

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ АВТООКИСЛЕНИИ ЛЮМИНОЛА
В ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДЕ. КИНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЩЕЛОЧЕЙ,
ТУШЕНИЕ НИТРОСИНИМ ТЕТРАЗОЛИЕМ И СНЯТИЕ ТУШЕНИЯ
ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА© 2020 г. Ю. Б. Цаплев^{a,*}, А. В. Трофимов^{a,b,**}^a Российская академия наук, Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля, 119334 Москва, Россия^b Московский физико-технический институт, 141701, Долгопрудный Московской области, Россия

*e-mail: tsap_04@mail.ru

**e-mail: avt_2003@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 28.02.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Определены условия и способы замедления (ингибирования), тушения и последующего разжигания хемилюминесценции люминола в щелочном азириванном диметилсульфоксиде. Получены данные, свидетельствующие о ключевой роли переноса электрона с дианиона люминола на кислород в автоокислении и хемилюминесценции люминола в этих условиях.

Ключевые слова: хемилюминесценция, автоокисление, люминол, ионные пары, нитросиний тетразолий, супероксид-анион

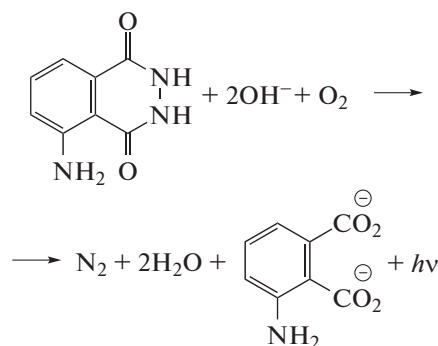
DOI: 10.31857/S0044453720110308

Многие хемилюминесцентные реакции в жидкой фазе идут при автоокислении, когда их иницирование и протекание обусловлено растворенным кислородом. Однако молекула кислорода в триплетном состоянии очень медленно взаимодействует с субстратом в синглетном состоянии (например, бимолекулярная константа скорости взаимодействия O_2 с анионом люминола равна $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [1]).

С началом использования в органической химии диметилсульфоксида (ДМСО) было обнаружено, что процессы автоокисления протекают в щелочном ДМСО значительно быстрее, чем в воде (см. [2] и ссылки там). Щелочной ДМСО использовали в качестве тестовой окислительной системы при поиске хемилюминесценции у многих органических соединений, например, у индолов [3]. Тем не менее, причина быстрого автоокисления (и хемилюминесценции) осталась нераскрыта по сей день.

Свечение люминола в щелочном ДМСО было описано Эмилем Уайтом в [4]. Исследованию этой реакции, которую для краткости будем называть реакцией Уайта, посвящены работы [5–12]. Они выполнены четырьмя группами исследователей. В работе [5] замечено, что хемилюминесценция наблюдается только из растворов люминола, которые содержат чуть более одного моля

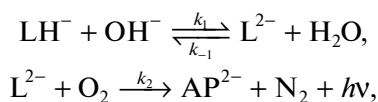
основания на моль люминола. На окисление одного моля люминола расходуется моль кислорода и два моля щелочи, а продуктами реакции являются азот, вода и 3-аминофталат. Было доказано, что два атома кислорода в молекуле аминофталата берутся от растворенного кислорода. Формально реакция Уайта записывается следующим образом:



Независимое варьирование начальной концентрации люминола, щелочи и кислорода выявило первый порядок реакции по каждому из реагентов [5]. Это не было подтверждено (ни в [5], ни в последующих публикациях) фактическими данными. Но была предложена кинетическая схема реакций (схема 1), в соответствии с которой, при $k_{-1}[\text{H}_2\text{O}] \gg k_2[\text{O}_2]$, интенсивность ХЛ пропорциональна в

квазистационарном приближении концентрациям аниона люминола, щелочи и кислорода.

схема 1



где LH^- , L^{2-} , AP^{2-} – моно и дважды депротонированные формы люминола и 3-аминофталевой кислоты,

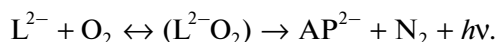
$$i \sim w = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} [\text{H}_2\text{O}]} [\text{LH}^-] [\text{OH}^-] [\text{O}_2],$$

i – интенсивность хемилюминесценции, w – скорость реакции.

В [6] было предположено, что эмиттером реакции является 3-аминофталат, испускающий свет из электронно-возбужденного синглетного состояния. В работах Ли и Селигера [7–9] был определен квантовый выход и получены спектры хемилюминесценции для нескольких реакций, в том числе для реакции Уайта, для которой он равен 0.012 Эйнштейн/моль. Было установлено, что эмиттером служит 3-аминофталат.

В работе [9] была получена зависимость квантового выхода хемилюминесценции ($\Phi_{\text{хл}}$) люминола от концентрации воды в щелочном ДМСО. Оказалось, что $\Phi_{\text{хл}}$ увеличивается по мере снижения концентрации воды, достигает максимума при концентрации 0.63 моль/л, ниже которой вода не влияет на $\Phi_{\text{хл}}$. Однако вода влияет на кинетику хемилюминесценции, например, при увеличении концентрации воды от 0 до 0.14 моль/л максимальная интенсивность хемилюминесценции снижается в 3 раза [10, 11].

Авторы [12], исследуя влияние концентрации кислорода на интенсивность хемилюминесценции в смеси ДМСО/EtOH, показали, что вместо линейной зависимости, ожидаемой на основе схемы 1, имеет место зависимость с насыщением. И они предположили, что стадия взаимодействия дианиона люминола с кислородом – равновесное образование аддукта ($\text{L}^{2-} \cdot \text{O}_2$):



Для реакции Уайта не было найдено ингибиторов или тушителей хемилюминесценции. Известно лишь, что тушители триплетов, включая кислород, дифенилкетон, ацетофенон, диацетил, пирен, антрацен и иодид, а также перехватчики свободных радикалов, не влияют на хемилюминесценцию в концентрации до 1 мМ [9]. Реакция Уайта, будучи наиболее простой и доступной хемилюминесцентной реакцией, пока не нашла

практических применений, причина этого, вероятно, в отсутствии “инструментов” влияния на нее. Их поиск – задача данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали следующие реактивы: диметилсульфоксид квалификации “для спектроскопии”, LiOH, NaOH, KOH, люминол, пероксид водорода (30%) – “х.ч.”, хлорид нитросинего тетразолия – “ч.д.а.”.

Кинетику хемилюминесценции исследовали на двухканальном хемилюминометре, собранном на основе двух фотоприемных модулей Н7360-1 и Н7360-2 (Hamamatsu, Япония), счетчика CNT-202 (Спецприбор, Беларусь) и компьютера. Хемилюминометр регистрировал свет в двух спектральных интервалах: 430–490 и 480–560 нм. Схема хемилюминометра описана в [13].

В качестве реакционных сосудов использовали полипропиленовые микропробирки объемом 2 мл, в которых смешивали растворы реагентов. Обычно к 600 мкл ДМСО со щелочью (LiOH, NaOH или KOH) в концентрации 1–5 мМ и (по условиям опыта) пероксидом водорода добавляли посредством светоизолированного инжектора 50 мкл раствора люминола или люминола с нитросиним тетразолием в ДМСО. Реакционная смесь в микропробирке имела небольшую площадь контакта с воздухом и сравнительно большой объем, что затрудняло нейтрализацию щелочи углекислым газом из воздуха и обеспечивало стабильность концентрации щелочи в течение 10–20 мин.

При регистрации выхода света в реакции люминола с раствором LiOH реагенты смешивали вне кюветного отделения, после чего реакционный сосуд закрывали пробкой и помещали в кюветное отделение хемилюминометра.

Электронные спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Lambda 25 (“Perkin-Elmer”, США). При работе с растворами в щелочном ДМСО использовали литую кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см, кювету герметично закрывали притертой пробкой.

Концентрации реагентов далее указаны как начальные концентрации в реакционной смеси.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Щелочной ДМСО и люминол

Анионы с локализованным зарядом (HO^- , $t\text{-BuO}^-$) в воде дают прочные водородные связи, а в биполярных апротонных растворителях они не стабилизированы водородными связями и энергично вступают в реакции нуклеофильного замещения, присоединения и депротонирования [14]. Депротонирование люминола – важная стадия в

рассматриваемой хемилюминесцентной реакции. Первая константа ионизации люминола (pK_{a1}) равна 6.7, и в большинство хемилюминесцентных реакций в водных средах люминол входит в виде моноаниона. Вторая константа ионизации люминола $pK_{a2} = 15.1$ (при ионной силе 5 [15]), и для перевода люминола в дважды депротонированную форму требуется суперосновная среда, например, щелочной ДМСО.

Химическая активность щелочей в ДМСО зависит от гидратации присутствующей в растворе водой и от ассоциации в ионные пары, которая определяется катионом щелочного металла. Константы ассоциации аниона HO^- с ионами K^+ , Na^+ и Li^+ в ДМСО равны соответственно 1400, 50 000 и 790 000 M^{-1} [14], вследствие чего эффект образования ионных пар проявляется даже для разбавленных растворов.

Сравним эффективность возбуждения хемилюминесценции люминола в ДМСО в зависимости от вида щелочи. На рис. 1 в полулогарифмическом масштабе представлены кинетические кривые свечения при добавлении порции раствора люминола к ДМСО, содержащему KOH , NaOH или LiOH . Видим, что наиболее быстро реакция происходит в присутствии KOH , заметно медленнее в присутствии NaOH и совсем медленно с LiOH . В присутствии KOH почти весь свет излучается за 100 с, а в присутствии NaOH — за 500 с. Для регистрации выхода света в присутствии LiOH потребовалось более 24 ч. При этом квантовый выход хемилюминесценции люминола в присутствии LiOH составил $\sim 40\%$ от квантового выхода в присутствии KOH и NaOH , где он был одинаков. Из этого следует, что различия эффективности возбуждения хемилюминесценции люминола в ДМСО в присутствии KOH и NaOH отсутствуют, а в присутствии LiOH они не столь значительны, как это можно было бы ожидать. Однако имеются явные различия в кинетике выхода света даже для реакций, проводимых в растворах KOH и NaOH . Эти различия могут быть связаны с различием в константах ассоциации аниона HO^- с катионами.

Образование ионной пары из аниона HO^- и катиона M^+ описывается равновесием: $\text{HO}^- + \text{M}^+ \leftrightarrow \text{HO}^-\text{M}^+$. Концентрацию “свободного” гидроксид-иона¹ ($[\text{HO}^-]_f$) легко найти, зная константу ассоциации K и общую концентрацию гидроксид-иона в растворе (B):

$$[\text{HO}^-]_f = 0.5[-K^{-1} + (K^{-2} + 4BK^{-1})^{0.5}]. \quad (1)$$

Изменение концентрации $[\text{HO}^-]_f$ происходит не только при изменении концентрации гидроксид-

¹ С учетом того, что константа гидратации гидроксид-иона более 1600 M^{-1} , молекула воды сопровождает и “свободный” (не входящий в ионную пару) гидроксид-ион.

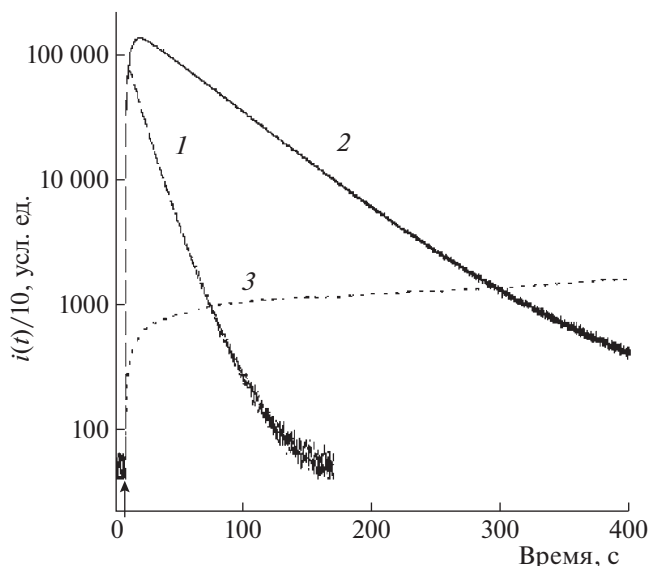


Рис. 1. Кинетика хемилюминесценции люминола в щелочном ДМСО. Условия: концентрация KOH (1) и NaOH (2) — 4.6 мМ, LiOH (3) — 7.7 мМ, концентрация люминола 0.77 (1), 7.7 (2) и 77 (3) нмоль/л.

да, но и при добавлении соли MX . Концентрацию $[\text{HO}^-]_f$ в растворе, который содержит MOH и соль MX в концентрации S , дает формула:

$$[\text{HO}^-]_f = 0.5\{-(K^{-1} + S) + [(K^{-1} + S)^2 + 4BK^{-1}]^{0.5}\}. \quad (2)$$

В соответствии с (1), концентрация $[\text{HO}^-]_f$ при $B = 4.6 \text{ мМ}$ в растворах KOH и NaOH равна 1.5 и 0.3 мМ соответственно, и, следовательно, скорость депротонирования люминола в KOH в 5 раз выше, чем в NaOH .

Влияние добавок NaI и KI к растворам NaOH и KOH на кинетику хемилюминесценции показано на рис. 2. Видим, что увеличение концентрации NaI в растворе NaOH и концентрации KI в растворе KOH сопровождается замедлением реакции и снижением максимальной интенсивности хемилюминесценции. Но NaI и KI играют роль не тушителей, а ингибиторов, поскольку интенсивность излучения в реакции остается практически постоянной. На кинетических кривых видно, что интенсивность хемилюминесценции после перехода через максимум экспоненциально снижается. В качестве измеряемого параметра была взята константа спада кинетических кривых (k_d).

Варьирование концентрации KI в KOH и NaI в NaOH приводит к симбатному изменению k_d и концентрации $[\text{HO}^-]_f$, вычисленной по (2). На графике (рис. 3) точки 1, полученные при варьировании концентрации NaI в NaOH , и точки 2, полученные при варьировании концентрации KI в KOH , ложатся на одну прямую, и, следовательно,

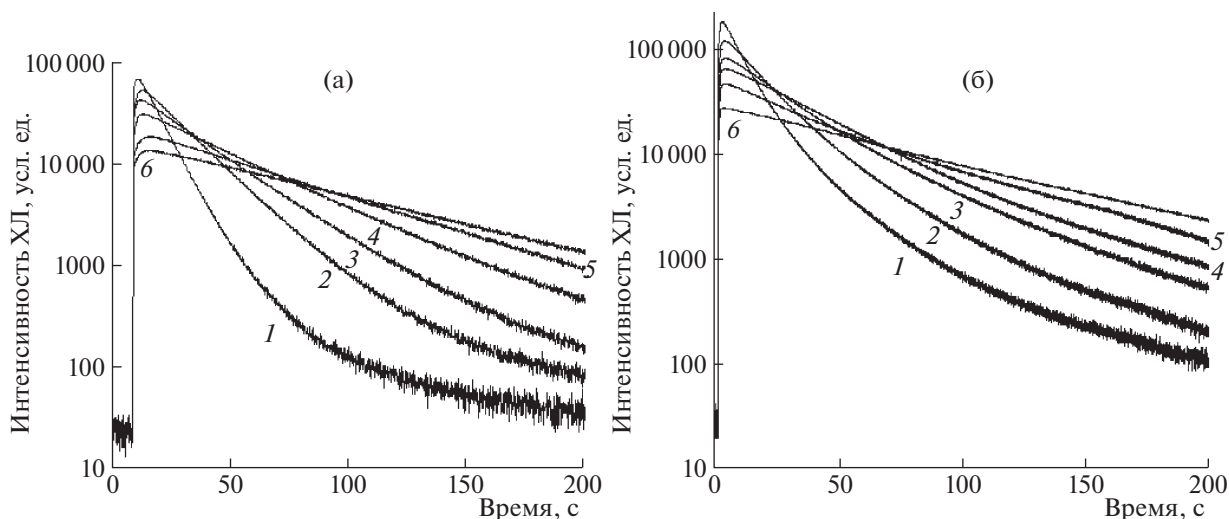


Рис. 2. Ингибирование хемилюминесценции люминола в присутствии KOH добавками KI (а) и в присутствии NaOH добавками NaI (б). Начальная концентрация люминола 0.77 нМ в растворе KOH и 7.7 нМ в растворе NaOH. Концентрации щелочи 3 мМ. Концентрация KI: 0 (1), 1.5 (2), 3 (3), 6 (4), 12 (5) и 24 (6) мМ. Концентрация NaI: 0 (1), 0.38 (2), 0.77 (3), 1.5 (4), 3.1 (5) и 6.2 (6) мМ. Концентрация H₂O в ДМСО – 0.17 М.

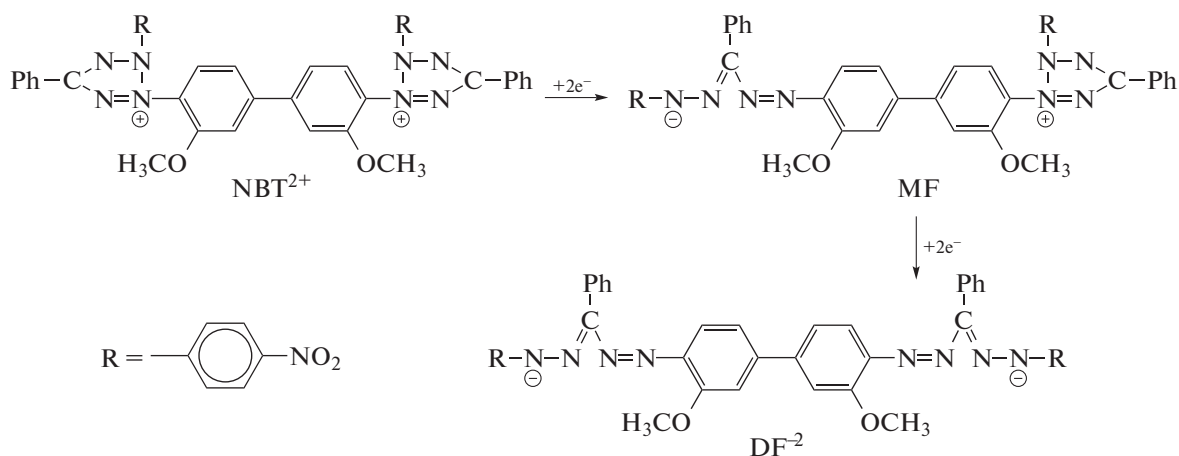
но, величина k_d пропорциональна концентрации $[\text{HO}^-]_f$. Формально это соответствует схеме 1. Значение k_d не зависит от типа щелочи, а определяется величиной $[\text{HO}^-]_f$. Как легко видеть из (1), первый порядок реакции по концентрации щелочи, который был декларирован в [5], возможен лишь при $4VK \ll 1$.

Выше описано влияние солей, содержащих тот же катион, что и щелочь. Но и добавление солей лития к щелочному ДМСО, содержащему, например, KOH, приводит к замедлению реакции и снижению максимальной интенсивности хеми-

люминесценции. Такой эффект может быть использован для определения лития в неводных растворах.

Нитросиний тетразолий и люминол

Нитросиний тетразолий (NBT^{2+}) – хорошо известный хромогенный реагент на супероксид-анион [16, 17]. Структурные формулы NBT и стабильных продуктов его восстановления: моноформаза (MF) и диформаза (DF^{2-}) показаны ниже:



В работе [18] предложен способ спектрофотометрического определения супероксида с использованием раствора NBT в ДМСО. NBT переходит в MF при концентрации супероксида,

меньшей или равной удвоенной концентрации NBT, максимум поглощения MF в ДМСО расположен около 680 нм. При концентрации супероксида, превышающей учетверенную концентра-

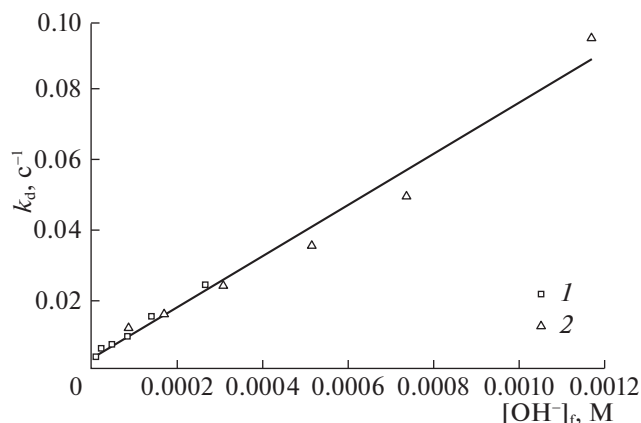


Рис. 3. Зависимость k_d от концентрации “свободного” гидроксид-иона; 1 – точки, полученные при варьировании концентрации NaI в NaOH, 2 – при варьировании концентрации KI в KOH.

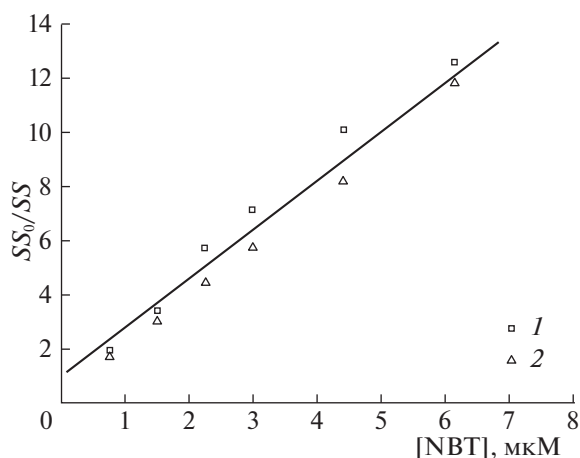


Рис. 5. Эффект тушения хемилюминесценции люминола в щелочном ДМСО от концентрации NBT; SS_0/SS – отношение выхода света в реакции в отсутствие и в присутствии NBT. Начальная концентрация люминола – 7.7 (1) и 31 нМ (2). Концентрация NaOH в ДМСО – 3 мМ.

цию NBT, весь NBT превращается в DF^{2-} , максимум поглощения которого – около 730 нм.

Известно, однако, что нитросиний тетразолий в ДМСО в присутствии NaOH или KOH превращается в моноформазан, но не в диформазан [19, 20]. На рис. 4 показан спектр NBT в щелочном ДМСО и спектры, полученные при добавлении к щелочному ДМСО раствора, содержащего NBT и люминол. Видна эволюция спектров: от спектра, характерного для MF в отсутствие люминола, к спектру, характерному для DF по мере увеличения отношения концентраций люминола и NBT. Образование диформазана в присутствии люминола свидетельствует о том, что в аддукте диани-

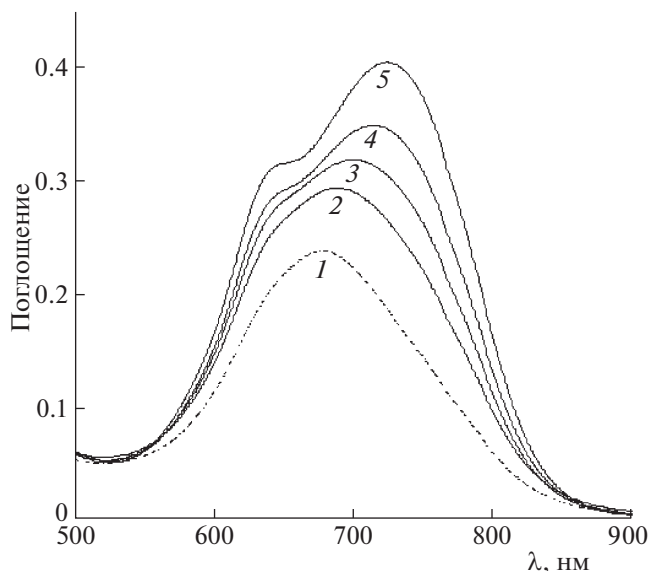


Рис. 4. Спектр NBT в щелочном ДМСО в отсутствие (1) и в присутствии (2–4) люминола. Концентрация NBT 4 мкМ, отношение концентраций люминол/NBT: 0.5 (2), 1 (3), 2 (4) и 4 (5), концентрация NaOH 1 мМ.

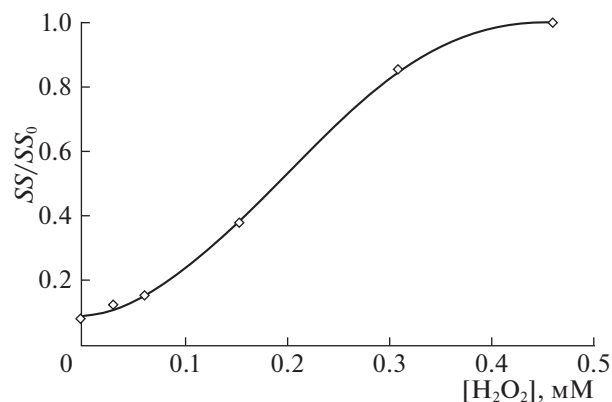


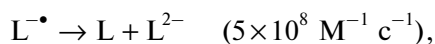
Рис. 6. Разжигание хемилюминесценции в присутствии NBT посредством пероксида водорода; SS_0 – выход света в отсутствие NBT и пероксида водорода. Концентрация NBT – 6 мкМ, люминола – 7.7 нМ, NaOH – 3 мМ.

он люминол – кислород ($L^{2-} O_2$), постулированном Бекем и Иу, происходит перенос электрона на кислород с образованием супероксид-аниона и анион-радикала люминола ($L^{\bullet-}$).

Взаимодействие между $L^{\bullet-}$ и $O_2^{\bullet-}$ изучено ранее [1, 21], оно характеризуется бимолекулярной константой скорости, равной $2.3 \times 10^8 M^{-1} c^{-1}$, и приводит к образованию пероксида (LO_2H^- , LO_2^{2-}), играющего главную роль в хемилюминесценции люминола. Можно предположить, что удаление супероксид-аниона посредством NBT, должно приводить к тушению хемилюминесценции в реакции Уайта. И это действительно так. На

рис. 5 в координатах Штерна–Фольмера показана зависимость выхода света в реакции от концентрации NBT. Видно, что NBT является эффективным тушителем, который оказывает заметное действие уже в концентрации менее 1 мкМ, и это единственный (известный сейчас) тушитель в реакции Уайта, действующий в такой концентрации.

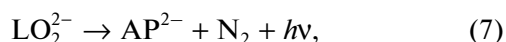
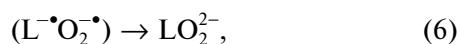
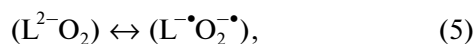
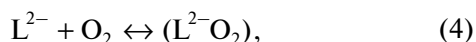
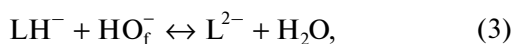
Когда супероксид удаляется из реакции (в данном случае посредством NBT), маршрут расходования люминола изменяется. Анион-радикал люминола быстро диспропорционирует на диазахинон (L) и L^{2-} [21]. Далее диазахинон “гибнет” в реакции с гидроксид-ионом [21]. Вернуть диазахинон на световой путь превращений можно с помощью пероксида водорода, в реакции с которым вновь получается пероксид LO_2H^- , LO_2^{2-} . Указанные реакции с константами скоростей представлены ниже [21]:



Отсюда следует, что для возврата половины образующегося диазахинона на световой путь при концентрации HO^- около 3 мМ требуется пероксид водорода в концентрации 0.24 мМ. На рис. 6 представлены данные о восстановлении выхода света в реакции в присутствии NBT посредством пероксида водорода. Видно, что при достаточно высокой концентрации пероксида водорода тушение, вызванное NBT, полностью снимается. Восстановление выхода света до уровня 50% наблюдается при концентрации пероксида водорода около 0.22 мМ, что близко к расчетной оценке.

Схема реакций

Схема реакций, которая включает уточнение, сделанное Бекон и Иу, и свидетельство образования супероксид аниона и анион-радикала люминола, полученное в данной работе, может быть представлена следующим образом:



где HO_f^- – гидроксид-анион, не входящий в ионную пару. Продукт реакции (5) обозначен в скобках, поскольку предполагаем, что он является,

как и $(L^{2-}O_2)$, аддуктом. В ДМСО разделение зарядов в аддукте $(L^{2-}O_2)$ с образованием $(L^{\bullet}O_2^{\bullet})$ – энергетически выгодный процесс. Как только энергетический выигрыш исчезает, что имеет место при достаточно высокой концентрации в ДМСО растворителя, дающего прочные водородные связи с анионами (вода, спирт), разделения зарядов в реакции (5) не происходит, и хемилюминесценция по маршруту (3)–(7) отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать следующие выводы.

1. За депротонирование люминола в щелочном ДМСО отвечает сильноосновный гидроксид-анион. Катионы щелочных металлов образуют с гидроксид-анионом ионные пары и играют роль ингибиторов хемилюминесценции в реакции Уайта. Кинетика хемилюминесценции в реакции определяется концентрацией гидроксид-аниона, не входящего в ионную пару.

2. Взаимодействие дианиона люминола с растворенным кислородом приводит к аддукту, в котором происходит перенос электрона на кислород с образованием анион-радикала люминола и супероксид анион-радикала. Супероксид анион-радикал обнаружен по реакции с нитросиним тетразолием. Хемилюминесценция в реакции Уайта эффективно тушится нитросиним тетразолием.

3. Тушение хемилюминесценции, вызванное нитросиним тетразолием, снимается пероксидом водорода, что подтверждает вывод об образовании анион-радикала люминола, поскольку последний диспропорционирует в диазахинон, который хемилюминесцирует в реакции с пероксидом водорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта № 19-53-18019 Болг_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merényi G., Lind J., Shen X., Eriksen T.E. // J. Phys. Chem. 1990. V. 94. № 2. P. 748.
2. Паркер А. Применение полярных апротонных растворителей в органической химии. В кн. Успехи органической химии. Т. 5. М.: Мир, 1968. С. 5–50. / Пер. с англ. Advances in Organic Chemistry. Methods and results. V. 5. Ed-s: Raphael R.A., Taylor E.C., Wynberg H. N.Y.; London; Sydney: Intersci. Publ., 1965.
3. Васильев Р.Ф., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б. // Успехи химии. 2010. Т. 79. № 2. С. 91. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n02ABEH004064>
4. White E.H. // J. Chem. Education. 1957. V. 34. № 6. P. 275.

5. *White E.H., Zafiriou O., Kagi H., Hill J.* // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 5. P. 940.
6. *White E.H., Burcey M.M.* // Ibid. 1964. V. 86. № 5. P. 941.
7. *Lee J., Seliger H.H.* // Photochem. Photobiol. 1965. V. 4. № 6. P. 1015.
8. *Lee J., Seliger H.H.* // Ibid. 1970. V.11. № 4. P. 247.
9. *Lee J., Seliger H.H.* // Ibid. 1972. V. 15. № 2. P. 227.
10. *Gorsuch J.D.* Studies of the Chemiluminescence of Luminol / MIT Ph.D. Thesis (1969). <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/52931>
11. *Gorsuch J.D., Hercules D.M.* // Photochem. Photobiol. 1972. V. 15. № 6. P. 567.
12. *Beck M.T., Joó F.* // Ibid. 1972. V. 16. № 6. P. 491.
13. *Цаплев Ю.Б., Васильев Р.Ф., Трофимов А.В.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 7.
14. *Трофимов Б.А., Васильцов А.М., Амосова С.В.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 4. С. 751.
15. *Нааракка К.Е., Канкаре J.J., Linke J.A.* // Anal. Chim. Acta. 1982. V. 139. P. 379.
16. *Auclair C., Voisin E.* // Handbook of methods for oxygen radical research. Ed. by R.F. Greenwald. Boca Raton: CRC Press, 1985. P. 123–132.
17. *Науван М., Hashim M.A., AlNashef I.M.* // Chem. Rev. 2016. V. 116. № 5. P. 3029.
18. *Liu R.H., Fu S.Y., Zhan H.Y., Lucia L.A.* // Ind. Eng. Chem. Res. 2009. V. 48. № 20. P. 9331.
19. *Umemoto K., Okamura N.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1986. V. 59. № 10. P. 3047.
20. *Umemoto K., Nagase Y., Sasaki Y.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1994. V. 67. № 12. P. 3245.
21. *Merényi G., Lind J., Eriksen T.E.* // J. Biolum. Chemilum. 1990. V. 5. № 1. P. 53.