминола в микрофлюидной системе с осажденными в вакууме наночастицами серебра

© Д.В. Кононов¹, А.В. Палехова¹, Н.А. Филатов², Н.Б. Леонов¹, А.С. Букатин^{2,3}, Д.Р. Дададжанов¹, Т.А. Вартамян¹¶

¹ Университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия

² СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова,
Санкт-Петербург, Россия

³ Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: Tigran.Vartanyan@mail.ru

Поступила в редакцию 28.11.2024 г.

В окончательной редакции 28.11.2024 г.

Принята к публикации 04.12.2024 г.

Усиление хемилюминесценции люминола в присутствии серебряных наночастиц исследовано в специально разработанном для этой цели микрофлюидном чипе. Конструкция чипа обеспечивает интенсивное перемешивание люминола с окислителем и доставку смеси к наночастицам, обладающим плазмонным резонансом в полосе хемилюминесценции люминола. Установлена зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации гипохлорита натрия. Покрытие дна микрофлюидного чипа серебряными наночастицами привело к увеличению интенсивности хемилюминесценции люминола в нейтральной среде в среднем в полтора раза.

Ключевые слова: микрофлюидный чип, хемилюминесценция, плазмонный резонанс, люминол.

DOI: 10.61011/OS.2024.12.59809.7399-24

Введение

Хемилюминесценция — излучение света, вызванное химической реакцией, имеет множество разнообразных применений, в том числе для анализа биологических материалов. Наиболее непосредственным образом хемилюминесценция может быть применена для обнаружения и определения степени оксидативного стресса организма, который является маркером, а в некоторых случаях и причиной ряда заболеваний. Люминол и люцигенин, излучающие при контакте с окислителями в синезеленой области спектра, успешно используются для регистрации синглетного кислорода, перекиси водорода и других перекисей в щелочной среде. В нейтральных средах, которые используются при исследовании биологических проб, интенсивность хемилюминесценции обоих названных хемилюминофоров резко падает, что не позволяет регистрировать малые концентрации окислителя. В этих условиях слабость хемилюминесценции связана как с малой вероятностью самого перехода молекулы в электронно-возбужденное состояние в ходе окислительно-восстановительной реакции, так и с малым квантовым выходом хемилюминесценции, обусловленным конкуренцией излучательных и безызлучательных каналов дезактивации электронно-возбужденного продукта химической реакции [1]. Последнее обстоятельство открывает возможность увеличения интенсивности хемилюминесценции путем увеличения ее квантового выхода за счет ускорения радиационного перехода.

Зависимость скорости радиационных переходов от диэлектрических свойств окружающей излучатель среды известна как эффект Парселла [2]. Особенно сильным может быть действие металлических наночастиц, обладающих локализованным плазмонным резонансом, в частности золотых и серебряных. Металлические наночастицы из серебра и золота широко используются в таких биомедицинских применениях, как адресная доставка лекарств [3], фототермическая [4] и фотодинамическая [5] терапия онкологических заболеваний, оптическая когерентная томография, иммуноанализ [6,7] и биосенсинг [8–10]. В биологических исследованиях уже появились работы, посвященные использованию плазмонного усиления, например для регистрации микотоксинов [11]. Важной особенностью металлических наночастиц является зависимость их оптических свойств от размера и формы [12]. Для того, чтобы связь излучающей молекулы и металлической наноструктуры была эффективной, необходимо обеспечить перекрытие спектра излучения хемилюминофора и полосы плазмонного резонанса. Первые результаты по плазмон-усиленной хемилюминесценции были получены [13] на хемилюминофорах, непригодных для биологического использования из-за токсичности. Решающая роль электродинамического эффекта ускорения радиационного перехода по сравнению с возможным каталитическим действием серебра на интенсивность хемилюминесценции люминола,

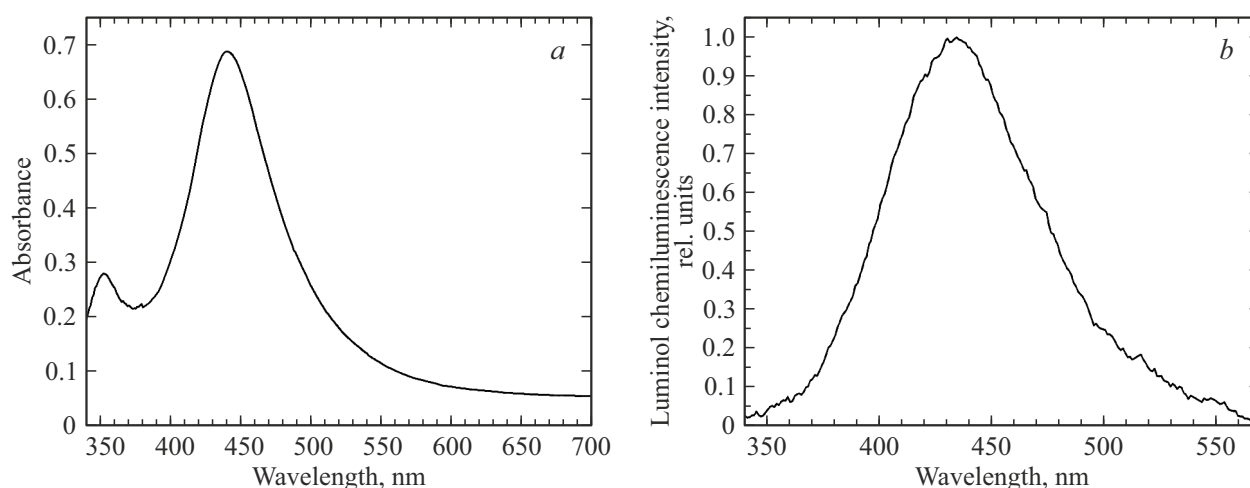


Рис. 1. (а) Спектр экстинкции островковой пленки серебра, образованной на дне микрофлюидного канала, (б) спектр хемилюминесценции люминола в процессе окисления гипохлоритом натрия.

который пригоден для биологических применений, была продемонстрирована в [9].

В настоящей работе сообщается о применении специально разработанного микрофлюидного чипа для исследования усиления хемилюминесценции люминола в окислительной среде с нейтральным $\text{pH} = 7$ при контакте с серебряными наночастицами. Ансамбль серебряных наночастиц был получен путем вакуумного осаждения паров металла на стеклянную подложку, которая была интегрирована в микрофлюидный чип. На второй пластине микрофлюидного чипа, изготовленной из полидиметилсилоксана (PDMS), были сформированы микроканалы и функциональные элементы, необходимые для смешения реагентов и доставки их к месту регистрации излучения. Интенсивность хемилюминесценции люминола в присутствии серебряных наночастиц в среднем увеличилась в полтора раза.

Формирование ансамбля серебряных наночастиц

Наночастицы серебра были сформированы на стеклянной подложке путем термического напыления в вакуумной камере PVD-75 (Kurt Lesker, США). Эквивалентная толщина гранулированной пленки варьировалась в пределах от 8 до 10 nm по показаниям кварцевых микровесов. После напыления пленка отжигалась в вакууме в течение 30 min при температуре 200 °C. Более подробно процессы напыления и отжига описаны в [14].

На рис. 1, а представлен спектр экстинкции островковой серебряной пленки, измеренный на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия), а на рис. 1, б — спектр хемилюминесценции люминола, зарегистрированный в процессе окисления гипохлоритом натрия многоканальным фотонным анализатором РМА-12 (Hamamatsu, Япония). Очевидная спектральная близость спектра хемилюминесценции люминола и полосы поглощения гранулированной серебряной пленки позволяет рассчитывать на эффективное взаимодействие между возбужденными продуктами окисления люминола и коллективными электронными возбуждениями в наночастицах, образующих серебряную пленку.

Для использования гранулированной серебряной пленки в составе микрофлюидного чипа необходимо было обеспечить возможность герметичного соединения стеклянной подложки, несущей серебряные наночастицы, с пластиной из PDMS, на которой были созданы каналы и функциональные элементы. Поскольку отработанная технология предполагала соединение PDMS со стеклом, была создана металлическая маска, позволившая в условиях вакуумного напыления серебра оставить на подложке не покрытые серебром части. Кроме того, было проверено, что обработка стеклянной подложки растворителями и коронным разрядом, необходимая для обеспечения надежного соединения частей микрофлюидного чипа, незначительно уменьшает экстинкцию гранулированной серебряной пленки [15] и не влияет на спектральное положение плазмонного резонанса.

Для использования гранулированной серебряной пленки в составе микрофлюидного чипа необходимо было обеспечить возможность герметичного соединения стеклянной подложки, несущей серебряные наночастицы, с пластиной из PDMS, на которой были созданы каналы и функциональные элементы. Поскольку отработанная технология предполагала соединение PDMS со стеклом, была создана металлическая маска, позволившая в условиях вакуумного напыления серебра оставить на подложке не покрытые серебром части. Кроме того, было проверено, что обработка стеклянной подложки растворителями и коронным разрядом, необходимая для обеспечения надежного соединения частей микрофлюидного чипа, незначительно уменьшает экстинкцию гранулированной серебряной пленки [15] и не влияет на спектральное положение плазмонного резонанса.

Разработка и изготовление микрофлюидного чипа

Разработанный микрофлюидный чип состоит из двух герметично соединенных пластин: на одной пластине, сформированной из PDMS, были созданы необходимые функциональные элементы, а на второй — стеклянной, которая в обычных условиях выполняет только защитную функцию [16], — была создана гранулированная серебряная пленка, описанная выше.

Ключевым этапом проведения реакции является смешивание хемилуцинофора с аналитом, которое запуска-

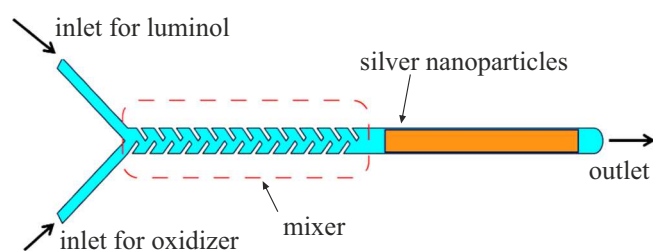


Рис. 2. Принципиальная схема одного канала микрофлюидного чипа для хемилюминесцентной диагностики оксидативного стресса.

ет реакцию окисления и в дальнейшем приводит к появлению возбужденных продуктов реакции и излучению света. Для эффективного перемешивания реагентов в микрофлюидных устройствах требуется применять специальные смесители [17–19], так как без них в каналах осуществляется ламинарное течение, при котором перемешивания не происходит. Топология одиночного канала микрофлюидного чипа представлена на рис. 2. В первой части канала расположены входы для хемилуминофора и аналита и миксер, а во второй — поверхность, которая могла быть покрыта серебряными наночастицами, и выход для отработанной смеси. В области микрофлюидного миксера глубина каналов составляет $70\ \mu\text{m}$, а в области расположения серебряных наночастиц и регистрации хемилюминесценции — $10\ \mu\text{m}$. Схема одного канала для наблюдения хемилюминесценции представлена на рис. 2.

Для удобства проведения экспериментов на одной подложке размером $25 \times 25\ \text{mm}$ были изготовлены 7 независимых микрофлюидных каналов, схема расположения которых представлена на рис. 3, а. На рис. 3, б представлена фотография изготовленного микрофлюидного чипа.

Процедура измерений

Для измерения хемилюминесценции чип помещался в специальный кожух, убирающий паразитную подсветку. Микрофлюидный чип закреплялся над активной областью фотоэлектронного умножителя H11890 (Hamamatsu), работающего в режиме счета фотонов, таким образом, чтобы собрать максимум излученного света. После этого через шприцевой насос со скоростью $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ по двум силиконовым трубкам подавались реагенты: люминол и смесь гипохлорита натрия с гидроксидом натрия, концентрации которых варьировались. Реагенты смешивались в канале микрофлюидного чипа и затем удалялись из чипа по третьей силиконовой трубке. Сигнал фотоэлектронного умножителя выводился на экран монитора. Поскольку время подачи люминола и окислителя в миксер составляет десятки секунд, в течение которых интенсивность хемилюминесценции нарастает, в качестве результата измерения принималось

установившееся значение интенсивности хемилюминесценции.

Результаты экспериментов

Прежде всего была определена оптимальная концентрация водного раствора люминола. Для этого была измерена хемилюминесценция в чипе без наночастиц в щелочной среде с $\text{pH} = 12$, при которой хемилюминесценция достаточно велика для уверенной регистрации при малой концентрации окислителя, равной $100\ \mu\text{M}$. При увеличении концентрации люминола вплоть до $0.3\ \text{mM}$ интенсивность хемилюминесценции растет. Однако при больших концентрациях люминола наблюдается насыщение, а затем уменьшение интенсивности хемилюминесценции. Дальнейшие эксперименты проводились при концентрации люминола $0.3\ \text{mM}$.

Усиление хемилюминесценции люминола под влиянием серебряных наночастиц представляет наибольший интерес в нейтральных условиях при $\text{pH} = 7$, когда интенсивность излучения без наночастиц при малой концентрации окислителя падает до уровня шумов. На рис. 4 представлены результаты измерений интенсивности хемилюминесценции люминола в микрофлюидных каналах без наночастиц и с серебряными наночастицами, полученными описанным выше способом. Видно, что, несмотря на значительный разброс в результатах измерений, интенсивность хемилюминесценции в чипах с серебряными наночастицами больше, чем в чипах без серебряных наночастиц.

Обсуждение результатов

Усиление хемилюминесценции люминола в чипе с серебряными наночастицами составило в среднем 50%. На первый взгляд эта величина невелика, так как, следуя теоретическим расчетам [20] и численному моделированию [21], на малых расстояниях от металлических наночастиц, обладающих плазмонным резонансом в полосе излучения возбужденных продуктов реакции окисления люминола, можно было ожидать ускорения радиационных переходов и соответствующего увеличения интенсивности хемилюминесценции в десятки раз. Согласно [22], усреднение фактора Парселла по ориентациям излучателя эквивалентно усреднению по поляризациям падающего излучения, так что результаты [21] можно использовать и для оценки среднего фактора Парселла. Однако геометрия микрофлюидного чипа такова, что лишь небольшая доля возбужденных молекул находится на таких расстояниях от металлических наночастиц, которые сравнимы с их размерами, а при удалении излучателя от наночастицы фактор Парселла быстро убывает. Действительно, глубина каналов изготовленных микрочипов в области регистрации излучения составляла $10\ \mu\text{m}$. Поскольку размеры серебряных наночастиц и расстояния между ними после отжига составляют

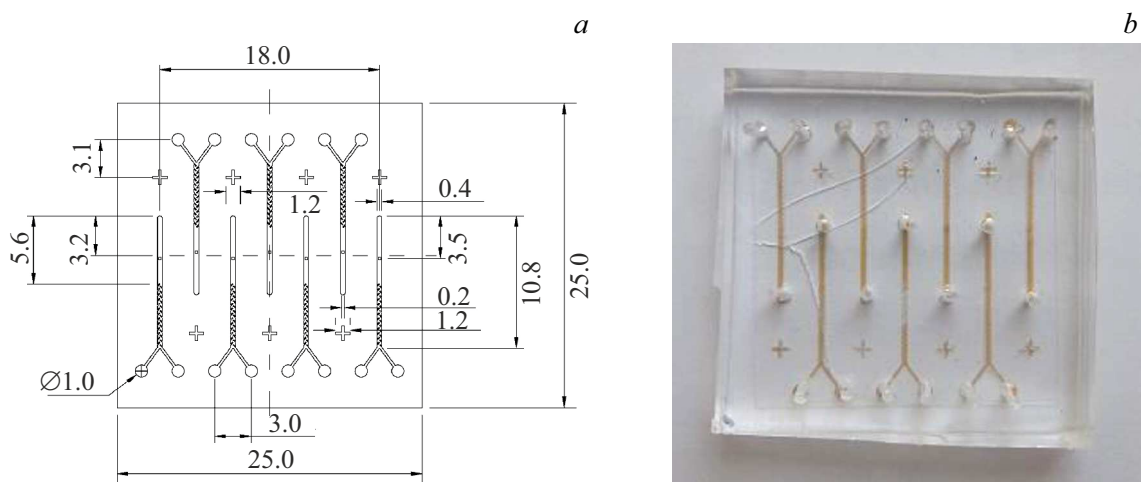


Рис. 3. Дизайн и фотография микрофлюидного чипа с семью независимыми каналами, использованного для исследования хемилюминесценции. Каждый канал имеет два ввода для подачи хемилюминофора и окислителя и один выход для отработанной смеси. На фотографии виден миксер в виде змейки, в котором происходит интенсивное перемешивание хемилюминофора и окислителя.

порядка 100 nm [14], примерно сотая доля излучающих молекул находится на оптимальном расстоянии от поверхности, покрытой наночастицами. Дальнейшее сокращение глубины канала ограничено возрастающим гидродинамическим сопротивлением, требующим увеличения давления жидкости, которое, в свою очередь, ограничено пределом прочности соединения частей микрофлюидной системы. Уменьшение глубины канала ограничено также точностью изготовления мастер-формы для мягкой литографии, с помощью которой была изготовлен чип из PDMS. В указанных условиях обнаруженная величина усиления хемилюминесценции люминола в среднем на 50 % представляется соответствующей условиям наблюдения.

Заключение

Использование специально разработанной микрофлюидной системы позволило наблюдать хемилюминесценцию люминола в контролируемых и воспроизводимых условиях. Покрытие дна микрофлюидных каналов серебряными наночастицами, обладающими плазмонным резонансом в полосе хемилюминесценции люминола, привело к возрастанию интенсивности хемилюминесценции при окислении в нейтральной среде с $\text{pH} = 7$, что наиболее актуально для биомедицинских применений, в среднем на 50 %.

Финансирование работы

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

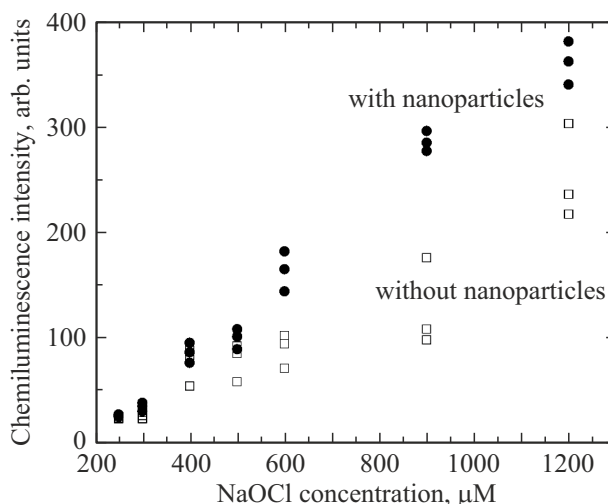


Рис. 4. Увеличение интенсивности хемилюминесценции люминола в микрофлюидных чипах с нанесенной на дно канала серебряной пленкой. Интенсивность хемилюминесценции в каналах без серебряной пленки показана открытыми квадратиками, а интенсивность хемилюминесценции в каналах с нанесенной на дно канала серебряной пленкой — заполненными кружками. Концентрация люминола 0.3 mM, $\text{pH} = 7$.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Irie, T. Enomoto, H. Kubota, Y. Ohmiya, H. Akiyama. *Photochem. Photobiol.*, **83** (5), 1205 (2007). DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00140.x

- [2] A.F. Koenderink. *Opt. Lett.*, **35** (24), 4208 (2010). DOI: 10.1364/OL.35.004208
- [3] V. Chandrakala, V. Aruna, G. Angajala. *Emergent Materials*, **5** (6), 1593–1615 (2022). DOI: 10.1007/S42247-021-00335-X
- [4] M. Kim, J.H. Lee, J.M. Nam. *Advanced Sci.*, **6** (17), 1900471 (2019). DOI: 10.1002/ADVS.201900471
- [5] T. Liu, Y. Song, Z. Huang, X. Pu, Y. Wang, G. Yin, L. Gou, J. Weng, X. Meng. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **207**, 112023 (2021). DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2021.112023
- [6] Y. Gao, Y. Zhou, R. Chandrawati. *ACS Appl. Nano Mater.*, **3** (1), 1–21 (2020). DOI: 10.1021/ACSANM.9B02003
- [7] H. Yang, W. Xu, Y. Zhou. *Microchimica Acta*, **186** (12), 1–22 (2019). DOI: 10.1007/S00604-019-3904-9
- [8] H. Malekzad, P. Sahandi Zangabad, H. Mirshekari, M. Karimi, M.R. Hamblin. *Nanotechnol. Rev.*, **6** (3), 301–329 (2017). DOI: 10.1515/NTREV-2016-0014
- [9] D.R. Dadadzhyanov, I.A. Gladskikh, M.A. Baranov, T.A. Vartanyan, A. Karabchevsky. *Sens Actuators B Chem.*, **333**, 129453 (2021). DOI: 10.1016/J.SNB.2021.129453
- [10] G.A. Sotiriou. *Wiley Interdiscip. Rev. NanomedNanobiotechnol.*, **5** (1), 19–30 (2013). DOI: 10.1002/WNAN.1190
- [11] F. Jiang, P. Li, Ch. Zong, H. Yang. *Analytica Chimica Acta*, **1114**, 58–65 (2020).
- [12] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz. *J. Phys. Chem. B.*, **107** (3), 668–677 (2003). DOI: 10.1021/JP026731Y
- [13] M.H. Chowdhury, K. Aslan, S.N. Malyn, J.R. Lakowicz, Ch.D. Geddes. *Appl. Phys. Lett.*, **88** (17), 173104 (2006). DOI: 10.1063/1.2195776
- [14] Н.Б. Леонов, И.А. Гладских, В.А. Полищук, Т.А. Варганиян. *Опт. спектр.*, **119** (3), 116–121 (2015). [N.B. Leonov, I.A. Gladskikh, V.A. Polishchuk, T.A. Vartanyan. *Opt. Spectrosc.*, **119** (3), 450–455 (2015). DOI: 10.1134/S0030400X15090179].
- [15] T.A. Vartanyan, N.B. Leonov, S.G. Przhibel'skii. *Opt. Quant. Electr.*, **49**, 127 (2017). DOI: 10.1007/s11082-017-0969-8
- [16] А.А. Евстапов. *Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, **55** (2), 99–110 (2011).
- [17] K. Ward, Z.H. Fan. *J. Micromech. Microeng.*, **25** (9), 094001 (2015).
- [18] Ch.-Y. Lee, Ch.-L. Chang, Y.-N. Wang, L.-M. Fu. *Int. J. Mol. Sci.*, **12** (5), 3263–3287 (2011).
- [19] А.С. Букатин, И.С. Мухин, Е.И. Мальшев, И.В. Кухтевич, А.А. Евстапов, М.В. Дубина. *ЖТФ*, **86** (10), 125–130 (2016).
- [20] В.В. Климов. *Наноплазмоника* (Физматлит, М., 2009). [V. Klimov. *Nanoplasmonics* (Taylor & Francis Group, LLC, 2013). DOI: 10.1201/b15442].
- [21] Д.Р. Дададжанов, А.В. Палехова, Т.А. Варганиян. *Опт. и спектр.*, **131** (12), 1726–1730 (2023). DOI: 10.61011/OS.2023.12.57410.5850-23 [D.R. Dadadzhyanov, A.V. Palekhova, T.A. Vartanyan. *Opt. Spectrosc.*, **131** (12), 1646–1650 (2023). DOI: 10.21883/0000000000].
- [22] S.I. Maslovski, C.R. Simovski. *Nanophotonics*, **8** (3), 429–434 (2019). DOI: 10.1515/nanoph-2018-0190