

На правах рукописи



Янькова Татьяна Вячеславовна

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕАКЦИИ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ
РАСТВОРАХ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В АНАЛИЗЕ ВОДНЫХ СРЕД

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва 2020

Работа выполнена на кафедре Энергетических технологий, систем и установок Института Тонких Химических Технологий имени М.В.

Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "МИРЭА - Российского технологического университета"

Научный руководитель: Мельников Павел Валентинович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры физической химии Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет».

Официальные оппоненты: Шкинев Валерий Михайлович, доктор химических наук, профессор лаборатории концентрирования Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН.

Кондаков Сергей Эмильевич, доктор фармацевтических наук, кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры химической кинетики химического факультета Московского государственного университета.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Защита состоится «16» декабря 2020 г. в 14:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.131.10 на базе ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет» по адресу: 119571, Москва, проспект Вернадского, д. 86 (аудитория М-116).

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 119571, г. Москва, пр. Вернадского, 86, ФГБОУ ВО "МИРЭА – Российский технологический университет" (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова).

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО " МИРЭА – Российский технологический университет " по адресу: 119454, Москва, пр. Вернадского, д. 78, и на сайте <https://www.mirea.ru/science-and-innovation/dissertation-tips/dissertation-council-d-212-131-10/>.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д.212.131.10,
кандидат химических наук

А.Ю. Путин

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Хемилюминесценция в настоящее время вызывает значительный интерес, обусловленный как чисто фундаментальными аспектами, касающимися механизмов возникновения электронно-возбужденных состояний молекул, так и возможностями новых практических приложений, в первую очередь - для создания средств диагностики, то есть химико-аналитических систем и комплектов для биохимического и микробиологического анализа. Хемилюминесцентные методы характеризуются высокой чувствительностью и широким динамическим диапазоном изменения интенсивности свечения. Преимуществами хемилюминесцентных методов являются их высокая специфичность, удачные значения отношения сигнал/шум, умеренная стоимость аппаратуры и чувствительность к биологическим анализам. Хемилюминесцентные реакции широко используются в диагностических целях в промышленности, биологии, медицине, криминалистике, а также в области пищевого санитарного контроля. В международной системе анализа технологий путем контроля критических точек НАССР (Hazard Analysis and Critical Control Points) хемилюминесцентный анализ занимает центральное место в качестве метода контроля чистоты поверхностей для широкого спектра пищевых производств. В то же время механизмы возникновения электронно-возбужденных состояний во многих хемилюминесцентных реакциях остаются предметом исследования.

Таким образом, исследования в области кинетики и механизмов хемилюминесценции, а также разработки новых и совершенствования существующих хемилюминесцентных диагностических систем являются актуальными. В целом процесс хемилюминесцентного анализа, как и любого другого, состоит из трех стадий: пробоподготовки, устраняющей мешающее влияние матрицы образца и в некоторых случаях – сопровождающейся концентрированием аналита, собственно аналитической реакции и обработки полученного аналитического отклика. Целесообразно развить всю последовательность указанных этапов, чтобы улучшить метрологические характеристики методики анализа и сделать процесс хемилюминесцентного анализа более технологичным. Для этого необходимо исследовать механизмы

взаимодействия хемилюминесцентных реагентов между собою и с аналитами. В некоторых случаях по зависимости интенсивности хемилюминесценции от условий протекания процесса, например, от концентрации отдельных реагентов, удастся проследить кинетику химической реакции и уточнить ее механизм.

Одним из наиболее востребованных применений хемилюминесцентных методов аналитического контроля является определение микробиологических показателей питьевой и хозяйственно-бытовой воды. За рубежом существуют серийные хемилюминесцентные тест-системы, основанные на ферментативной реакции люциферин-люцифераза, позволяющие определять интегральный показатель - общее микробное число (ОМЧ). Принцип определения заключается в том, что люциферин окисляется кислородом воздуха или пероксидом водорода в присутствии фермента люциферазы (собирательное название ферментов с хемилюминесцентными функциями), и эта реакция окисления люциферина приводит к эффективной яркой хемилюминесценции, но только в присутствии катализатора (например, АТФ). Определяемый компонент выступает в роли катализатора, что характерно для большинства хемилюминесцентных методик. На уровне лабораторных и мелкосерийных комплектов подобные ферментативные системы производятся и в Российской Федерации. Используемые реагенты, как и многие другие ферменты, не являются устойчивыми, и их необходимо хранить при отрицательных температурах. Помимо этого, люциферин и люцифераза являются импортными реагентами, что может осложнить их закупку в России. Люцифераза добывается из природного сырья или получается микробиологическим синтезом.

По такому же принципу (аналит как катализатор процесса) работает известная отечественная неферментативная методика определения микробиологических показателей воды, основанная на каталитическом окислении пероксидом водорода другого субстрата – люминола (гидразид аминоталевой кислоты). В сухом виде он может храниться годами, данный реагент коммерчески доступен в России. Стабильность и доступность люминола создает принципиальную возможность создать отечественные хемилюминесцентные тест-системы. Однако существующая хемилюми-

несцентная методика определения АТФ на основе каталитического окисления люминола пероксидом водорода (а через нее обычно определяют всю биоту) имеет погрешность 80%, что не позволяет проводить достоверный количественный анализ, и не удовлетворяет современным требованиям, предъявляемым к аналитическим методикам. При этом причины разброса результатов неочевидны. Особенность хемилюминесцентных реакций заключается в том, что ими сложно управлять: нет параметров управления, кроме концентраций реагентов.

Цель работы

Целью настоящей работы было улучшение метрологических характеристик методик определения общего микробного числа и гипохлорит-иона в воде и водных растворах за счет всестороннего сравнительного изучения кинетических закономерностей классической и модифицированной хемилюминесцентных систем в мицеллярных средах.

Молекулы ПАВ не будут участвовать в реакции в качестве реагентов, но могут оказаться средством управления хемилюминесцентными реакциями. Таким образом, могут быть улучшены, например, метрологические характеристики хемилюминесцентной методики определения общего микробного числа в воде и в водных средах, основанной на детектировании аденозинтрифосфата (АТФ), который содержится в клетках бактерий.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование классической хемилюминесцентной системы с окислением люминола и его специально синтезированного аналога N-октил-люминола, обладающего поверхностно-активными свойствами, в организованных молекулярных системах с различными видами ПАВ. N-октиллюминол был синтезирован для решения проблемы локализации люминогенного субстрата в мицелле. В настоящей работе удалось избежать алкилирования люминола по кислороду, которое происходит в стандартных условиях, что привело к синтезу поверхностно-активного субстрата со способностью к хемилюминесценции. Полученные результаты были применены для усовершенствования аналитической реакции с целью улучшения метрологических характеристик хемилюминесцентных методик определения общего микробного числа и гипохлорит-иона. На основе улучшенных методик был предложен оперативный метод

контроля обеззараживания воды во внелабораторных (полевых) условиях.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Создание лабораторного стенда-хемилюминометра для проведения хемилюминесцентных исследований в кинетическом режиме, пригодного для проведения измерений в мицеллярных растворах и других организованных молекулярных системах;
2. Создание новых реагентов для хемилюминесценции: синтез поверхностно-активного хемилюминесцентного субстрата, требующий разработки оригинальной методики алкилирования люминола по аминокгруппе.
3. Экспериментальное изучение классической и модифицированной хемилюминесцентных систем в мицеллярных средах;
4. Применение новых разработанных хемилюминесцентных систем для улучшения метрологических характеристик методики определения общего микробного числа и гипохлорит-иона.
5. Разработка оперативного метода контроля обеззараживания воды во внелабораторных (полевых) условиях с применением разработанных хемилюминесцентных систем.

Научная новизна. Научная новизна работы заключается в сравнительном исследовании хемилюминесценции в мицеллярных средах при локализации субстрата вне мицеллярной микрофазы и внутри мицеллярной микрофазы, детальном анализе кинетики хемилюминесцентных реакций в мицеллярных средах с практическим применением полученных результатов для улучшения существующих аналитических методик. В частности, установлена способность поверхностноактивного аналога люминола образовывать собственные мицеллы.

В работе впервые:

1. Разработана уникальная методика алкилирования люминола по аминокгруппе для получения люминогенного субстрата с поверхностно-активными свойствами.
2. Впервые проведено сравнительное исследование кинетики хемилюминесцентных реакций в различных мицеллярных

средах с использованием субстрата, локализованного в водной фазе и локализованного в мицеллярной фазе.

3. Определено влияние локализации реагентов на метрологические характеристики хемилюминесцентных аналитических методик.

4. Создана, исследована и применена в аналитическом контроле инновационная хемилюминесцентная система с поверхностно-активным люминогенным субстратом.

Практическая значимость работы. В результате проведенного исследования продемонстрирована возможность управлять кинетикой хемилюминесцентных реакций с помощью мицеллярных систем. За счет введения мицеллярных компонентов и разработки инновационного поверхностно-активного субстрата на основе люминола значительно улучшены метрологические характеристики методик определения общего микробного числа и гипохлорит-иона. Данная разработка позволит отечественным производителям конкурировать с зарубежными фирмами на рынке тест-комплектов для определения ОМЧ и прочих хемилюминесцентных методик.

Методы исследования. При выполнении работы использовали современные инструментальные методы исследования, соответствующие поставленным задачам: метод измерения интенсивности хемилюминесценции, метод спектрофотометрии, метод ИК-спектроскопии, метод масс-спектроскопии, метод оптической микроскопии, метод математического моделирования систем, препаративный синтез, метод ядерного магнитного резонанса, цифровая тензиометрия для определения поверхностного натяжения для определения критических концентраций мицеллообразования для использованных растворов методом отрыва кольца.

Положения, выносимые на защиту.

1. Создан современный лабораторный стенд для проведения хемилюминесцентных исследований в кинетическом режиме.
2. Впервые разработана селективная методика алкилирования люминола по аминогруппе.
3. Проведено сравнительное исследование кинетики хемилюминесцентных реакций окисления люминола и N-октил-люминола в мицеллярных системах. Установлена роль локализации молекул субстрата.

4. Уточнен механизм хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола гипохлорит-ионом, установлена его схема и определены константы скорости процесса.

5. Улучшены метрологические характеристики методик определения общего микробного числа и гипохлорит-иона в воде и водных растворах.

6. Разработана методика оперативного контроля обеззараживания воды во внелабораторных (полевых) условиях.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов проведённого исследования обеспечивалась посредством использования современного оборудования и поверенных средств измерений, а в случае аналитических применений – независимыми измерениями другими методами и применением стандартных образцов.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждены на Международной научно-технической конференции «Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения» (INTERMATIC–2017) (Москва, 2017), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, 2017), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 2018), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019), на XXI Международном семинаре «Физико-математическое моделирование систем» (Воронеж, 2019).

Публикации. Основные результаты настоящей диссертации опубликованы в виде 4 статей в журналах, включенных Высшей Аттестационной Комиссией в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных к публикациям основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, а также в 5 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях. Тезисы докладов опубликованы в сборниках материалов соответствующих конференций.

Личный вклад автора. Диссертантом в период с 2016 по 2020 гг. непосредственно выполнен основной объем научного исследования. Личный вклад автора состоял в поиске и анализе научной литературы, в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, в обработке и интерпретации

результатов, формировании выводов, написании научных публикаций, подготовке и проведении докладов на конференциях.

Работа выполнена при поддержке гранта Госзадания РФ (тематика № 0706-2020-0020).

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка цитируемой литературы (156 наименования). Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков, 15 таблиц.

Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и основные задачи работы, обосновываются научная новизна и практическая значимость результатов, сформулированы выносимые на защиту положения.

Глава 1 Литературный обзор

В первой части главы приведены теоретические основы хемилюминесценции, ее достоинства и недостатки, а также приведены наиболее популярные типы применяемых хемилюминесцентных систем. Особое внимание уделено хемилюминесцентным реакциям на основе люминола и его аналогов.

Во второй части главы приведены имеющиеся в литературе сведения о проведении хемилюминесцентных реакций в растворах мицеллообразующих ПАВ. Показано, что влияние мицеллярных систем несомненно, но систематических исследований в этой области не было. Особенно мало изучена кинетика хемилюминесценции в мицеллярных системах.

В заключительной части главы рассмотрены современные методы определения общего микробного числа и гипохлорит-иона. Обоснованы преимущества хемилюминесцентного метода. Он экспрессный, не требует дорогостоящего оборудования и сложной пробоподготовки, анализ можно проводить непосредственно на месте отбора проб с немедленным получением результатов.

На основании проанализированной литературы установлено, что присутствие ПАВ оказывает значительное влияние на кинетику хемилюминесцентных реакций, однако детальное исследование влияния перехода к мицеллярным системам отсутствует. Основываясь на изученном материале, можно предположить, что молекулы ПАВ не будут участвовать в кинетическом механизме, но могут оказаться новым средством управления хемилюминесцентными

реакциями, в частности для увеличения соотношения сигнал/шум. За счет этого могут быть улучшены метрологические характеристики хемилюминесцентных методик. Обосновано исследование кинетики хемилюминесценции в мицеллярных системах как основное направление работы.

Глава 2. Экспериментальная часть

Во второй главе перечислены реактивы и вспомогательное оборудование, использованные в настоящей работе для изучения хемилюминесцентных систем.

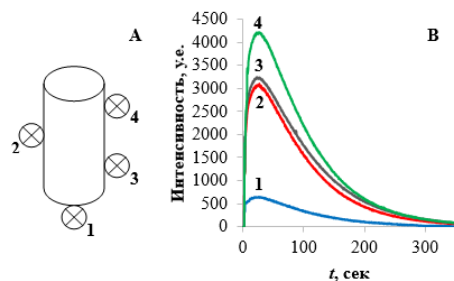


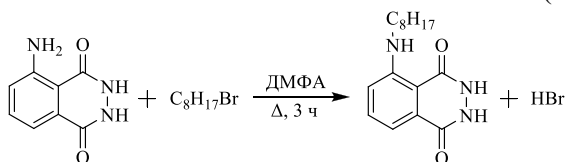
Рис. 1. (А) Схематичное изображение расположения датчиков (1÷4) относительно ячейки хемилюминометра; (В) Пример хемилюминесцентных кривых, полученных на этих датчиках (1÷4)

Описан экспериментальный образец хемилюминометра, сконструированный специально для данной работы с участием автора. Его измерительная ячейка снабжена 4 датчиками (твердотельные (кремниевые) фотоэлектронные умножители, то есть панельки лавинных фотодиодов), работающими в режиме счета числа квантов и расположенными в разных положениях относительно кюветы с исследуемым раствором

(рис. 1). Такое расположение фотоприемных устройств было выработано в ходе эксперимента, чтобы нивелировать невоспроизводимость результатов измерений, связанную с несинхронностью введения реагентов в ячейку и турбулентными явлениями при смешении. Возможность отдельно измерять интенсивности света с датчиков, расположенных в различных зонах реакционной ячейки позволяет отслеживать кинетику смешения реагентов, что способствует исключить соответствующие ошибки при интерпретации показаний. Результаты измерений регистрируются в виде кинетических кривых хемилюминесценции в координатах «Интенсивность (в условных единицах) – время (t)» с разрешением 0,2 с. Максимальное значение интенсивности $I_{\max}$ определяется по высоте пика на кинетической кривой

хемилюминесценции, интегральная интенсивность I - путем интегрирования полученной кинетической зависимости.

Основная масса реактивов была закуплена, классом не ниже ч.д.а, однако основной субстрат для исследования пришлось синтезировать, так как он практически недоступен на рынке. Основной сложностью получения данного реактива является алкилирование люминола по кислороду в стандартных условиях. При этом продукт теряет способность к хемилюминесценции. Поэтому была разработана оригинальная методика синтеза гидрофобного аналога люминола – N-октиллюминола (выход 31%):



Структуру вещества определяли по спектрам ЯМР:

^1H ЯМР (75,48 МГц, DMSO- d_6), δ , м.д.: 11,21 (2H, уш. с, NH-NH), 9,02 (1H, т, $^3J = 5,1$ Гц, NH-CH₂), 7,55 (1H, т, $^3J = 8,1$ Гц, ArH, HA в ABC), 6,95 (1H, д., $^3J = 8,0$ Гц, ArH), 6,80 (1H, д, $^3J = 8,3$ Гц, ArH), 3,15 (2H, к, NH-CH₂-CH₂), 1,62 (2H, п, CH₂-CH₂-CH₂), 1,30 (10H, м.), 0,85 (3H, т., CH₂-CH₃).

^{13}C ЯМР (75,48 МГц, DMSO- d_6) δ , м.д.: 163,37 (NHC=O), 161,73 (NHC=O), 150,78 (C), 150,32 (C), 134,13 (C-NH), 125,75 (CH), 116,37 (CH), 110,09 (CH), 66,07 (CH₂-NH), 31,28 (CH₂), 28,92 (CH₂), 28,68 (CH₂), 28,20 (CH₂), 25,57 (CH₂), 22,09 (CH₂), 13,96 (CH₃).

Сигналы 3,15, 1,62, 1,30 и 0,85 м.д. в спектре ^1H ЯМР и 66,07, 31,28, 28,92, 26,68, 28,20, 22,57, 22,09, 13,96 м.д. в спектре ^{13}C ЯМР доказывают присутствие октильного фрагмента в молекуле.

Для дополнительного подтверждения структуры вещества был снят ИК-спектр: ИК ν , см⁻¹: 3322 (пл), 3298 (ср), 3176 (ср) (ν NH), 3032 (сл), 2952 (ср) (ν CH_{аром}), 2922 (с), 2850 (ср) (ν CH), 1657 (оч. с) (амид-I), 1620 (ср) (δ NH), 1589 (ср), 1556 (ср) (ν CС_{аром}), 1520 (ср) (амид-II), 1330 (с), 1305 (с) (ν CN_{аром}), 810 (ср), (δ CH_{аром}).

По сравнению с ИК-спектром люминола у N-октиллюминола значительно увеличен сигнал валентных колебаний C-H (рис. 2). Это доказывает наличие октильного фрагмента в данной молекуле.

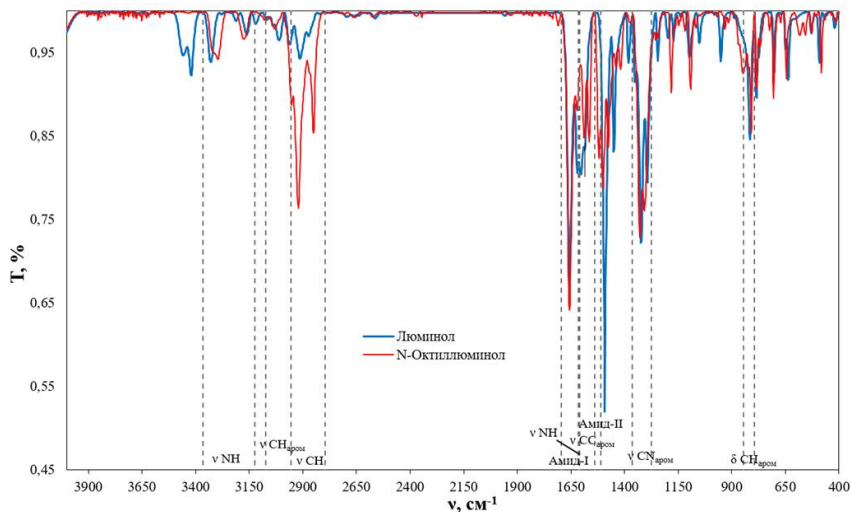


Рис. 2. ИК-спектр люминола и N-октиллюминола

В масс-спектре высокого разрешения при отрицательной ионизации мы наблюдаем отрицательно заряженный молекулярный ион-радикал $C_{16}H_{23}N_3O_2^-$ (289,17 m/z) и депротонированный ион $C_{16}H_{22}N_3O_2^-$ (288,17 m/z). При положительной ионизации наблюдается протонированный $C_{16}H_{24}N_3O_2^+$ (290,18 m/z) и дважды протонированный $C_{16}H_{25}N_3O_2^+$ (291,18 m/z) ион N-октиллюминола. Полученные молекулярные массы совпадают с брутто-формулой N-октиллюминола, что подтверждает строение полученного вещества.

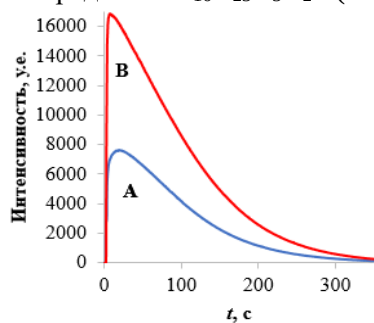


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентной реакции окисления (А) люминола ($1,5 \times 10^{-3}$ моль/л) и (В) N-октиллюминола ($1,5 \times 10^{-3}$ моль/л) гипохлорит-ионом (4×10^{-4} моль/л)

Методом отрыва кольца определили ККМ = 0,0015 моль/л. Электронный спектр поглощения N-октиллюминола находится в более длинноволновой области по сравнению со спектром поглощения люминола. Спектр испуска-

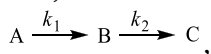
ния N-октиллюминола имеет максимум при 430 нм и соответствует спектру испускания люминола. Это свидетельствует о том, что за хемилюминесценцию отвечает один и тот же структурный фрагмент молекулы. Интенсивность хемилюминесценции N-октиллюминола увеличилась в 2 раза в сравнении с исходным люминогенным субстратом в аналогичных условиях (рис. 3), то есть продукт алкилирования оказался пригоден для исследования хемилюминесцентных реакций.

Также в главе описаны используемые экспериментальные приемы, включая методы культивирования факультативно-анаэробных бактерий *Escherichia coli DH5-Alpha (E.coli)*.

Глава 3. Сравнительное исследование хемилюминесцентных реакций люминола и N-октиллюминола в гомогенных водных растворах.

В главе 3 представлены результаты изучения хемилюминесцентных систем на базе люминола и N-октиллюминола без внесения ПАВ.

Проведен подробный кинетический анализ хемилюминесцентной реакции окисления люминола гипохлорит-ионом. Установлено, что форма кинетических кривых качественно соответствует появлению и гибели промежуточного продукта в последовательной реакции типа;



что позволяет рассчитать эффективные константы скорости $k_{1эфф}$ и $k_{2эфф}$. Найденные значения констант и формально-кинетические порядки по каждому компоненту хемилюминесцентной реакции окисления люминола и N-октиллюминола гипохлорит-ионом приведены в табл.1.

Выявлено отклонение кинетических зависимостей взаимодействия N-октиллюминола с гипохлорит-ионом от регистрируемых для классического люминогенного субстрата (рис. 4). Установлено, что N-октиллюминол участвует не только в прямой реакции окисления ($A \rightarrow B \rightarrow C$), но также находится в равновесии со своей неактивной формой ($A \leftrightarrow D$). Данное равновесие сильно смещено в сторону вещества D. Образованием вещества D обуславливается возникновение второго пика в кинетической

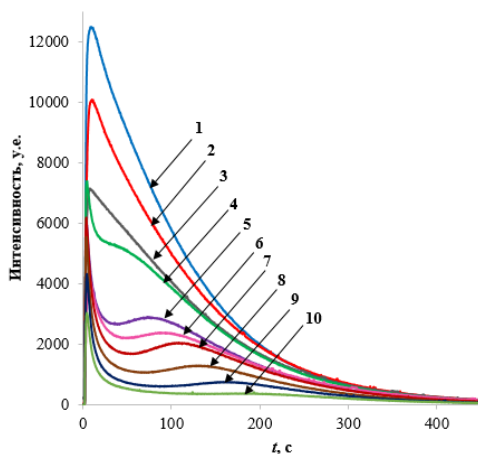
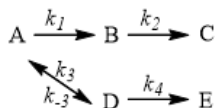


Рис. 4. Экспериментальные кинетические зависимости хемилюминесцентной реакции N-октиллюминола ($1,5 \times 10^{-3}$ моль/л) с гипохлорит-ионом (4×10^{-4} моль/л), полученные в разный промежуток времени $t_{\text{смеш}}$: 1. 3 мин; 2. 26 мин; 3. 57 мин; 4. 85 мин; 5. 117 мин; 6. 146 мин; 7. 207 мин; 8. 239 мин; 9. 266 мин; 10. 296 мин

настоящей работе раствор N-октиллюминола готовился за 5 часов до начала измерений. За это время происходит падение интегральной интенсивности I в 11 раз и интенсивности I_{max} в 3 раза, после чего раствор остается стабильным. Несмотря на сильное падение интенсивности, хемилюминесценция N-октиллюминола выше хемилюминесценции люминола.

Итоговая схема взаимодействия N-октиллюминола с гипохлорит-ионом приведена ниже:



кривой хемилюминесцентной реакции N-октиллюминола. Изменение кинетических зависимостей от времени смешения вызвано переходом вещества D в «связанную» форму N-октиллюминола E. Особенно заметной эта стадия становится при максимальной концентрации вещества D (когда реакция $\text{A} \leftrightarrow \text{D}$ находятся в равновесии).

В силу наблюдаемых кинетических особенностей в

Таблица 1. Константы скорости и формально-кинетические порядки по каждому компоненту хемилюминесцентной реакции окисления люминола и N-октиллюминола гипохлорит-ионом

Изменяемый параметр	Субстрат	n_1	n_2	$k_{1эфф}$	$k_{2эфф}$
Люминогенный субстрат	Люминол	0	0,5	0,286*	0,130
	N-октиллюминол	0	0,5	0,302*	0,122
Гипохлорит-ион	Люминол	1	0,5	52,7	0,115
	N-октиллюминол	1	0,5	10,4	0,172
Гидроксид-ион	Люминол	-0,5	-0,5	0,019	$7,3 \times 10^{-4}$
	N-октиллюминол	-0,5	-0,5	0,445	$3,4 \times 10^{-4}$

Глава 4. Сравнительное исследование хемилюминесцентных реакций люминола и N-октиллюминола в мицеллярных системах.

В четвертой главе определена локализация люминогенных субстратов в мицеллярных системах различного типа (анионные (АПАВ), неионогенные (НПАВ), катионные (КПАВ)). Её определяли по спектрам поглощения в средах с различной полярностью. Если молекула находится вне мицелл, на ее спектр влияет только полярный растворитель, если же она локализуется в полости мицеллы, то решающее влияние на спектр имеет неполярное окружение. Установлено, что люминол в системах с АПАВ и НПАВ локализуется в водной фазе, N-октиллюминол образует смешанные мицеллы с молекулами поверхностно-активных веществ. В случае КПАВ отрицательно заряженные моноанионы люминогенных субстратов взаимодействуют с положительно заряженными катионными мицеллами и образуют поверхностные соли, выпадающие в осадок. Получение достоверных экспериментальных результатов в таких системах не представляется возможным, поэтому катионные мицеллярные среды в настоящей работе далее не использовались.

Исследовано влияние межфазной разности потенциалов и заряда мицелл на хемилюминесцентные системы. Для этого при разных значениях pH раствора провели измерение параметров, характеризующих хемилюминесцентную реакцию окисления люминола и N-октиллюминола, в мицеллярной среде АПАВ и НПАВ. Установлено, что несмотря на различную локализацию в мицел-

лярных средах при увеличении рН от 11,5 до 13,5 наблюдается уменьшение интенсивности хемилюминесценции в обеих системах, что может быть вызвано влиянием избытка гидроксил-ионов на реакционную способность гипохлорит-иона, то есть на инициатор реакции. Введение в систему отрицательно заряженных мицелл значительно уменьшает интенсивность хемилюминесценции N-октиллюминола и увеличивает эффективную константу скорости гибели промежуточного продукта реакции $k_{2\text{эфф}}$, вследствие электростатического отталкивания. В присутствии различных типов ПАВ наклон зависимости практически не меняется, что показывает отсутствие специфического влияния межфазной разности потенциала на данные хемилюминесцентные реакции.

Далее изучили воздействие концентрации ПАВ на измеряемые параметры исследуемых хемилюминесцентных систем с целью установления влияния локализации реагентов в мицеллах на кинетику реакций. Установлено, что добавление анионных поверхностно-активных веществ не влияет на эффективные константы скорости $k_{1\text{эфф}}$ и $k_{2\text{эфф}}$ хемилюминесцентной реакции люминола в связи с локализацией субстрата в водной фазе. Для хемилюминесцентной системы N-октиллюминол-гипохлорит-ион прослеживается влияние концентрации АПАВ на эффективные константы скорости $k_{1\text{эфф}}$ и $k_{2\text{эфф}}$ (рис. 5). Отрицательный заряд анионных мицелл приводит к уменьшению эффективной константы скорости $k_{1\text{эфф}}$ за счет электростатического отталкивания гипохлорит-иона от субстрата. При этом эффективная константа скорости $k_{2\text{эфф}}$ увеличивается при возрастании концентрации АПАВ. Сравнение зависимостей $k_{1\text{эфф}}$ и $k_{2\text{эфф}}$ с наблюдаемыми для I и I_{max} позволяет заключить, что влияние электростатического отталкивания, понижающего $k_{1\text{эфф}}$, имеет большее значение, чем увеличение $k_{2\text{эфф}}$. Другими словами, применение АПАВ понижает величину аналитического сигнала, и это делает их применение нецелесообразным.

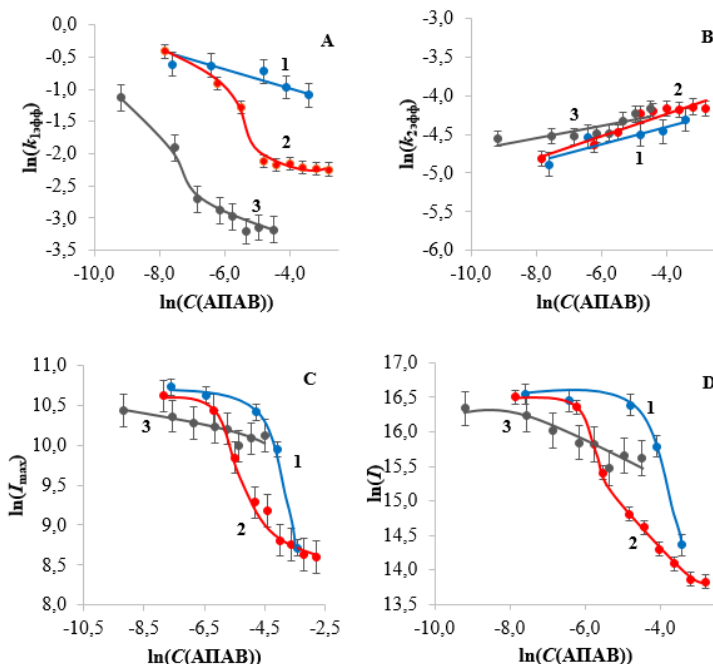


Рис. 5. Логарифмическая зависимость эффективных констант скорости $k_{1эфф}$ (A), $k_{2эфф}$ (B), максимальной интенсивности I_{max} (C) и интегральной интенсивности I (D) хемилумinesцентной реакции окисления *N*-октиллюминола ($1,5 \times 10^{-3}$ моль/л) гипохлорит-ионом (4×10^{-4} моль/л) от концентрации АПАВ: (1) децилсульфат натрия, (2) додецилсульфат натрия, (3) тетрадецилсульфат натрия

Изучение кинетики хемилумinesцентных систем в мицеллах неионогенных ПАВ проводили в следующем ряду веществ: Тритон X100 – Тритон X305 – Тритон X405, что позволяет исследовать влияние полярности внутримицеллярной среды (Тритон X100 – наименее полярный Тритон X405 – наиболее полярный.) Для хемилумinesцентной реакции люминола добавление НПАВ не влияет на эффективные константы скорости $k_{1эфф}$ и $k_{2эфф}$, в связи с локализацией субстрата в полярной фазе. В случае *N*-октиллюминола при увеличении концентрации мицелл происходит систематическое уменьшение эффективной константы скорости $k_{2эфф}$ (рис. 6) за счет наличия квадратичной стадии в процессе

формирования электронно-возбужденного состояния, ответственного за хемилюминесценцию.

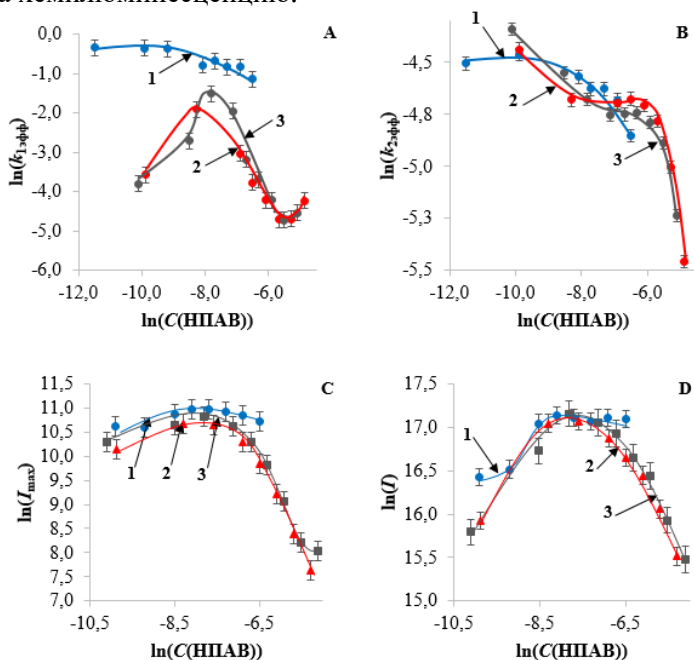


Рис. 6. Логарифмическая зависимость эффективных констант скорости $k_{1эфф}$ (А), $k_{2эфф}$ (В), максимальной интенсивности I_{max} (С) и интегральной интенсивности I (D) хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола ($1,5 \times 10^{-3}$ моль/л) гипохлорит-ионом (4×10^{-4} моль/л) от концентрации НПАВ: (1) Тритон X100, (2) Тритон X305, (3) Тритон X405

При увеличении концентрации НПАВ происходит разбавление промежуточных продуктов, так что их взаимодействие становится менее вероятным. Ввод небольших концентраций НПАВ приводит к повышению эффективной константы скорости $k_{1эфф}$, за счет того, что молекулы НПАВ встраиваются в отрицательно заряженные мицеллы N-октиллюминола, уменьшая плотность заряда. Затем влияние разбавления в мицеллах начинает преобладать, эффективная константа скорости $k_{1эфф}$ падает. В таком случае влияние концентрации ПАВ на хемилюминесценцию N-октиллюминола связано с уменьшением вероятности взаимодействия промежуточных продуктов. Таким образом, при небольших концентрациях НПАВ

наблюдается повышение интенсивности хемилюминесценции. Затем влияние разбавления в мицеллах начинает преобладать, максимальная интенсивность $I_{\max}$ и интегральная интенсивность I падают. Концентрация НПАВ при которой интенсивность хемилюминесценции становится максимальной составляет 3×10^{-4} моль/л.

Глава 5. Применение мицеллярных сред в хемилюминесцентных методах анализа

В данной главе хемилюминесцентный метод, усовершенствованный за счет добавления мицеллярных сред, применяется для определения общего микробного числа (ОМЧ).

В первую очередь выполнили оптимизацию состава хемилюминесцентной системы. Для этого исследовали зависимость интенсивности реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) пероксидом водорода в присутствии *E.coli* (1×10^7 КОЕ/мл) от концентрации пероксида водорода (рис. 7). При содержании пероксида водорода 0,3% наблюдается максимальная величина $I_{\max}$, поэтому данная концентрация была выбрана нами в качестве оптимальной.

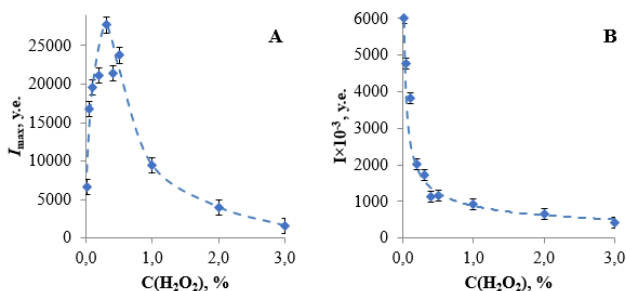


Рис. 7. Зависимость (А) максимальной интенсивности $I_{\max}$ и (В) интегральной интенсивности I хемилюминесцентной реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) пероксидом водорода в присутствии *E.coli* (1×10^7 КОЕ/мл) от концентрации пероксида водорода

Далее исследовали изменение максимальной интенсивности $I_{\max}$ (рис. 8, А) и интегральной интенсивности I (рис. 8, В) хемилюминесцентных систем люминола и N-октиллюминола при взаимодействии с *E.coli* в присутствии и отсутствии НПАВ (Тритон X100).

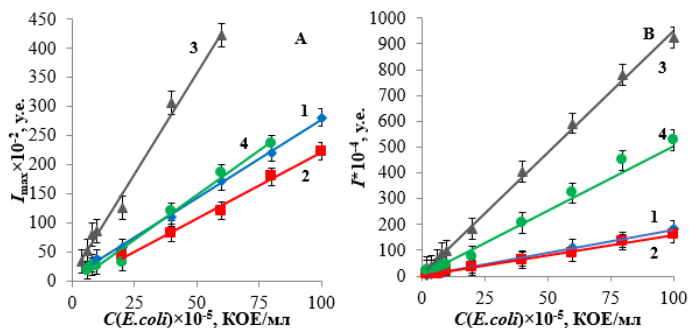


Рис. 8. Зависимость (А) максимальной интенсивности $I_{\max}$ и (В) интегральной интенсивности I хемилюминесцентной реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствии (1) и присутствии (2) НПАВ (Тритон X100 (3×10^{-4} моль/л)) и N-октиллюминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствии (3) и присутствии (4) НПАВ (Тритон X100 (3×10^{-4} моль/л)) пероксидом водорода (0,3%) от концентрации *E.coli*

В отсутствие НПАВ при переходе от люминола к N-октиллюминолу наблюдается повышение максимальной интенсивности $I_{\max}$ в 2,5 раза и интегральной интенсивности I в 5 раз. Данный эффект наблюдается благодаря микроконцентрированию в собственных мицеллах N-октиллюминола молекул АТФ, приводящему к его стабилизации.

Добавление НПАВ незначительно уменьшает максимальную интенсивность $I_{\max}$ и интегральную интенсивность I хемилюминесценции люминола за счет разделения реагентов (АТФ в мицеллярной фазе, а люминол в водной), что затрудняет протекание реакции. В случае N-октиллюминола введение НПАВ вызывает значительное понижение максимальной интенсивности $I_{\max}$ и интегральной интенсивности I . По-видимому, увеличение количества мицелл уменьшает локальную концентрацию АТФ в них, что приводит к понижению скорости хемилюминесцентной реакции.

Таким образом, в случае определения ОМЧ рациональнее всего использовать хемилюминесцентную систему на основе N-октиллюминола без дополнительного внесения ПАВ, поскольку именно она обладает наибольшей амплитудой аналитического сигнала.

Погрешность методики с оптимизированными составами люминесцентных систем, определенная по методу «Введено-

найдено» (табл. 2), не превышает 10% и 16% для люминола и N-октиллюминола, соответственно.

Таблица 2. Хемилюминесцентное определение *E.coli* в модельном растворе методом «Введено-найдено» ($n=5$, $P=0,95$)

	Введено $C(E.coli)$, КОЕ/мл	Найдено $C(E.coli)$, КОЕ/мл	S_r	δ , %
Люминол	62×10^4	$(60 \pm 4) \times 10^4$	18×10^3	6,5
	410×10^4	$(408 \pm 41) \times 10^4$	315×10^3	10,0
	880×10^4	$(910 \pm 81) \times 10^4$	398×10^3	8,9
N-октиллюминол	71×10^4	$(75 \pm 11) \times 10^4$	60×10^3	15,5
	250×10^4	$(249 \pm 13) \times 10^4$	102×10^3	5,2
	600×10^4	$(598 \pm 39) \times 10^4$	300×10^3	6,5

Далее для улучшенной методики определения ОМЧ определили метрологические характеристики в условиях внутрилабораторной прецизионности по РМГ 61-2010 ГСИ (табл. 3).

Таблица 3. Оценка показателей точности, правильности, повторяемости, воспроизводимости и внутрилабораторной прецизионности для улучшенной методики определения ОМЧ

Люминол								
Параметр измерения	S_r , %	σ_r , %	r_n , %	S_L , %	S_{RL} , %	σ_{RL} , %	R_L , %	$\pm \delta$, %
$I_{\max}$	7,44	7,44	20,60	6,39	7,57	7,57	21,0	14,8
I	3,31	3,31	9,19	6,13	6,40	6,40	17,7	12,5
N-октиллюминол								
Параметр измерения	S_r , %	σ_r , %	r_n , %	S_L , %	S_{RL} , %	σ_{RL} , %	R_L , %	$\pm \delta$, %
$I_{\max}$	10,58	10,58	29,32	11,88	13,22	13,22	36,6	25,9
I	5,30	5,30	14,69	11,24	11,61	11,61	32,2	22,8

Погрешность анализа в случае хемилюминесцентной реакции окисления люминола не превышает 15% в диапазоне концентраций *E.coli* от 8×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл, для N-октиллюминола не выше 26% в диапазоне концентраций *E.coli* от 4×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл, что значительно лучше показатели ранее предложенной методики¹.

Из таблицы 4 видно, что по погрешности разработанная нами методика не уступает зарубежному аналогу, основанному на ферментативной реакции люциферин-люцифераза.

¹ Пат. 2276190 Российская Федерация, МПК7 С 12 Q 1/04, G 01 N 33/48. Экспрессный способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей / Аксенов А.В., Ишутин В.А., Кармишин А.Ю.

Таблица 4. Сравнение характеристик методики на основе люциферина, люминола и настоящей работы

Показатель	Люминогенный субстрат		
	Люциферин	Люмнол	N-октиллюминол
Тип анализа	Количественный	Качественный	Количественный
Единицы измерения	RLU	У.е. (Наличие/отсутствие загрязнения)	КОЕ/мл
Соотношение сигнал/шум	-	24	135
$\delta, \%$	28	80	26

Далее хемилюминесцентный метод, усовершенствованный за счет применения мицеллярных сред, использовали для определения концентрации гипохлорит-иона в водных объектах. Видно, что добавление НПАВ (Тритон X100) практически не влияет на эффективность хемилюминесценции (рис. 9).

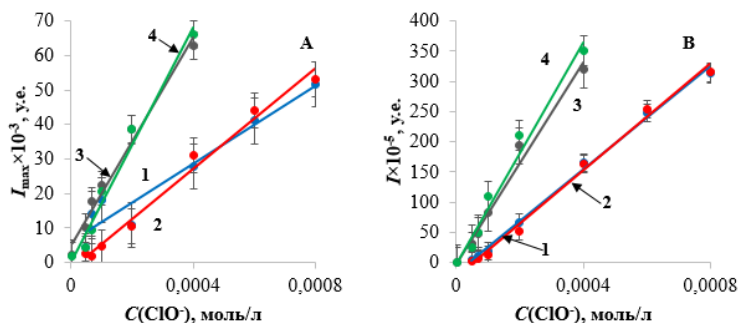


Рис. 9. Зависимость (А) максимальной интенсивности $I_{\max}$ и (В) интегральной интенсивности I хемилюминесцентной реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствии (1) и присутствии (2) НПАВ (Тритон X100) и N-октиллюминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствии (3) и присутствии (4) НПАВ (Тритон X100) от концентрации гипохлорит-иона

При этом замена люминола на N-октиллюминол приводит к повышению чувствительности методики в 2,5 раза в случае измерения максимальной интенсивности $I_{\max}$ и в 1,8 раз в случае интегральной интенсивности I , при этом градуировочные зависимости N-октиллюминола выходят из начала координат. Совокупно это позволяет понизить предел определения по сравнению с системой на основе люминола на порядок. Данный эффект может объясняться самоорганизацией люминогенного субстрата в мицел-

лы, что приводит к повышению локальной концентрации реагентов и увеличению эффективности хемилюминесцентной реакции.

Далее нами была проведена оценка метрологических характеристик хемилюминесцентной методики определения гипохлорит-иона методом «Введено-найдено» (табл. 5).

Таблица 5. Хемилюминесцентное определение гипохлорит-иона в модельном растворе методом «Введено-найдено» ($n=5$, $P=0,95$)

Хемилюминесцентная система	Введено $C(ClO^-)$, моль/л	Найдено $C(ClO^-)$, моль/л	S_r	δ , %
Люминол	1×10^{-4}	$(0,9 \pm 0,10) \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-6}$	11
	2×10^{-4}	$(1,9 \pm 0,10) \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-8}$	5,3
	4×10^{-4}	$(4,0 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	1,0
Люминол с добавлением Тритон X100	1×10^{-4}	$(0,9 \pm 0,10) \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	11
	2×10^{-4}	$(1,9 \pm 0,15) \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-6}$	7,9
	4×10^{-4}	$(4,1 \pm 0,13) \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-5}$	3,1
N-октиллюминол	1×10^{-4}	$(1,0 \pm 0,21) \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-6}$	20
	2×10^{-4}	$(2,4 \pm 0,40) \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-5}$	16
	4×10^{-4}	$(3,9 \pm 0,14) \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-6}$	3,6
N-октиллюминол с добавлением Тритон X100	1×10^{-4}	$(1,1 \pm 0,16) \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-6}$	15
	2×10^{-4}	$(2,2 \pm 0,22) \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	10
	4×10^{-4}	$(3,9 \pm 0,10) \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-6}$	2,6

Переход к N-октиллюминолу приводит к увеличению погрешности анализа с 11% до 20%. Это связано с более сложным механизмом окисления N-октиллюминола гипохлорит-ионом, описанным в главе 3. Данный эффект в дальнейшем может быть устранен при совершенствовании приборной базы за счет улучшения системы ввода и перехода к контролируемому смеше-

нию реагентов. Добавление Тритон X100 к хемилюминесцентной системе позволяет снизить погрешность с 20% до 15%.



Рис. 10. Схема определения качества питьевой воды во внелабораторных условиях

На основе усовершенствованных методик определения ОМЧ и гипохлорит-иона нами был разработан экспрессный метод контроля обеззараживания воды во внелабораторных (полевых) условиях (рис. 10). После отбора пробы проводится определение ОМЧ на портативном хемилюминометре. При превышении нормы, проводится обеззараживание воды, путем добавления в нее хлорсодержащих препаратов. Избыточный уровень концентрации антисептика определяется на том же хемилюминометре методикой, описанной выше. При

повышенном содержании гипохлорит-иона проводится его нейтрализация тиосульфатом натрия. Преимуществом данной методики контроля является экспрессность определения показателей качества воды, представленных выше. Причем анализ возможно провести на месте отбора проб.

Заключение

В настоящей работе на примере хемилюминесцентных методик определения ОМЧ и гипохлорит-иона продемонстрированы дополнительные возможности перехода к мицеллярным системам. Разработанный подход может позволить отечественным производителям создать эффективные тест-комплекты для

определения ОМЧ и прочих хемилюминесцентных методик за счет применения дешевого сырья отечественного производства.

Выводы

1. Создан современный лабораторный стенд для проведения хемилюминесцентных исследований в кинетическом режиме. Четыре датчика (кремниевые фотоэлектронные умножители), расположенные с разных сторон относительно кюветы, исключают погрешность, вызванную смешением реагентов.
2. Впервые была разработана селективная методика алкилирования люминола по аминогруппе, в которой удалось избежать алкилирования люминола по кислороду, происходящего в стандартных условиях. По данной методике был синтезирован поверхностно-активный аналог люминола – N-октиллюминол. Структура подтверждена комплексом методов. Обнаружена способность анионной формы N-октиллюминола образовывать самостоятельные мицеллы, $K_{CM} = 0,0015$ моль/л.
3. Проведено сравнительное исследование кинетики хемилюминесцентных реакций окисления люминола и N-октиллюминола в мицеллярных системах для рядов анионных и неионогенных ПАВ. Установлена роль локализации молекул субстрата, уточнен механизм хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола гипохлорит-ионом, установлена его схема и измерены формально-кинетические параметры.
4. Улучшены метрологические характеристики методик определения общего микробного числа и гипохлорит-иона в воде и водных растворах за счет применения модифицированной хемилюминесцентной системы и мицеллярных сред. Чувствительность увеличилась в 2,5 раза, порог определения снизился на порядок, при этом погрешность не превышает 20%.
5. Разработана экспрессная методика контроля обеззараживания воды во внелабораторных (полевых) условиях с применением разработанных хемилюминесцентных систем.

Список основных публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Ибрагимова Д.А., Камиль О.М., Янькова Т.В., Яштулов Н.А., Зайцев Н.К. Влияние поверхностно-активных веществ на хемилюминесцентную реакцию люминол-пероксид водорода // Тонкие Химические Технологии. 2017. Т. 12. № 6. С. 71–76.

2. Янькова Т.В., Мельников П.В., Зайцев Н.К. Хемилюминесцентные реакции люминола и N-октиллюминола с гипохлоритом в анионных поверхностно-активных веществах // Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия. 2019. Т. 6. № 3. С.154-160.
3. Янькова Т.В., Мельников П.В., Яштулов Н.А., Зайцев Н.К. Хемилюминесцентные реакции люминола и N-октиллюминола с гипохлоритом в растворах неионогенных поверхностно-активных веществ // Тонкие Химические Технологии. 2019. Т. 14. № 3. С.90-97.
4. Янькова Т.В., Мельников П.В., Александровская А.Ю., Зайцев Н.К. Усовершенствование лабораторных методов определения общего микробного числа с использованием хемилюминесцентных реакций в организованных молекулярных системах // Аналитика и контроль. 2019. Т.23. № 4. С. 40-47.

Список основных докладов по теме диссертации

1. Алтунин К.К., Антропов А.П., Рагуткин А.В., Янькова Т.В., Зайцев Н.К. Физико-химическое исследование хемилюминесцентной реакции люминола в организованных молекулярных системах // Международная научно-техническая конференция «Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения» (INTERMATIC–2017): Сб. тезисов докладов и сообщений, МГУ МИРЭА. Москва. 2017. С. 738–741.
2. Янькова Т.В., Ибрагимова Д.А., Камиль О.М. Применение организованных молекулярных систем для изучения хемилюминесцентной реакции люминол-пероксид водорода // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017»: Сб. тезисов докладов и сообщений, МГУ. Москва. 2017. С. 794–794.
3. Янькова Т.В. Организованные молекулярные системы в хемилюминесцентной реакции люминола // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»: Сб. тезисов докладов и сообщений, МГУ. Москва. 2018. С. 904–904.
4. Янькова Т. В. Влияние локализации реагентов в мицеллах и межфазной разницы потенциалов на кинетику хемилюминесцентных реакций люминола и N-октиллюминола с гипохлоритом // Международная научная конференция студентов,

аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019»: Сб. тезисов докладов и сообщений, МГУ. Москва. 2019. С. 906-906.

5. Янькова Т.В., Мельников П.В., Шишкин В.И., Зайцев Н.К. Моделирование кинетических зависимостей хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола гипохлорит-ионом // Физико-математическое моделирование систем: материалы XXI Междунар. семинара.: Сб. тезисов докладов и сообщений, ВГТУ. Воронеж. 2020. С. 95-100.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор считает своим долгом выразить благодарность Н.К. Зайцеву, заведующему кафедрой ЭТСУ РТУ МИРЭА, консультировавшему и поддерживавшему на протяжении всего срока выполнения данной работы, М.Я. Мельникову, заведующему кафедрой химической кинетики МГУ, консультировавшему на первых этапах нашей работы, А.В. Сафонову и А.Ю. Александровской, принимавшим непосредственное участие в микробиологических экспериментах, фирме «Эконикс-Эксперт», предоставившей оборудование для выполнения работы.