

УДК 535.426

ВЛИЯНИЕ ЛЮМИНОЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИИ ФЕНТОНА

© 2011 г. Н. А. Аристова*, И. П. Иванова**, С. В. Трофимова**,
Д. И. Князев**, И. М. Пискарев***

* Нижнетагильский технологический институт (филиал) УрФУ
620031, Свердловская обл., Нижний Тагил, ул. Красногвардейская, 59

** Нижегородская государственная медицинская академия федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

*** Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

119992, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: i.m.piskarev@gmail.com

Поступила в редакцию 09.03.2011 г.

В окончательном виде 11.04.2011 г.

Рассчитана кинетика окисления Fe^{2+} и накопления продуктов окисления люминола в реакции Фентона при pH 2. Оценены характеристики процесса в нейтральной (pH 6) и щелочной (pH 12) средах. Результаты расчета сравниваются с экспериментальными данными выхода хемилюминесценции, индуцированной реактивом Фентона и люминолом. Показано, что ионы трехвалентного железа подавляют свечение люминола. Присутствие в образце железа или других металлов переменной валентности может значительно снижать квантовый выход хемилюминесценции после введения люминола.

Оценка интенсивности свободно-радикальных реакций в многокомпонентных органических субстратах (клетки, ткани) представляет интерес для биомедицинских исследований. Собственная люминесценция биологических образцов крайне мала — это сверхслабые свечения. Именно поэтому в настоящее время используются различные активаторы свободно-радикальных процессов, увеличивающие квантовый выход люминесценции (кумарин, реактив Фентона, люминол и т.д.). Обзор физических и химических аспектов, связанных с люминесценцией, дается в работах [1–3]. Методы с использованием реакции Фентона, когда генерируются в основном OH^\bullet радикалы, широко используются для анализа прооксидантной и антиоксидантной активности в биологических образцах. Однако результаты исследований, в которых применяется реактив Фентона, интерпретируются неоднозначно. Так, по одним источникам, реактив Фентона вводят при моделировании окислительного стресса и для оценки потенциальной способности субстрата к окислению [4, 5]. В других источниках по интенсивности хемилюминесценции, индуцированной реактивом Фентона, судят об уровне свободно-радикальных реакций и антиоксидантной активности в биологическом образце [6, 7]. Следует также отметить, что информации о времени протекания реакции Фентона в литературе нет, поэтому время наблюдения

выбирается произвольно (от 30 секунд до нескольких часов).

Известно, что наиболее интенсивное свечение люминола регистрируется в щелочной среде [2]. Биологические пробы имеют pH ~ 6.8–7.8. В этих условиях введение люминола если и увеличивает свечение, то незначительно. Изменение pH для биологических проб недопустимо, так как приводит к необратимым изменениям в клетке и искажает результаты исследования. Изучение продуктов, времени реакции, и подбор оптимальных концентраций реагентов для наблюдения хемилюминесценции с использованием реактива Фентона и люминола является актуальным, в частности, для биологических и медицинских исследований.

Поэтому целью настоящей работы было исследование интенсивности хемилюминесценции в воде с реактивом Фентона и люминолом при различных pH и концентрациях пероксида водорода, сульфата железа, люминола. В задачи исследования входило составление кинетической модели реакции Фентона, расчет характеристик реакции в кислой, нейтральной и щелочной среде, сравнение результатов расчета с экспериментальными данными.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Световое излучение регистрировалось прибором БХЛ-06 (Н. Новгород). Калибровку прибора осуществляли по эталонному источнику света известной интенсивности. Объем пробы составлял 1 мл в экспериментах без люминола: 0.4 мл H_2O , 0.4 мл $FeSO_4$, 0.2 мл H_2O_2 и 1.1 мл с люминолом (объем люминола 0.1 мл). Кювета с пробой располагалась почти вплотную к фотокатоду ФЭУ, что обеспечивало высокую эффективность регистрации. Измерения проводились в кислой (рН 2), нейтральной (рН 6) и щелочной (рН 12) средах. Растворы перекиси водорода требуемой концентрации готовили предварительно, растворы $FeSO_4$ — непосредственно перед началом эксперимента, на воде с рН 2, рН 6 или рН 12, исходя из условий эксперимента. Значение рН контролировали рН-метром рН-150М (г. Гомель). Воду до рН 2 доводили добавлением H_2SO_4 , до рН 12 — $NaOH$. Использовались реактивы ЧДА, дважды дистиллированная вода (рН 6). Все пробы промеряли в 10–15 повторностях.

Регистрацию хемилюминесценции начинали через 0.5–1.0 с после добавления перекиси и $FeSO_4$. Это время необходимо для ввода перекиси и перевода кюветы в режим измерения хемилюминесценции. Перед измерением и сразу после каждого измерения регистрировался фон, вычитаемый автоматически. Кислая среда использовалась в связи с тем, что в ней исходное двухвалентное железо стабильно, а образующееся трехвалентное железо не выпадает в осадок. Это дает возможность корректно выполнить расчет процесса. Чистота растворов и состав продуктов реакции на разных стадиях контролировались по УФ-спектрам с помощью прибора Флюорат-02 Панорама (Санкт-Петербург). В частности, концентрация трехвалентного железа измерялась по пику поглощения при $\lambda = 304$ нм, коэффициент экстинкции $\epsilon = 2200$ моль $л^{-1}$ $см^{-1}$). Решение системы уравнений химической кинетики осуществляли с помощью пакета MathCad 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетическая модель процесса. Модель процесса в кислой среде включает реакции (1)–(17) (таблица). Концентрации ионов OH^- и H^+ (рН раствора) задавались в виде коэффициентов. Модель включает взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода и последующее образование радикалов OH^\cdot , HO_2^\cdot , $O_2^{\cdot-}$, и синглетного кислорода; диссоциацию перекиси водорода $H_2O_2 \leftrightarrow HO_2^- + H^+$, $pK_a = 11.5$ (реакции (12), (13)) и равновесие $HO_2^\cdot \leftrightarrow H^+ + O_2^{\cdot-}$, $pK_a = 4.8$ (реакции (7), (8)). Значения констант скорости реакций приведены из [8].

При протекании реакции Фентона в нейтральной и щелочной средах трехвалентное железо выпа-

дает в осадок после реакции $Fe^{3+} + 3OH^- \rightarrow Fe(OH)_3 \downarrow$ (реакции (18), (19)). Константы скорости этих реакций оценены на основании наблюдения времени образования осадка.

Кинетика окисления Fe^{2+} . Рассчитана зависимость количества актов окисления $N(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+})$ в кислой среде (рН 2) для случая $[Fe^{2+}] > [H_2O_2]$ при $[H_2O_2] = 10^{-6}$ моль/л при различной длительности регистрации ХЛ. Сюда включались как первично окисляемые ионы Fe^{2+} , вводимые с реактивом, так и ионы Fe^{2+} , восстановленные в реакции (реакция (11)) из ионов Fe^{3+} . Для всех концентраций Fe^{2+} от 10^{-2} до 10^{-5} моль/л величина $N(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+})$ достигает предельного значения 2×10^{-6} моль/л, т.е. $2 \times [H_2O_2]$. Предел определяется тем, что перекись водорода двухнормальна. Процесс окисления прекращается, когда перекись оказывается полностью израсходованной.

При $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$ и рН 2 введенное в пробу двухвалентное железо быстро расходуется. Трехвалентное железо будет восстанавливаться в двухвалентное (реакция (11)), и процесс будет идти до полного расходования перекиси, а его скорость определяется скоростью восстановления Fe^{3+} . Установлено, что число актов окисления $N(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+})$ существенно превышает количество ионов $[Fe^{2+}]$, первоначально введенных в раствор. Это обусловлено цепными реакциями, на поддержание которых расходуется перекись, т.е. “регенерацией” ионов двухвалентного железа, образованных в реакции (11).

Рассчитанная кинетика подтверждается спектрофотометрическими измерениями пика поглощения при $\lambda = 304$ нм, связанного с образованием трехвалентного железа. При условии $[Fe^{2+}] > [H_2O_2]$ время реакции (время уменьшения концентрации $[Fe^{2+}]$ в 100 раз) составляет 6, 60, 600 и 6000 с для $[Fe^{2+}] = 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ и 10^{-5} моль/л соответственно.

В кислой среде (рН 2) основным агентом, окисляющим двухвалентное железо до трехвалентного, является пероксид водорода и радикалы OH^\cdot (реакции (1) и (4)). Концентрации активных частиц, образующихся в растворе Фентона при $[Fe^{2+}] = 10^{-3}$ и $[H_2O_2] = 10^{-4}$ моль/л, рН 2 за время до 60 с с начала реакции, представлены на рис. 1. Видно, что основными активными частицами являются гидроксильные радикалы, однако в начале реакции, когда не наработаны ионы Fe^{3+} , концентрация супероксидных радикалов $O_2^{\cdot-}$ намного больше. Ионы трехвалентного железа расходуют супероксидные радикалы, и когда Fe^{3+} еще нет, радикалы $O_2^{\cdot-}$ быстро накапливаются.

В нейтральной среде (рН 6) определяющую роль в окислении двухвалентного железа и выпадении в осадок трехвалентного железа играет его взаимодей-

Константы скорости реакций в растворе Фентона

№№	Реакция	Константа скорости, л/(моль с), [8]
1	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$	$k_1 = 56$
2	$\text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$k_2 = 3 \times 10^7$
3	$\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$k_3 = 8.3 \times 10^5$
4	$\text{Fe}^{2+} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	$k_4 = 3 \times 10^8$
5	$\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{O}_2$	$k_5 = 5.5 \times 10^9$
6	$\text{OH}^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	$k_6 = 7.1 \times 10^9$
7	$\text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}^+ + \text{O}_2^-$	$k_7 = 7.5 \times 10^6$
8	$\text{H}^+ + \text{O}_2^- \rightarrow \text{HO}_2^\bullet$	$k_8 = 1.2 \times 10^2$ $\text{pK}_a = 4.8$
9	$\text{HO}_2^\bullet + \text{O}_2^- \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{O}_2$	$k_9 = 9.7 \times 10^7$
10	$\text{HO}_2^\bullet + \text{OH}^- \rightarrow \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	$k_{10} = 10^{10}$
11	$\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$	$k_{11} = 1.9 \times 10^9$
12	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}^+$	$k_{12} = 2 \times 10^{-2}$
13	$\text{HO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{13} = 10^{10}$; $\text{pK}_a = 11.5$
14	$\text{OH}^\bullet + \text{HO}_2^- \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{OH}^-$	$k_{14} = 7.5 \times 10^9$
15	$\text{Lum} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{LOOH}^\bullet$	$k_{15} = 8.7 \times 10^9$ [9]
16	$\text{LOOH}^\bullet + \text{O}_2^- \rightarrow \text{P}^*$	$k_{16} = 1$
17	$\text{O}_2^- + \text{OH}^\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2(\text{s})$	$k_{17} = 10^{10}$
18	$\text{Fe}^{3+} + 3\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3\downarrow$	$k_{18} = 1$ (pH 6)
19	$\text{Fe}^{3+} + 3\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3\downarrow$	$k_{19} = 10^6$ (pH 12)

ствие с гидроксид-ионами (реакция (18)). Однако при регистрации хемилюминесценции в течение 600 с влияние этих процессов не существенно, и справедливы оценки, сделанные для кислой среды. В сильнощелочной среде (pH 12) эти процессы ускоряются (реакция (19)), но на начальной стадии реакции (до 30 с) предложенная модель может быть применена для оценки особенностей кинетики процесса.

Свечение с люминолом. Для увеличения квантового выхода хемилюминесценции раствора вводили люминол. Механизм образования возбужденных состояний, излучающих фотоны, рассмотрен в работах [2, 3, 9]. На первой стадии люминол взаимодействует с гидроксильными радикалами (реакция (15)), образуя радикалы LOOH^\bullet . Дальнейшие превращения радикалов LOOH^\bullet могут привести к образованию продуктов, непосредственно испускающих фотоны. Механизмы реакций высвечивания могут быть различными, поэтому рассмотрим сначала ки-

нетику образования LOOH^\bullet . Если высвечивание будет происходить мгновенно, тогда интенсивность хемилюминесценции будет пропорциональна скорости образования LOOH^\bullet , а выход хемилюминесценции – количеству образовавшихся радикалов LOOH^\bullet .

Возьмем случай $[\text{Fe}^{2+}] > [\text{H}_2\text{O}_2]$, pH 2. Оценим удобные для экспериментатора концентрации железа и люминола. Зависимость скорости образования LOOH^\bullet в течение 1000 с для $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}, 10^{-4}$ и 10^{-5} моль/л, $[\text{Lum}] = 10^{-4}$ моль/л приведена на рис. 2. Исходя из того, что свечение нужно регистрировать в течение всего времени реакции, измерить выход хемилюминесценции при $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л за 60 с не представляет проблемы. При $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-4}$ моль/л регистрировать свечение за время реакции 600 с также возможно, однако интенсивность свечения уменьшится в 10 раз, а время измерения возрастет в 10 раз, т.е. в полученном выходе хемилюминесценции отношение сигнал/шум будет

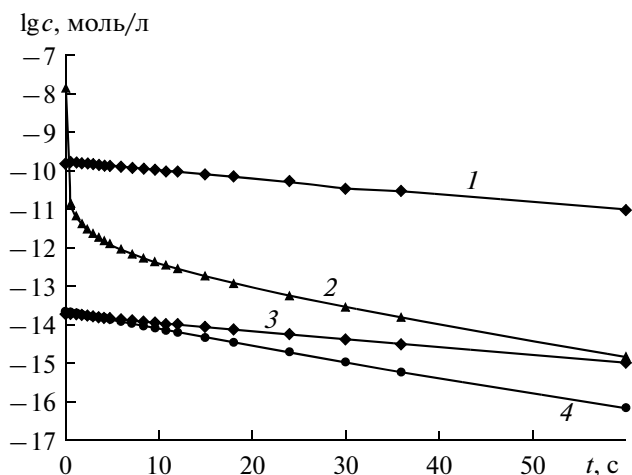


Рис. 1. Зависимость логарифма концентрации активных частиц $\lg c$ (моль/л) при $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л и $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-4}$ моль/л, pH 2 от времени t (с). 1 – OH^\cdot ; 2 – $\text{O}_2^{\cdot-}$; 3 – NO_2^\cdot ; 4 – NO_2^\cdot .

намного меньше. Регистрировать излучение в течение 6000 с при $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-5}$ моль/л затруднительно, поскольку отношение сигнал/шум уменьшится в еще большей степени.

Одним из возможных путей дальнейшего превращения LOOH^\cdot является взаимодействие с супероксидным радикалом $\text{O}_2^{\cdot-}$ (реакция (16)). Образуется возбужденная молекула P^* . Время жизни возбужденной молекулы P^* , согласно [9], много меньше 1 с. Молекулы примесей могут это время

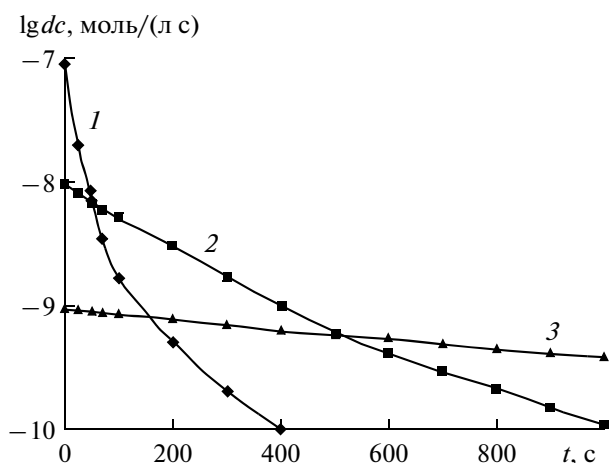


Рис. 2. Скорость образования радикалов люминола LOOH^\cdot dc , моль $\text{л}^{-1} \text{с}^{-1}$ при разных концентрациях двухвалентного железа, t – время наблюдения, с. 1 – $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л, 2 – $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-4}$ моль/л, 3 – $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-5}$ моль/л. Концентрация $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-5}$ моль/л, концентрация люминола 10^{-4} моль/л, pH 2.

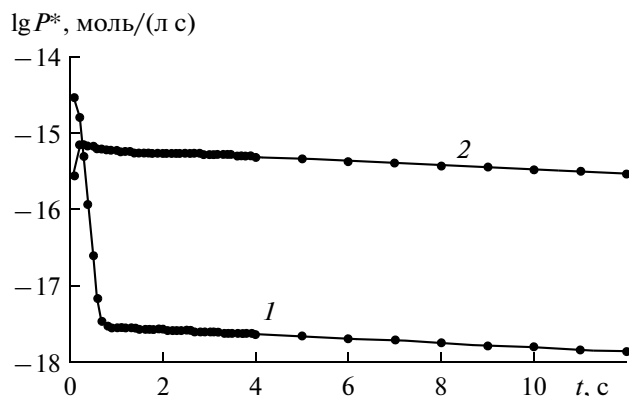


Рис. 3. Скорость образования P^* , моль/(л с), см. текст pH 2 (1) и 12 (2).

увеличивать, но в растворе Фентона таких примесей нет. Поэтому в дальнейшем примем, что высвечивание P^* происходит мгновенно, а константу скорости реакции (16) примем равной 1.

Скорость образования P^* определяется соотношением: $d[P^*]/dt = k_{16} [\text{LOOH}^\cdot][\text{O}_2^{\cdot-}]$.

Зависимость скорости образования P^* , при $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-4}$ моль/л и $[\text{Lum}] = 10^{-4}$ моль/л при pH 2, от времени за первые 12 с с начала реакции, представлена на рис. 3 (кривая 1). Снижение скорости реакции со временем обусловлено уменьшением концентрации $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ (рис. 1). Из рис. 3 (кривая 1) видно, что за первые 0.7 с скорость образования P^* уменьшается больше, чем в 1000 раз. Это связано со снижением концентрации супероксидного радикала, которая максимальна в начале реакции. Суммарная концентрация образовавшихся молекул P^* за первые 0.7 с составляет 5.15×10^{-15} моль/л, а за 12 с – 5.39×10^{-15} моль/л. Если высвечивание происходит мгновенно, то, начиная регистрацию более чем через 0.5–1.0 с, мы теряем информацию о практически всех испущенных фотонах. К тому же разброс времени начала регистрации приводит к колебаниям световыходов, намного превышающим статистическую ошибку.

Качественно такая ситуация для pH 2 подтверждается экспериментально выходом хемилюминесценции, приведенным на рис. 4. В первые секунды после добавления перекиси интенсивность хемилюминесценции максимальна и быстро падает. По всей видимости, начальный всплеск хемилюминесценции, происходящий в течение первой секунды реакции, остается незарегистрированным, поскольку регистрация хемилюминесценции на БХЛ-06 начинается через 0.5–1.0 с после добавления пероксида водорода. Таким образом, значения ХЛ, которые удастся зарегистрировать, это все, что осталось от мощного всплеска в первые миллисекунды. Были выполнены измерения люминесценции при pH 2

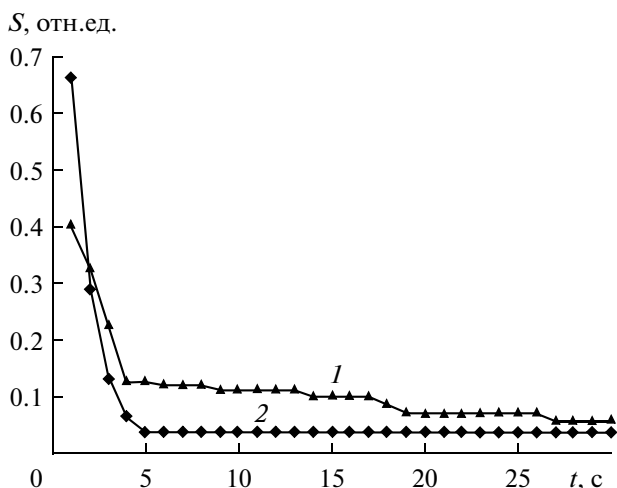


Рис. 4. Экспериментально измеренный выход интенсивности хемилюминесценции образца (S , отн. ед.), t – время, с. $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-4}$, $[\text{Lum}] = 10^{-4}$ моль/л. Кривая 1 – с люминолом; 2 – без люминола.

для образцов с люминолом (рис. 4, кривая 1) и без люминола (2). Выход хемилюминесценции за 30 с в образце без люминола – $1.7 \cdot 10^6$ фотонов (2.3×10^{-15} моль/л), с люминолом – $4.1 \cdot 10^6$ фотонов (5.6×10^{-15} моль/л). То есть люминол в кислой среде увеличивает выход люминесценции в ~ 2.5 раза. Расчетная концентрация $[\text{LOOH}^*] \sim 10^{-5}$ моль/л. Отсюда квантовый выход хемилюминесценции $\sim 10^{-10}$. В нейтральной среде влияние люминола примерно такое же.

Иная ситуация при pH 12 (рис. 3, кривая 2), когда образующееся в реакции трехвалентное железо практически мгновенно выпадает в осадок (реакция (19)). В этом случае концентрация ионов трехвалентного железа снижается настолько, что расходование супероксидных радикалов (реакция (11)) становится незначительным, и соответственно концентрация $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ значительно не уменьшается, а $[\text{P}^*]$ увеличивается. Измеренный экспериментально выход хемилюминесценции в щелочной среде при pH 12, $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л и $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-4}$ моль/л увеличивается в $\sim 10^5$ раз по сравнению с выходом при pH 2. Таким образом, ионы трехвалентного железа подавляют свечение люминола.

Ионы железа и других металлов переменной валентности могут содержаться в самой биологической пробе. Если в образце присутствуют пероксиды, то реакция Фентона будет осуществляться без дополнительного введения реактивов и может сопровождаться свечением, доступным для регистрации. Однако в биологических пробах наряду с перекисями и металлами переменной валентности присутствуют ингибиторы радикальных реакций

[10]. С увеличением концентрации $[\text{Fe}^{2+}]$ скорость реакции Фентона возрастает, и фоновое излучение становится интенсивнее. Введение люминола в этом случае может усилить хемилюминесценцию, однако с увеличением концентрации Fe^{2+} увеличивается и концентрация Fe^{3+} , а квантовый выход хемилюминесценции люминола в присутствии Fe^{3+} уменьшается. Поэтому выход хемилюминесценции люминола в присутствии реактива Фентона может исказить информацию об уровне свободно-радикальных реакций в биологических образцах.

ВЫВОДЫ

1. Время реакции Фентона (уменьшение концентрации железа в 100 раз) при $[\text{Fe}^{2+}] > [\text{H}_2\text{O}_2]$ составляет 6, 60, 600 и 6000 с для $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-2}$, 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} моль/л соответственно и не зависит от концентрации перекиси.

2. Свечение раствора Фентона в кислой и нейтральной средах после введения люминола превышает фоновое свечение, однако часть информации о числе фотонов может теряться из-за малой длительности вспышки ~ 5 с, если начало регистрации превышает это время.

3. Ионы трехвалентного железа подавляют свечение люминола, поэтому его не целесообразно применять в случае, когда инициатором свободно-радикальных процессов является железо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Физика и техника спектрального анализа. Люминесцентный анализ / Под ред. Константиновой-Шлезингер М.А. М.: Изд-во физ.-мат. лит., 1961. С. 138.
2. Васильев Р.Ф. // Усп. физ. наук. 1966. Т. 89. № 3. С. 409.
3. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. // Усп. биол. химии. 2009. Т. 49. С. 341.
4. Казакова В.В., Ёлкина Н.М. // Укр. біохімі. журн. 2007. Т. 79. № 4. С. 34.
5. Ёлкина Н.М. Казакова В.В., Коношенко С.В. // Уч. зап. Таврического национального ун-та им. В.И. Вернадского. Сер. Биология, химия. 2009. Т. 22 (61). № 3. С. 35.
6. Иванова И.П. // Нижегородский мед. журн. 2006. № 2. С. 183.
7. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенников М.К. // Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький, 1983. С. 179.
8. Пикаев А.К., Кабакчи С.А. Реакционная способность первичных продуктов радиолиза воды. Справочник. М.: Энергоатомиздат, 1982. С. 201.
9. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высшая школа, 1989.
10. Бурлакова Е.Б. // Рос. хим. журн. 2007. Т. 11. № 1. С. 3.