

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

УДК 535.37

СОВМЕСТНАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЛОФИНА И ЛЮМИНОЛА  
В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ГЕМИНА

© 2020 г. Ю. Б. Цаплев<sup>1\*</sup>, Р. Ф. Васильев<sup>1</sup>, В. Д. Кънчева<sup>2</sup>, А. В. Трофимов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт органической химии с центром фитохимии Болгарской академии наук, София, Болгария

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

\*E-mail: tsap\_04@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2019;

после доработки 23.10.2019;

принята в печать 20.11.2019

Посредством спектрально-кинетической регистрации исследована совместная хемилюминесценция люминола и лофина, инициируемая активными частицами, которые генерируются при разложении пероксида водорода геминном.

*Ключевые слова:* хемилюминесценция, люминол, лофин, гемин, спектрально-кинетическая регистрация.

DOI: 10.31857/S0207401X20060114

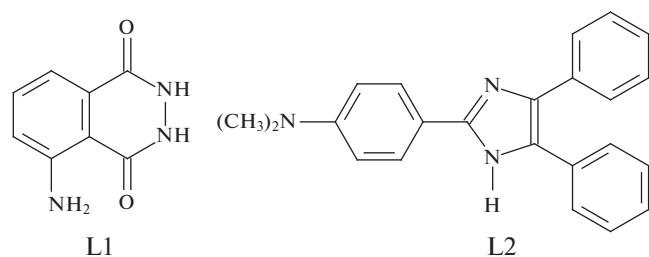
ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений использования хемилюминесценции и хемилюминофоров, ставшим к настоящему времени классическим, является определение антиоксидантной способности различных веществ [1–14]. Для этого конструируется химическая модельная система, в которой генерируются химически активные частицы и происходит окисление хемилюминофора. Реакции интермедиатов или продуктов окисления приводят к возникновению хемилюминесценции (при необходимости усиления свечения вводят соответствующие люминофоры [13, 14]). Введение в систему веществ, которые конкурируют с хемилюминофором за химически активные частицы, сопровождается тушением хемилюминесценции с последующим ее разгоранием по мере расходования конкурента. При работе с антиоксидантами в слабополярных средах хорошо зарекомендовала себя химическая система, в которой радикалы генерируются при термолитазе азо(бис)изобутиронитрила и исследуется влияние испытуемых соединений на оксихемилюминесценцию углеводорода (например, этилбензола) в растворе хлорбензола [2–9, 11–13]. Для работы в водных средах неоднократно предлагалась модельная окисляющая система на основе пероксида и гемина [15], пероксидазы [16, 17] или цитохрома *c* [18] с люминолом в качестве индикаторного хемилюминофора. Как это ни странно, первая из этих систем (т.е. гемин–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) является значительно более сложной, чем другие.

Это связано с многообразием форм гемина в растворе, нестабильностью растворов, изменением активности (в частности, пероксидазно-окислительной активности) под влиянием аксиальных лигандов, зависимостью активности от формы гемина в растворе [19–23].

Важно отметить, что в ряде случаев после введения испытуемого соединения наблюдается не полное тушение хемилюминесценции, а лишь тушение до определенного уровня. Это, возможно, указывает на возникновение дополнительных эмиттеров хемилюминесценции. В данной работе моделируется такая двухэмиттерная ситуация в окисляющей системе на основе гемина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В качестве инструмента исследования была использована спектрально-кинетическая регистрация хемилюминесценции.

Спектрально-кинетическая регистрация была ранее предложена для получения спектральной и кинетической информации при исследовании хемилюминесцентных реакций с двумя эмиттерами. Она основана на регистрации хемилюминесценции по двум спектральным каналам посредством двухканального хемилюминометра, в каналах которого установлены полосовые оптические фильтры с различной полосой пропускания [24–27]. Например, в одном канале расположен полосовой оптический фильтр, пропускающий свет в синей области спектра, а в другом – в зеленой. Отношение интенсивностей хемилюминесценции, регистрируемых по синему (*B*) и зеленому (*G*) кана-



**Рис. 1.** Химические структуры хемилуминофоров: люминола (L1) – 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона и производного лофина (L2) – 2-(*n*-диметиламинофенил)-4,5-дифенилимидазола.

лам, определяет величину спектрального отношения  $\delta = B/G$ . В присутствии только одного хемилуминофора величина  $\delta$  имеет вполне определенное, характерное для него значение. В данной работе в качестве хемилуминофоров были взяты люминол (L1) – 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион и производное лофина (L2) – 2-(*n*-диметиламинофенил)-4,5-дифенилимидазол (рис. 1). Известно, что световые пути превращений и L1, и L2 в сильнощелочной среде схожи между собой [28–31]. Максимум испускания L1 расположен в синей области спектра, а L2 – в сине-зеленой; квантовый выход хемилуминесценции у L2 значительно меньше, чем у L1 [32]. В ходе предварительных опытов было установлено, что хемилуминесценция в результате окисления активными частицами, образующимися при разложении пероксида водорода геминем в щелочной среде, имеется не только у L1, но и у L2.

В работе показано, что при одновременном присутствии L1 и L2 в реакционной смеси между ними возникает конкуренция за активные частицы, генерируемые геминем и пероксидом водорода. Результатом конкуренции является изменение спектрального отношения  $\delta$  во времени. Анализ этого изменения позволил установить, что скорость окисления L2 в модельной системе во много раз больше скорости окисления L1. В итоге была получена хемилуминесцентная система, содержащая “пробный” хемилуминофор L2 и “индикаторный” хемилуминофор L1, разгорание хемилуминесценции которого возможно лишь после окончания окисления L2, т.е. L2 выступает в качестве антиокислителя в процессе хемилуминесценции L1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы: гемин (98%, “Serva”), гемин свиной (98%, “AppliChem”), диметилсульфоксид (для спектроскопии, “AppliChem”), NaOH (х. ч), люминол (95%, “AppliChem”), 2-(*n*-диметиламинофенил)-4,5-дифенилимидазол (ч, ИРЕА).

**Оборудование.** Кинетику хемилуминесценции исследовали на двухканальном хемилуминометре, собранном на основе двух фотоприемных модулей: H7360-1 и H7360-2 (“Hamamatsu”, Япония), счетчика CNT-202 (Спецприбор, Беларусь) и компьютера. Люминометрическая система регистрировала хемилуминесценцию в двух спектральных каналах. В синем и зеленом каналах были установлены полосовые оптические фильтры, пропускающие свет в областях 430–490 и 480–560 нм соответственно. Пропускание света блокируется вне указанных областей. Средние коэффициенты пропускания фильтров – 0.80 и 0.88. Схема хемилуминометра описана в работах [26, 27].

**Приготовление образцов.** Реакторами служили полипропиленовые микропробирки объемом 2 мл, в которых смешивали растворы реагентов. Обычно к 75 мкл раствора NaOH с концентрацией 0.07 М, содержащего смесь гемина (15 мкМ) и L1 (1.1 мкМ) посредством светоизолированного инжектора добавляли 25 мкл диметилсульфоксида, содержащего смесь L2 и пероксида водорода (100 мкМ). Концентрации L2 и других реагентов далее указаны как их начальные концентрации в реакционной смеси.

**Двухканальная регистрация хемилуминесценции.** Известно, что между интенсивностью хемилуминесценции ( $i$ ), измеряемой в квант/с, и начальной концентрацией хемилуминофора ( $C_0$ ) при условии его полного расходования к концу реакции существует равенство:

$$\int_0^{\infty} i(t) dt = \Phi v C_0, \quad (1)$$

где  $\Phi$  – квантовый выход хемилуминесценции,  $v$  – объем реактора. Поскольку концентрация интермедиатов, которые образуются из хемилуминофора, много меньше концентрации последнего, равенство (1) можно переписать в виде

$$\int_0^t i(t) dt = \Phi v [C_0 - C(t)], \quad (2)$$

где  $t$  – время после начала реакции, а  $C(t)$  – концентрация хемилуминофора в момент времени  $t$ . Дифференцируя (2), получим

$$i(t) = -\Phi v \frac{dC(t)}{dt} = \Phi v w. \quad (3)$$

Это соотношение часто используется для перевода интенсивности хемилуминесценции в скорость расходования хемилуминофора –  $w$  [33, 34].

Следует отметить, что интенсивность хемилуминесценции, регистрируемая фотоприемником,  $I(t) = i(t)\alpha$ , где посредством коэффициента  $\alpha$  учитывается спектральная чувствительность фотоприемника к измеряемому сигналу, геометрические особенности установки и рефракция растворителя. Имеет смысл представить коэффициент  $\alpha$  в виде

произведения спектрального коэффициента  $\alpha_S$  и коэффициента  $\alpha_A$ , в котором учитываются прочие факторы. Спектральный коэффициент  $\alpha_S$  равен

$$\alpha_S = \frac{\int S(\lambda)P(\lambda)F(\lambda)d\lambda}{\int S(\lambda)d\lambda},$$

где  $S(\lambda)$  – спектр хемилюминесценции,  $P(\lambda)$  – спектральная чувствительность фотоприемника,  $F(\lambda)$  – спектр пропускания светофильтра, если он установлен в канале регистрации. Таким образом,

$$I(t) = \Phi v w(t) \alpha_A \alpha_S. \quad (4)$$

В двухканальном люминиметре при наличии одного эмиттера сигналы, регистрируемые в “синем” и “зеленом” спектральных каналах, и спектральное отношение соответственно равны

$$\begin{aligned} B(t) &= \Phi v w(t) \alpha_A \alpha_{SB}, \quad G(t) = \Phi v w \alpha_A \alpha_{SG}, \\ \delta &= B(t)/G(t) = \alpha_{SB}/\alpha_{SG} = \\ &= \frac{\int S(\lambda)P_B(\lambda)F_B(\lambda)d\lambda}{\int S(\lambda)P_G(\lambda)F_G(\lambda)d\lambda}. \end{aligned}$$

Из выражения для  $\delta$  видим, что спектральная чувствительность фотоприемников и спектры пропускания фильтров выполняют роль весовых функций, поэтому двухканальную регистрацию можно сравнить со спектральным взвешиванием.

При наличии двух хемилюминофоров и, соответственно, двух эмиттеров имеем

$$\begin{aligned} B(t) &= B_1(t) + B_2(t), \quad G(t) = G_1(t) + G_2(t), \\ B_1(t) &= \Phi_1 v w_1 \alpha_A \alpha_{SB1}, \quad B_2(t) = \Phi_2 v w_2 \alpha_A \alpha_{SB2}, \\ G_1(t) &= \Phi_1 v w_1 \alpha_A \alpha_{SG1}, \quad G_2(t) = \Phi_2 v w_2 \alpha_A \alpha_{SG2}, \quad (5) \\ B_1/G_1 &= \alpha_{SB1}/\alpha_{SG1} = \delta_1, \\ B_2/G_2 &= \alpha_{SB2}/\alpha_{SG2} = \delta_2, \quad B(t)/G(t) = \delta(t). \end{aligned}$$

Из (5), зная значения  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $B(t)$ ,  $G(t)$ , можно определить величины интенсивностей  $B_i(t)$ ,  $G_i(t)$ , т.е. найти спектрально-кинетические зависимости для каждого люминофора (такая возможность продемонстрирована в работе [26]):

$$\begin{aligned} B_1(t) &= \delta_1 \frac{B(t) - \delta_2 G(t)}{\delta_1 - \delta_2}, \quad B_2(t) = \delta_2 \frac{B(t) - \delta_1 G(t)}{\delta_1 - \delta_2}, \\ G_1(t) &= \frac{B(t) - \delta_2 G(t)}{\delta_1 - \delta_2}, \quad G_2(t) = \frac{B(t) - \delta_1 G(t)}{\delta_1 - \delta_2}. \end{aligned}$$

Кроме того, из (5) можно найти и отношение  $w_2/w_1$ :

$$\frac{w_2(t)}{w_1(t)} = \frac{\Phi_1 \alpha_{SG1} \delta_1 - \delta(t)}{\Phi_2 \alpha_{SG2} \delta(t) - \delta_2}, \quad (6)$$

откуда видно, что регистрация стремления  $\delta(t)$  к  $\delta_1$  указывает на то, что  $w_2 \rightarrow 0$ , а стремление  $\delta(t)$  к  $\delta_2$  указывает на стремление  $w_1$  к нулю.

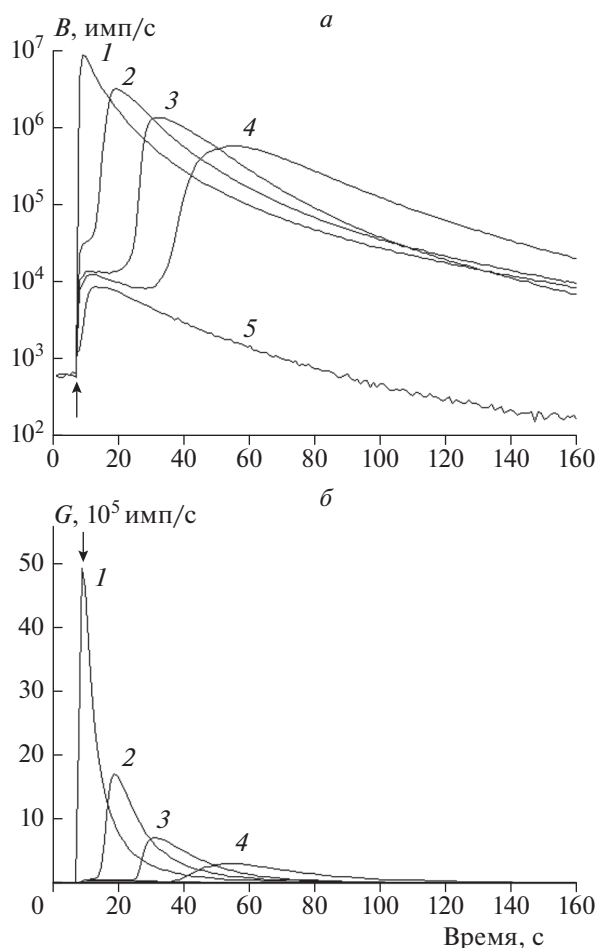


Рис. 2. Кинетические кривые совместной хемилюминесценции, регистрируемой в синем ( $B$ ) и зеленом каналах ( $G$ ), в присутствии L2 в концентрации 0 (1), 3.8 (2), 7.3 (3), 10.8 (4) и 37.8 мкМ (5) и L1 в концентрации 0.8 мкМ. Момент смешивания реагентов указан стрелкой.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные отношения, характеризующие L1 и L2, равны  $1.9 \pm 0.2$  и  $0.10 \pm 0.01$  соответственно. Они получены в присутствии лишь одного из хемилюминофоров.

На рис. 2 линии 1–5 – кинетические кривые хемилюминесценции, регистрируемой в синем и зеленом каналах, при варьировании начальной концентрации L2 и постоянной начальной концентрации L1. Масштаб по оси ординат в одном случае логарифмический, а в другом – линейный. Видим, что в присутствии L2 наблюдается уменьшение максимальной интенсивности хемилюминесценции, и появляется задержка между моментом смешивания реагентов и подъемом интенсивности к максимуму.

На рис. 3 представлены кинетические кривые изменения спектрального отношения  $\delta$  в ходе ре-

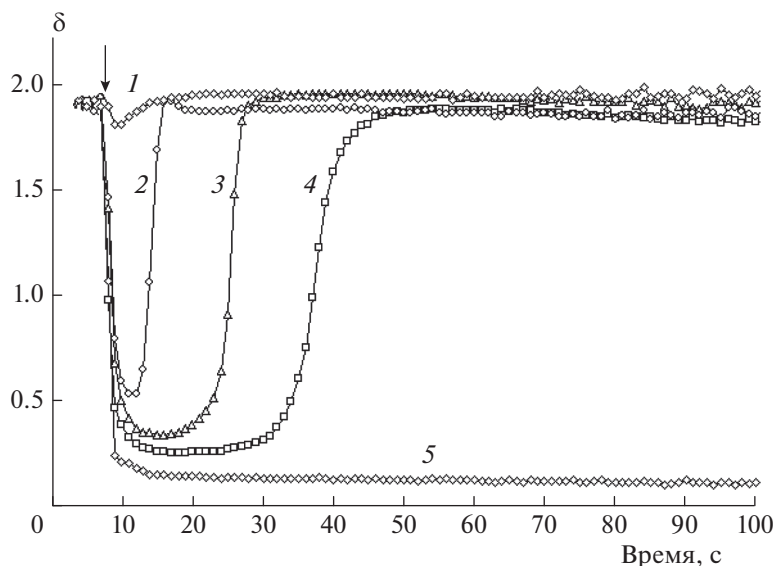


Рис. 3. Кинетические кривые изменения спектрального отношения  $\delta$  для данных, представленных на рис. 2.

акции. Уменьшение спектрального отношения в начале реакции свидетельствует о том, что на этом интервале времени происходит преимущественно окисление и хемилюминесценция L2. Увеличение  $\delta$  до значений, характерных для L1, служит индикатором окончания окисления L2. При отношении начальных концентраций L2/L1  $\approx 50$  (кривые 5 на рис. 2 и 3) наблюдается исключительно хемилюминесценция L2 при полном тушении хемилюминесценции L1.

Таким образом, хемилюминофор L2 для L1 в системе гемин –  $\text{H}_2\text{O}_2$  выступает в роли типичного антиокислителя-антиоксиданта, но не обычного, а такого, о расходовании которого можно судить по изменению хемилюминесценции. И это очень удобно как для настройки параметров модельной окисляющей системы на основе пероксида водорода и гемина с люминолом в качестве индикаторного хемилюминофора, так и для использования L2 в качестве референтного соединения.

Отметим, что величина спектрального отношения чувствительна не только к изменению спектрального состава испускаемого света, но и к изменению оптической плотности среды в полосе испускания хемилюминесценции в ходе реакции. Это означает, что необходим контроль за оптической плотностью реакционной среды посредством спектрофотометрических измерений.

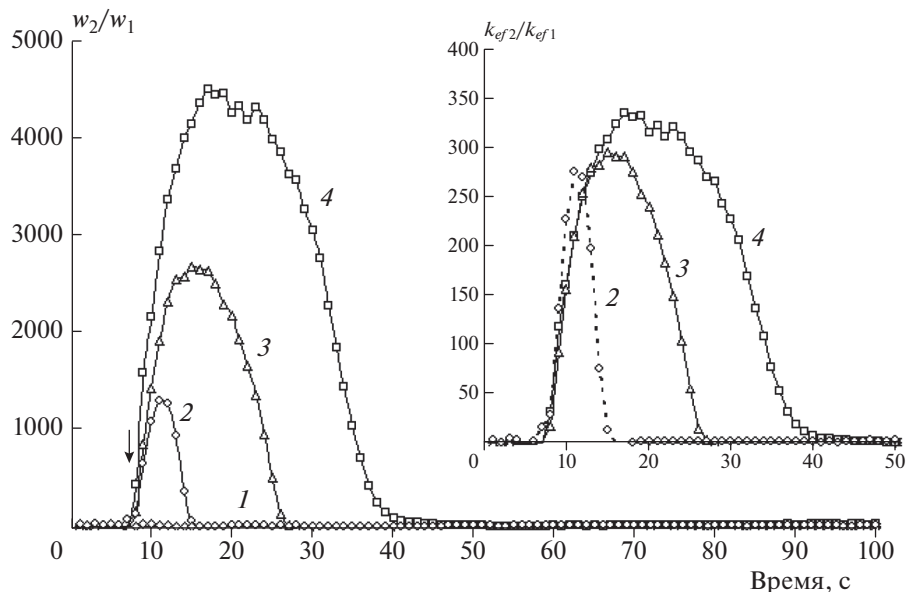
С помощью формулы (6) графики зависимости  $\delta(t)$  преобразуются в графики зависимости отношения скоростей расходования  $w_2/w_1$  от времени. Для этого преобразования необходимо знать отношения  $\Phi_1/\Phi_2$  и  $\alpha_{SG1}/\alpha_{SG2}$ . В условиях опытов отношение  $\Phi_1/\Phi_2 \approx 1600$ . Отношение  $\alpha_{SG1}/\alpha_{SG2}$  най-

денное численным интегрированием на основе известных спектров хемилюминесценции L1 и L2, равно 0.26. Произведение первых двух множителей, таким образом, дает величину, приблизительно равную 400. Результат преобразования графиков  $\delta(t)$  в графики  $w_2(t)/w_1(t)$  при  $(\Phi_1/\Phi_2)(\alpha_{SG1}/\alpha_{SG2}) = 400$  представлен на рис. 4. Видим, что скорость расходования L2 превышает скорость расходования L1 в несколько тысяч раз. Предполагая, что скорости расходования определяются произведением концентрации на эффективную константу скорости, и умножив  $w_2(t)/w_1(t)$  на  $L1_0/L2_0$ , получим графики, представленные на вставке к рис. 4. Откуда видно, что эффективные константы скоростей L2 и L1 различаются приблизительно в 300 раз.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектрально-кинетическая регистрация хемилюминесценции является компромиссным вариантом между спектральной регистрацией с накоплением сигнала при больших концентрациях хемилюминофора на длительных интервалах времени и, как следствие, с потерей кинетической информации и кинетической регистрацией, при которой спектральная информация оказывается недоступной. Спектрально-кинетическая регистрация полезна для установления факта неизменности эмиттера или факта появления нового дополнительного эмиттера в ходе хемилюминесцентной реакции.

В совместной хемилюминесценции, которая инициируется активными частицами, генерируемыми при разложении пероксида водорода геминном, лофин выступает в роли антиокислителя-антиоксиданта для люминола. Совместная хими-



**Рис. 4.** Кинетические кривые изменения отношения  $w_2/w_1$  для данных, представленных на рис. 2. На вставке – кривые зависимости отношения эффективных констант скоростей распада L2 и L1 от времени.

люминесценция люминола и лофина удобна для настройки параметров модельной окисляющей системы на основе пероксида и гемина с люминолом в качестве индикаторного хемилюминофора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-53-18019 Болг\_а) и Национальным научным фондом Болгарии (грант № КП-06-Русия-28).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.
2. Шляпникох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М. и др. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966.
3. Fedorova G.F., Menshov, A.V., Trofimov A.V. et al. // Analyst. 2009. V. 134. № 10. P. 2128.
4. Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касаикина О.Т. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49.
5. Жигачева И.В., Русина И.Ф., Генерозова и др. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 68.
6. Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С. и др. // Кинетика и катализ. 2014. Т. 55. № 2. С. 157.
7. Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Denev P. et al. // Beilstein J. Org. Chem. 2015. V. 11. P. 1398.
8. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al. // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. № 2. С. 579
9. Fedorova G.F., Menshov V.A., Naumov V.V. et al. // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. № 3. P. 780.
10. Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment / Eds. Popov I., Lewin G. Kerala: Transworld Research Network, 2008.
11. Эмануэль Н.М., Гал Д. Окисление этилбензола (модельная реакция). М.: Наука, 1984.
12. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Кинетика и катализ. 2004. Т. 45. № 3. С. 355.
13. Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. et al. // ARKIVOC. 2007. № 8. P. 163.
14. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Трофимов А.В. // Хим. физика. 1994. Т. 13. № 11. С. 8.
15. Bastos E.L., Romoff P., Eckert C.R. et al. // J. Agr. Food Chem. 2003. V. 51. № 25. P. 7481.
16. Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J. // Anal. Chim. Acta. 1992. V. 266. № 2. P. 265.
17. Thorpe G.H.G., Whitehead T.P. US Patent № 5395755. 1995.
18. Ashida S., Okazaki S., Tsuzuki W. et al. // Anal. Sci. 1991. V. 7. № 1. P. 93.
19. Maehly A.C., Akeson A. // Acta Chem. Scand. 1958. V. 12. № 6. P. 1259.
20. Kremer M.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 297 № 2. P. 268.
21. de Villiers K.A., Kaschula C.H., Egan T.J. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. 2007. V. 12. № 1. P. 101.
22. Brown S.B., Dean T.C., Jones P. // Biochem. J. 1970. V. 117. № 4. P. 741.
23. Jones P., Mantle D., Wilson I. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1983. № 1. P. 161.
24. Suzuki K., Saito H., Jinno N. et al. // Chem. Lett. 2008. V. 37. № 10. P. 1090.

25. *Harada Y., Suzuki K., Hashimoto M. et al.* // *Talanta*. 2009. V. 77. № 3. P. 1223.
26. Цаплев Ю.Б. // *ЖФХ*. 2011. Т. 85. № 7. С. 1371.
27. *Tsaplev Yu., Vasil'ev R., Trofimov A.* // *Luminescence*. 2014. V. 29. № S1. P. 49.
28. *Merenyi G., Lind J., Eriksen T.E.* // *J. Biolum. Chemilum.* 1990. V. 5. № 1. P. 53.
29. *Baj S., Krawczyk T.* // *J. Photochem. Photobiol., A*. 2006. V. 183. № 1–2. P. 111.
30. *Boyatzis S., Nikokavouras J.* // *Ibid.* 1993. V. 74. № 1. P. 65.
31. *Lu G., Wada J., Kimoto T. et al.* // *Eur. J. Org. Chem.* 2014. № 6. P. 1212.
32. *White E.H., Harding M.J.C.* // *Photochem. and Photobiol.* 1965. V. 4. № 6. P. 1129.
33. *Olsson T., Ewetz L., Thore A.* // *Ibid.* 1983. V. 38. № 2. P. 223.
34. *Jones P., Scowen N.R.* // *Ibid.* 1987. V. 45. № 2. P. 283.