

Хемилюминесценция индола и его производных

Р.Ф.Васильев, А.В.Трофимов, Ю.Б.Цаплев

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля Российской академии наук
119991 Москва, ул. Косыгина, 4, факс (499) 137–4101

Проанализированы результаты исследования хемилюминесценции индола и его производных. Показано, что химические превращения индолов приводят, в зависимости от строения и условий опыта, к разнообразным электронно-возбужденным продуктам и испусканию света. Многие из рассмотренных реакций лежат в основе высокочувствительных методов детектирования индолов в биологии, медицине, экологии и криминалистике.

Библиография — 100 ссылок.

Оглавление

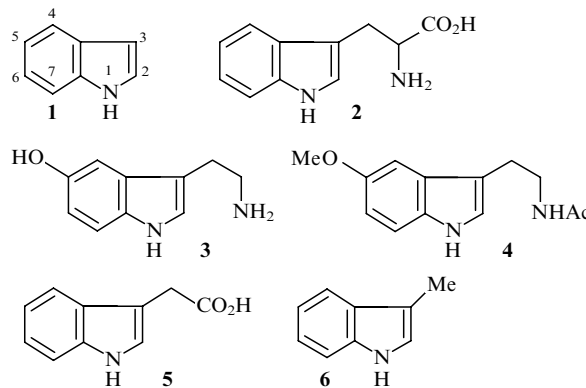
I. Введение	91
II. Первые исследования	92
III. Хемилюминесценция индолов без раскрытия пиррольного цикла	94
IV. Диоксетаноны, диоксетанимины и рекордная хемилюминесценция диоксетанов	95
V. Индолы и активные частицы	96
VI. Сверхслабое свечение биологических объектов	98
VII. Хемилюминесценция индолов в ферментативных процессах	99
VIII. Заключение	101

I. Введение

В начале 60-х годов XX в. было обнаружено, что люциферины некоторых светящихся живых организмов (ракушкового рачка *Cypridina*, морского червя *Balanoglossus*) в своем составе имеют индольный фрагмент. Сильный запах индола служил трассером при выделении люциферина морского червя. Все это наводило на мысль о важной роли индола в биолуминесценции, поэтому хемилюминесцентные свойства индолов стали объектом интенсивного исследования.

В настоящее время точно известно, что хемивозбуждение упомянутых выше люциферинов не связано с превращениями индольных фрагментов, но интерес к хемилюминесценции (ХЛ) индолов при окислении как в биологических, так и в небиологических системах сохраняется. Это неудивительно, поскольку среди производных индола (1) есть ряд очень важных соединений: незаменимая аминокислота — трипто-

фан (2), нейромедиатор — серотонин (3), гормоны — мелатонин (4) и индол-3-илуксусная кислота (5), огромное число алкалоидов и биологически активных веществ (винбластин, резерпин, аймалин, стрихнин, бруцин и др.), а также экзотические соединения, такие как скатол (6), обладающий сильным фекальным запахом (а при большом разбавлении — запахом жасмина).



Р.Ф.Васильев. Доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник ИБХФ РАН.

Телефон: (495)939–7358, e-mail: vasiliev@sky.chph.ras.ru

А.В.Трофимов. Доктор химических наук, заведующий лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов того же института. Телефон: (495)939–7358, e-mail: avt_2003@mail.ru

Ю.Б.Цаплев. Доктор технических наук, старший научный сотрудник того же института. Телефон: (495)939–7358, e-mail: tsap_04@mail.ru

Область научных интересов авторов: хемилюминесценция, люминесценция, фотохимия.

Дата поступления 10 апреля 2009 г.

Задачи определения индолов в смесях веществ приходится решать специалистам в разных областях: биологам, медикам, экологам, экспертам судебной медицины и криминалистам, работникам пищевой промышленности и др. Хемилюминесцентные методы детектирования, обладающие высокой чувствительностью и скоростью, для этих целей как нельзя кстати. В обзоре рассмотрена более чем полувековая история исследований ХЛ индолов, результаты которых служат основанием для аналитических применений.

Таблица 1. Максимальная интенсивность ХЛ некоторых индолных соединений в зависимости от условий.

Соединение	A1	B1	A9	B9
	H ₂ O – NaOH – S ₂ O ₈ ²⁻	DMCO – KOH	EtOH – H ₂ O – KOH – H ₂ O ₂ – K ₃ Fe(CN) ₆	DMCO – H ₂ O – KOH
3-Метилиндо́л	0.6	95.0	0.5	13.0
2-Метилиндо́л	0.3	20.0	0.5	0.05
1,2-Диметилиндо́л	0.4	2.9	—	—
Индо́л-3-илуксу́сная кислота	0.07	0.9	1.5	0.4
Индо́л-5-карбо́новая кислота	0.4	0	—	—
L-Трипто́фан	0.2	0	—	0
2,3-Диметилиндо́л	0	29.0	—	31.0
2,5-Диметилиндо́л	0	5.7	—	—
Оксиндо́л	0	1.1	—	—
2-(Индо́л-3-ил)пропио́новая кислота	0	1.1	—	—
3-Ацетилиндо́л	0	0.6	—	—
Индо́л-3-карба́льдегид	0	0.3	—	—
Индо́л-3-илаце́тальдегид	—	—	—	13.0
3-(2-Диизопропиламино-винил)индо́л	—	—	590.0	—

Примечание. Все значения приведены относительно интенсивности ХЛ индола.

II. Первые исследования

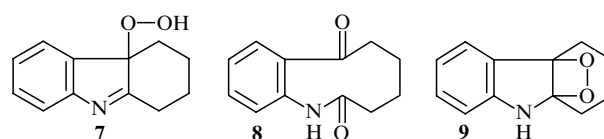
1. Хемилюминесценция индолов в присутствии основания

Впервые о ХЛ в реакциях индолов было сообщено на симпозиуме по хемилюминесценции в 1965 г.^{1,2} Авторы работы¹ исследовали ХЛ 22 соединений в условиях А1 и Б1. Условия А1 — водный азрированный раствор образца (2.5 ммоль·л⁻¹) в присутствии NaOH (0.5 моль·л⁻¹) и K₂S₂O₈ (0.08 моль·л⁻¹); условия Б1 — азрированный раствор образца (0.05 моль·л⁻¹) в диметилсульфоксиде (ДМСО) в присутствии навески КОН.[†] Хемилюминесценция была обнаружена у соединения **1** и шести его производных в условиях А1, а также у 11 соединений в условиях Б1 (табл. 1). Не обнаружена ХЛ у 2-фенилиндола, индо́л-3-карбо́новой кислоты, индо́л-3-илацетонитрила, 3-хлориндо́ла, 5-нитроиндо́ла, 3-ацетил-2-метилиндо́ла, 2,3-дихлориндо́ла, 1-метил-2,3-дифенилиндо́ла, 1-этил-2,3-дифенилиндо́ла, изатина и грамина.

В статье³ приведены данные из отчета⁴ по ХЛ индо́ла (**1**), индо́л-5-карбо́новой кислоты и 3-метилиндо́ла, из которых следует, что авторы работы¹ кроме ХЛ этих соединений в условиях Б1 наблюдали ХЛ и в диметилформамиде (ДМФА) в присутствии 0.67 моль·л⁻¹ Bu⁴OK, причем максимальная интенсивность ХЛ 3-метилиндо́ла в ДМФА почти в 4 раза больше, чем в ДМСО. Наблюдение ХЛ в ДМФА важно в связи с вопросом об активной форме кислорода в этих реакциях. В 1981 г. было показано,⁵ что в азрированном растворе ДМСО[‡] (но не в ДМФА) под действием щелочи из растворенного кислорода образуется анион-радикал супероксида, концентрация которого может достигать до

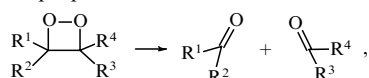
0.4 ммоль·л⁻¹, причем с увеличением доли H₂O в ДМСО концентрация анион-радикала супероксида уменьшается.⁶

Авторов работы² изначально интересовали пероксиды, в частности гидропероксид тетрагидрокарбазола (**7**), плавление или нагревание которого в ксилоле сопровождается вспышкой синего света. Одним из основных продуктов при этом является лактам. В соединении **7** расположение атомов кислорода относительно связи C(2)—C(3) асимметрично, а в соединении **8** — симметрично. По поводу механизма реакции в начале 1950-х годов между группами Виткопа и Бера возникла дискуссия. Виткоп предложил механизм распада пероксида **7** через образование четырехцентрового переходного состояния — диоксетана **9**. Вряд ли кто предполагал тогда, какое значение диоксетановые структуры будут иметь в исследованиях хемилюминесценции через 15–20 лет.[§]



Авторы работы² наблюдали ХЛ при действии Bu⁴OK на гидропероксиды **7**, **10** в ДМСО и на анион *N*-метилтриптамина в присутствии O₂. В 1966 г. Мак-Капра и Чанг сообщили о яркой ХЛ при воздействии Bu⁴OK на растворы 2,3-диметилиндоленил-3-гидропероксида (**11**) и гидропероксида **10** в ДМСО.^{7,8} Было установлено, что спектральные максимумы ХЛ этих соединений (518 и 495 нм) совпадают с

§ Если по энергиям связей оценить высвобождающуюся энергию в превращении



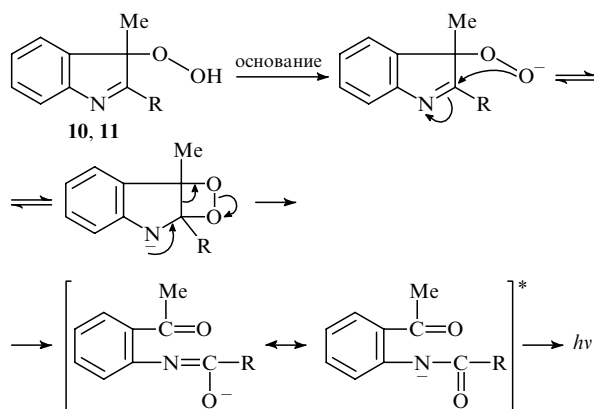
то эта величина составит более 300 кДж·моль⁻¹. Такая энергия способна обеспечить электронное возбуждение продуктов. Поэтому сейчас диоксетаны часто называют высокоэнергетическими молекулами или «хранилищами света».

[†] Растворимость КОН в безводном ДМСО не превышает 0.003 моль·л⁻¹ (см. M.Vasilescu, T.Constantinescu, M.Voicescu, H.Lemmettyinen, E.Vuorimaa. *J. Fluoresc.*, **13**, 315 (2003)).

[‡] Показано, что доступные образцы ДМСО (без специальной очистки) содержат ионы Fe(II) и Cu(II) в концентрации до 3 ммоль·л⁻¹ (см. X.Qiao, S.Chen, L.Tan, H.Zheng, Y.Ding, Z.Ping. *Magn. Reson. Chem.*, **39**, 207 (2001)).

максимумами флуоресценции анионов соответствующих амидоацетофенонов, являющихся основными продуктами реакции. Превращения изученных гидропероксидов представлены на схеме 1.

Схема 1

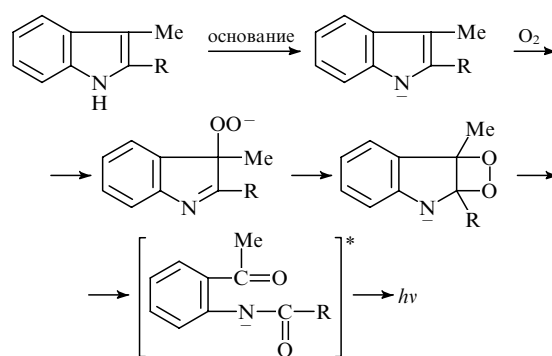


R = 4-MeOC₆H₄ (10), Me (11).

Работы^{1,2,7,8} стимулировали интерес к ХЛ индолов. В 1967–1968 гг. группа химиков из Японии опубликовала серию из четырех работ,^{9–12} посвященных изучению ХЛ индолов, а позднее работу¹³, примыкающую к этой серии. В исследовании⁹ был выполнен поиск ХЛ уже среди 42 соединений в условиях А9 и Б9. Условия А9 — 1 мл раствора образца в щелочном (0.1 моль·л⁻¹ КОН) растворе этанола смешивали с 1 мл водного раствора, содержащего Н₂О₂ (1.5%) и К₃Fe(CN)₆ (1.5%); условия Б9 — 1 мл раствора образца (1 ммоль·л⁻¹) в ДМСО смешивали с 1 мл водного раствора КОН (5 моль·л⁻¹). Некоторые данные из этой работы представлены в табл. 1. Сравнение результатов, полученных в условиях Б1 и Б9, показало, что для 2,3-диметилиндола они близки, но для 3-метилиндола и 2-метилиндола сильно расходятся. Это кажется странным, поскольку условия Б1 и Б9 формально различаются лишь концентрациями образцов и воды в растворе ДМСО.

В работе⁹ сообщено также о ХЛ пероксидов: соединения 11 и 2,3-диэтилиндоленил-3-гидропероксида. Хемиллюминесценция 2,3-диметилиндола и гидропероксида 11 была изучена^{10,11} более подробно в условиях, схожих с Б1. Авторы установили, что для ХЛ 2,3-диметилиндола необходим кислород, а для ХЛ соединения 11 — он не нужен. Конечным продуктом и окисления 2,3-диметилиндола, и щелочного распада гидропероксида 11 является *o*-ацетамидоацетофенон. Максимумы спектров ХЛ 2,3-диметилиндола и соединения 11 расположены при 520 нм, что соответствует максимуму спектра флуоресценции *o*-ацетамидоацетофенона. Появились веские основания предполагать, что *o*-ацетамидоацетофенон является эмиттером ХЛ, а соединение 11 — интермедиатом автоокисления 2,3-диметилиндола. В работе¹¹ изучен ряд производных индола: 2,3-диметилиндола, 2,3,5-триметилиндола, 2,3-диметил-5-метоксииндола. Положение спектральных максимумов ХЛ этих соединений 520, 532 и 548 нм соответственно. Установлено, что спектральные максимумы ХЛ совпадают с положением максимумов ХЛ соответствующих 3-гидропероксидов и максимумов флуоресценции соответствующих амидоацетофенонов. Превращения, приводящие к ХЛ, представлены на схеме 2. Она отличается от авторской схемы тем, что на последней дополнительно были указаны изомерные формы возбужденных анионов с заместителями —CCH₂O⁻ и —COC—NH₂.

Схема 2



В работе¹² исследовано влияние заместителей в положениях 5 и 6 в рядах производных 2,3-диметилиндола (8 веществ) и гидропероксида 11 (4 вещества) на хемиллюминесцентные свойства соединений. Были найдены линейные зависимости логарифма выхода света от функции Гаммета (σ) с коэффициентами пропорциональности (ρ), равными —1.24 для ряда индолов и —2.04 для ряда пероксидов. При построении зависимостей для заместителей в положениях 6 и 5 были взяты значения σ , соответствующие заместителям в положениях *пара* и *мета*. Интерпретация найденных корреляционных зависимостей затруднена тем, что выход света в хемиллюминесцентной реакции определяется произведением трех сомножителей: химическим выходом по световому пути, выходом хемивозбуждения и выходом люминесценции; каждый из сомножителей зависит от строения исходного соединения.

В 1968 г. группа химиков из США опубликовала результаты исследования ХЛ свыше 50 производных индола в системе ДМСО–Bu⁺OK.¹⁴ На основе анализа обширного экспериментального материала авторами сделан вывод, что наиболее эффективными по выходу света хемиллюминофорами в этой системе являются 3-алкилиндола, а именно 5-бензилокси-3-метилиндола, 3-метил-5-метоксииндола, 3-метилиндола, 3,5-диметилиндола, 3-этилиндола (ряд приведен в порядке убывания рассматриваемого параметра). Спектры ХЛ 3-метилиндола (с учетом самопоглощения растворов $\lambda_{\text{max}} \approx 500$ нм, без коррекции — 490 нм) и 2,3-диметилиндола (соответственно $\lambda_{\text{max}} \approx 530$ и 516 нм) совпадают со спектрами флуоресценции анионов *o*-формаидоацетофенона и *o*-ацетамидоацетофенона соответственно (рис. 1).

Анионы ациламида идентифицированы как первично возбужденные продукты автоокисления индолов и эмиттеры ХЛ. Было показано, что исходным субстратом окисления является анионная форма соответствующего производного. Авторы также привели схему превращений для 3-метилиндола, которая аналогична схеме 2. Наиболее важными элементами схемы являются образование пероксидного интермедиата и его превращение в нестойкий 1,2-диоксетан. Квантовый выход ХЛ 3-метилиндола составляет $(1.5 \pm 0.6) \cdot 10^{-3}$ Эйнштейн·моль⁻¹, следовательно, при химическом выходе *o*-формаидоацетофенона 0.4, его квантовом выходе люминесценции в условиях реакции, равном 0.2, выход возбуждения аниона *o*-формаидоацетофенона в реакции составляет ~ 0.02 .

Следует отметить несовпадение спектральных данных по ХЛ 2,3-диметилиндола и гидропероксида 11 из работ разных авторов. Оно связано со сложностью экспериментального получения спектров слабосветящихся объектов, интенсивность свечения которых изменяется во времени. Другой

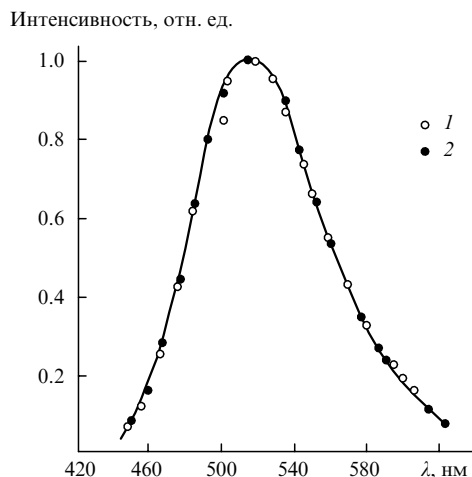


Рис. 1. Спектры хемилюминесценции 2,3-диметилиндола (1) и флуоресценции *o*-ацетидацетофенона (2).

момент — это совпадение или несовпадение спектров ХЛ со спектрами флуоресценции предполагаемых эмиттеров.

В общем случае спектры хеми- и фотолуминесценции могут не совпадать. Например, несовпадение спектров отмечено в работах^{15–17} при сравнении ХЛ, сопровождающей распад некоторых замещенных 1,2-диоксетанов, с фотолуминесценцией карбонильных соединений — продуктов распада этих диоксетанов, т.е. эмиттеров ХЛ. Но если в исследованиях^{15,16} установлено различное влияние среды при фото- и хемивозбуждении, то в работе¹⁷ различия (на десятки нанометров) спектров ХЛ и флуоресценции обусловлены, по мнению авторов, особенностями строения реагентов. Наличие объемных заместителей, таких как антрилфенольный фрагмент, приводят к различной стереохимии электронно-возбужденного состояния эмиттера ХЛ — соответствующего антрилфенол-замещенного кетозфира, заселяемого в химической реакции и при поглощении фотона. Подобным наблюдениям можно дать следующую качественную интерпретацию.

Фотовозбуждение — вертикальный франк-кондоновский излучательный переход при неподвижных ядрах молекулярной системы. Переход происходит между спектроскопическими минимумами на многомерных поверхностях потенциальной энергии (ППЭ) основного и возбужденного состояний, в данном случае, кетозфира.

Хемивозбуждение — существенно более сложный процесс. Оно происходит при горизонтальном переходе — при перегруппировке конфигурации атомных ядер, т.е. при движении изображающей точки вдоль координаты реакции по ППЭ основного состояния из потенциальной ямы реагента (диоксетана) в потенциальную яму продукта (кетозфира). На «полпути» система попадает в область, где ППЭ основного и возбужденного состояний сближены (область квазипересечения), «по инерции» она переходит на ППЭ возбужденного состояния (конечно, вдали от минимума) и продолжает движение по ней в направлении спектроскопического минимума. При этом молекула может задержаться в другой локальной яме (соответствующей конформеру продукта) и оттуда совершить излучательный переход на основную поверхность (рис. 2). Поэтому спектр ХЛ будет отличаться от спектра, испускаемого при фотовозбуждении.

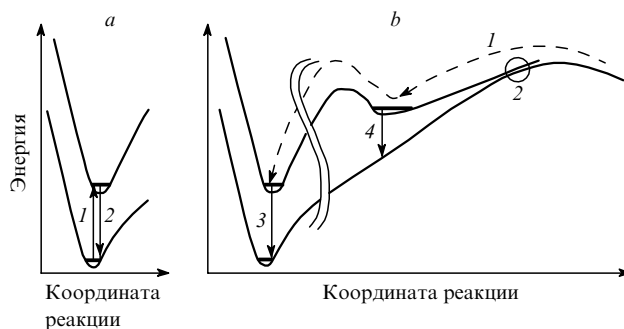


Рис. 2. Схема переходов между поверхностями потенциальной энергии.

a — фотолуминесценция: 1 — поглощение фотона (вертикальный излучательный переход из спектроскопического минимума), 2 — флуоресценция (вертикальный излучательный переход из спектроскопического минимума возбужденной поверхности).

b — хемилюминесценция: 1 — хемивозбуждение (горизонтальный безызлучательный переход на возбужденную поверхность), 2 — область квазипересечения поверхностей потенциальной энергии, 3 — вертикальный излучательный переход из спектроскопического минимума (спектр ХЛ совпадает со спектром флуоресценции), 4 — вертикальный излучательный переход из локального минимума (спектр ХЛ не совпадает со спектром флуоресценции).

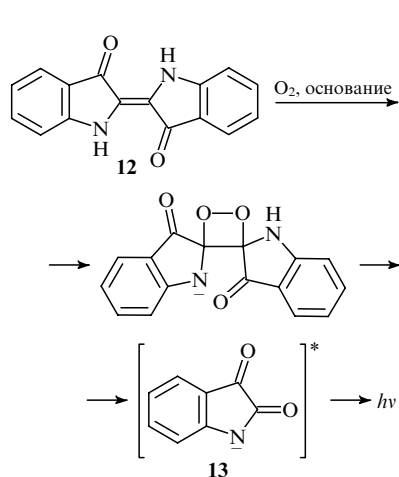
2. Хемилюминесценция индолов в отсутствие основания

Отмеченная выше работа¹³ занимает особое положение, и причина этого в том, что во всех предыдущих работах ХЛ индолов наблюдали в сильнощелочной среде, а в ней сообщается о ХЛ 3-метилиндола, индола и 3-фенилиндола в реакции с пербензойной кислотой в хлороформе в отсутствие основания. Интенсивность ХЛ в этих условиях крайне низка, и ее спектр не измеряли.

Обнаружена ХЛ триптофана (2) в серной кислоте (~ 0.2 моль $\cdot$ л⁻¹) при окислении ионами Се(IV) (см.¹⁸), а также пероксоазотной кислотой (ON₂O₂H) (см.¹⁹), которую получали в реакционном сосуде при смешивании растворов Н₂О₂ (0.25 моль $\cdot$ л⁻¹) и КNO₂ (0.1 моль $\cdot$ л⁻¹) непосредственно в ходе опыта. В сходных условиях наблюдали²⁰ сенсibilизированную трехвалентным тербием ХЛ триптофана при окислении пероксоазотной кислотой. Интенсивность ХЛ в присутствии Tb(III) в концентрации 0.02 моль $\cdot$ л⁻¹ увеличивается более чем в 5 раз. Спектры ХЛ в отсутствие сенсibilизатора, полученные в работах^{19,20}, не совпадают (максимумы при 550 (см.¹⁹) и 525 нм (см.²⁰)).

III. Хемилюминесценция индолов без раскрытия пиррольного цикла

Авторы работы²¹ наблюдали ХЛ индиго (12) при окислении воздухом в присутствии сильной щелочи в ДМСО и ДМФА. Квантовый выход ХЛ достигает $5.3 \cdot 10^{-4}$ Эйнштейн $\cdot$ моль⁻¹. Стабильным продуктом и вероятным эмиттером реакции является анион изатина (индол-2,3-диона) (13). Авторы предположили образование в ходе реакции промежуточного диоксетана по двойной связи 2–2' индиго (схема 3).

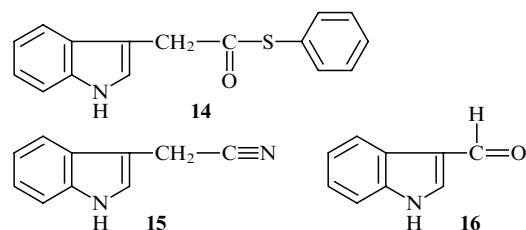


Хемилуминесцентная реакция характеризуется сложной кинетикой и пока не изучена. Наиболее интригующими моментами являются следующие: узкий температурный диапазон (9–12°C), в котором наблюдается ХЛ; неожиданное резкое повторное разгорание ХЛ через 3–4 мин после начала реакции (рис. 3) и гигантское усиление ХЛ при повторном введении раствора NaOH в реакционную смесь.

IV. Диоксетаноны, диоксетанимины и рекордная хемилуминесценция диоксетанов

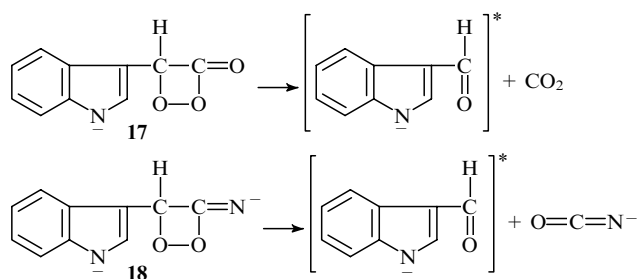
1. Диоксетаноны и диоксетанимины

В 1976 г. биохимики из Бразилии²² обнаружили ХЛ тиоэфира индол-3-илуксусной кислоты **14** и индол-3-илацетонитрила (**15**) в азириванном растворе ДМСО (при концентрации образцов 0.6 ммоль·л⁻¹) в присутствии Bu^tOK (4 ммоль·л⁻¹). Спектральный максимум ХЛ в обоих случаях находится при 435 нм, что соответствует максимуму люминесценции альдегида **16**, который также найден в продуктах реакции.



Авторы предположили, что интермедиатами, предшествующими появлению возбужденного альдегида, являются диоксетанон **17** и диоксетанимин **18**, показанные на схеме 4 (мы взяли на себя смелость изобразить индолный фрагмент в виде аниона, что соответствует как условиям реакции, так и условиям получения спектра люминесценции альдегида **16**, представленного в работе²²).

Схема 4



По мнению авторов, наблюдаемая ХЛ испускается хемивозбужденной молекулой альдегида **16** в синглетном состоянии. В работе²² приведен спектр фотолуминесценции соединения **16** в сильнощелочном дезаэрированном ДМСО (рис. 4). С учетом двухполосной структуры спектра (напомним, что спектр флуоресценции индола в этаноле имеет одну полосу при 330 нм) и отсутствия в растворе кислорода (тушителя фосфоресценции) можно предположить, что длинноволновое излучение соединения **16** является фосфоресценцией. Следовательно, основным хемивозбужденным продуктом будет альдегид **16** в триплетном состоянии. Это соответствует и результатам работ^{23–26}, а именно тому, что при распаде диоксетаниминов выход хемивозбужденных моле-

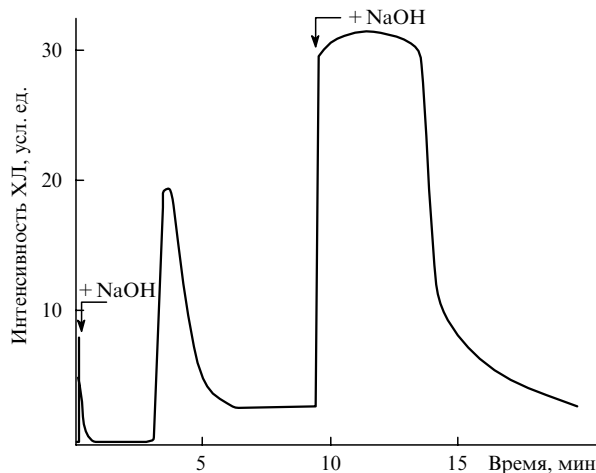


Рис. 3. Кинетика хемилуминесценции в азириванном растворе индиго (**12**) в ДМФА. Стрелками указаны моменты добавления раствора NaOH.

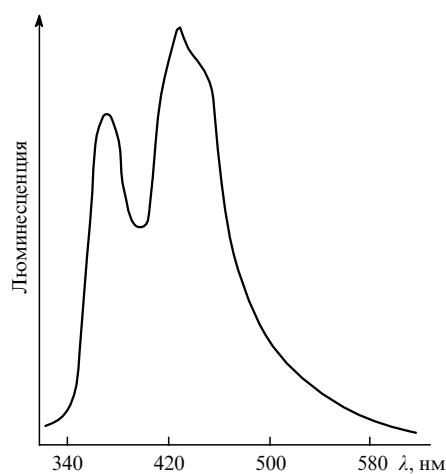


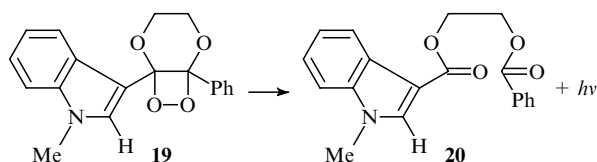
Рис. 4. Спектр фотолуминесценции альдегида **16** (1.72 ммоль·л⁻¹) в дезаэрированном ДМСО в присутствии Bu^tOK (15 ммоль·л⁻¹); λ_{возб} = 300 нм.

кул в триплетном состоянии на несколько порядков превосходит выход молекул в синглетном состоянии.

Интересной особенностью ХЛ соединения **14** является то, что при определенных условиях (начальной концентрации > 0.7 ммоль $\cdot$ л $^{-1}$, температуре реакционной среды $< 44^\circ\text{C}$) в спектре кроме основной полосы при 435 нм появляется полоса при 525 нм. Авторы показали, что за испускание в зеленой полосе спектра отвечает эксиплекс, образованный возбужденной молекулой **16** и молекулой **14**. (Это также указывает на то, что возбужденная молекула **16** находится в триплетном состоянии, поскольку образование эксиплекса возбужденной молекулой **16** в синглетном состоянии маловероятно.)

2. Рекордная хемилюминесценция диоксетанов

Среди индольных диоксетанов известно соединение **19**, которое при нагревании от -46°C до комнатной температуры превращается в диэфир **20**.²⁷



Характеристики ХЛ диоксетана **19** уникальны, по крайней мере среди органических хемилюминофоров. Максимум спектра ХЛ в неполярных растворителях (например, в гексане) находится в УФ-области (320 нм), т.е. в результате хемивозбуждения огромная порция энергии (> 377 кДж $\cdot$ моль $^{-1}$) переходит из «химической» формы в электронное возбуждение. Хемивозбуждение в ходе перегруппировки соединения **19** в диэфир **20** необычайно эффективно — его выход превышает 0.5 (выход ХЛ — 0.036). В полярных растворителях (MeCl, тетрагидрофуране, CH₂Cl₂, ацетоне) в спектре ХЛ появляется пик при 400–415 нм. Его относят к испусканию света «внутримолекулярным эксиплексом», возбуждаемым при переносе заряда между индольным и бензоатным хромофорами. Однако попытка синтезировать флуоресцирующую молекулу с геометрией предполагаемого эксиплекса не удалась.

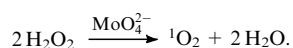
Получены^{28,29} относительно устойчивые при комнатной температуре индольные диоксетаны. Повышение устойчивости достигнуто ацилированием атома азота индольного фрагмента.

V. Индолы и активные частицы

1. Индолы и синглетный кислород

Одним из способов синтеза диоксетанов является присоединение синглетного кислорода по связи C=C.³⁰ Эта реакция использована для получения индолсодержащих диоксетанов по связи C(2)—C(3) с целью их последующего хемилюминесцентного определения.

В работе³¹ синглетный кислород получали окислением молибдата натрия пероксидом водорода:



В этом процессе молибдат играет роль катализатора диспропорционирования пероксида водорода, скорость генерирования синглетного кислорода равна

Таблица 2. Выход света в реакциях индола и его производных.

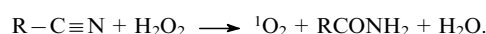
Соединение	Σ_{200} , усл. ед.	Относительно индола
Мелатонин (<i>N</i> -ацетил-5-метокситриптамин)	$1.2 \cdot 10^8$	364.0
3-Метилиндола	$7.5 \cdot 10^6$	23.0
Индол-3-илуксусная кислота	$6.1 \cdot 10^6$	19.0
Серотонин (5-гидрокситриптамин)	$1.5 \cdot 10^6$	5.0
5-Гидроксииндол-3-илуксусная кислота	$1.4 \cdot 10^6$	4.0
5-Гидроксииндол	$8.9 \cdot 10^5$	3.0
5-Гидрокситриптофан	$6.5 \cdot 10^5$	2.0
Триптамин	$3.4 \cdot 10^5$	1.0
Индол	$3.3 \cdot 10^5$	1.0
Триптофан	$3.6 \cdot 10^4$	0.1
Индол-3-карбальдегид	$1.2 \cdot 10^4$	0.04
Этанол (контрольный опыт)	$2.0 \cdot 10^3$	—

Примечание. Условия реакции: растворы H₂O₂ и молибдата натрия — водные, индолы растворены в EtOH, pH смеси ~ 10 .

$4 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ при концентрации H₂O₂ более 0.07 моль $\cdot$ л $^{-1}$, а MoO₄²⁻ — 1 ммоль $\cdot$ л $^{-1}$ (см.³²). Данные о выходе света за первые 200 с (Σ_{200}) в условиях реакции, когда последовательно смешивали порции по 100 мкл растворов H₂O₂ (0.1 моль $\cdot$ л $^{-1}$), производного индола (1 ммоль $\cdot$ л $^{-1}$) и MoO₄²⁻ (0.02 моль $\cdot$ л $^{-1}$), представлены в табл. 2.

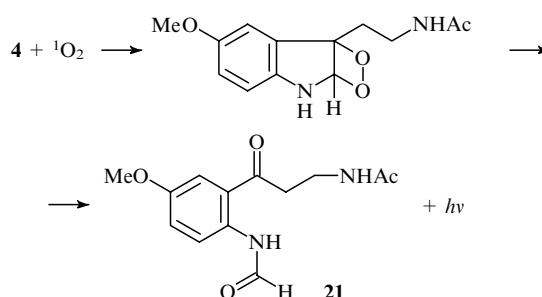
Используя проточную реакционную ячейку и повысив температуру реакционной смеси, авторы получили предел обнаружения соединения **4** около $2 \cdot 10^{-9}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ (объем пробы 100 мкл), при этом сигнал ХЛ линейно зависел от концентрации мелатонина (**4**) в диапазоне 10^{-8} – 10^{-3} моль $\cdot$ л $^{-1}$.

В работе³³ синглетный кислород получали реакцией между нитрилами и пероксидом водорода³⁴



Авторы статьи³³ предположили присоединение ${}^1\text{O}_2$ к двойной связи C(2)—C(3) и последующие реакции в соответствии со схемой 5:[¶]

Схема 5

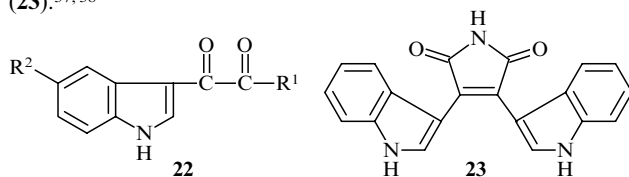


Это гипотетическая схема. В работе³³ посредством ингибиторного анализа (тушение ХЛ добавками 1,4-дизабцикло[2.2.2]октана и диметилфурана) аргументировано участие в ней синглетного кислорода. Образование *N*¹-ацетил-*N*²-формил-5-метоксикинурамина (**21**) при окислении

¶ Схема 5 воспроизведена с исправлениями ошибок в структурных формулах.

мелатонина синглетным кислородом было доказано в исследовании³⁵.

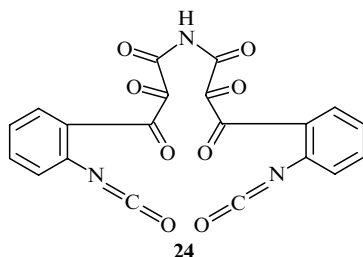
В условиях, сходных с условиями наблюдения ХЛ в работе³³, обнаружена ХЛ 3-гликоксильных производных индола (**22**)³⁶ и 3,4-бис(индол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-диона (**23**).^{37, 38}



$R^1 = \text{Cl, OH, OMe, NMe}_2$;
 $R^2 = \text{H, OH, OPh}$.

Для 3-индолгликоксилихлорида авторы предположили возможность двух маршрутов реакций, приводящих к испусканию света (схема 6).

Спектральный максимум ХЛ соединения **23** находится около 430 нм; эмиттер ХЛ — октакарбонил **24**, который получается при перегруппировке сложной молекулы, включающей три (!) диоксетановых фрагмента. Эта молекула образуется в результате присоединения трех молекул синглетного кислорода к пиррольному и двум индольным фрагментам (по двойным связям C(2)=C(3)).



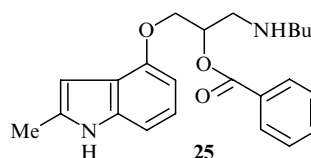
Отметим, что среда при наблюдении ХЛ в работах^{31, 32, 36–38} была щелочной, и авторы отметили значительное ослабление ХЛ при pH < 9. Возможно, в этом причина того, что в работе³⁹, где для генерирования $^1\text{O}_2$ использовали реакцию между пероксидом водорода и гипохлоритом в кислой среде, наблюдали лишь перенос энергии от димоля синглетного кислорода на индольный флуорофор — триптофан.

Хемилюминесценция индолов в присутствии пероксида водорода и гипохлорита в щелочной среде была применена для определения гипохлорита^{40, 41} и мелатонина⁴² (предел обнаружения — $5 \cdot 10^{-8}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) в водопроводной воде.

Ниже обсуждены работы по ХЛ индолов, в которой участие синглетного кислорода крайне вероятно, но недостаточно аргументировано.

В работе⁴³ для наблюдения ХЛ водный раствор индолов **1**, **2**, **5** сначала инкубировали в кислой среде в присутствии пероксида водорода и ионов Fe^{3+} , а затем добавляли раствор NaOH. Известно, что разложение H_2O_2 на O_2 и H_2O , которое катализируется ионами Fe^{3+} , взятыми в небольшой концентрации, протекает по радикально-цепному механизму с образованием промежуточных частиц $\text{HO}_2^\cdot$, $\text{HO}^\cdot$ и Fe^{2+} (см.⁴⁴). Образование синглетного кислорода в этих условиях вполне вероятно. Сообщено⁴⁵ о слабой ХЛ в системе $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Fe}^{3+}$ в видимой области спектра (вероятно, это люминесценция димоля синглетного кислорода).

В работе⁴⁶ исследована ХЛ бопиндолола (**25**) — фармацевтического препарата, применяемого для лечения сердечной аритмии и гипертонии.



Хемилюминесценция бопиндолола наблюдается в карбонатном буфере (pH 9.3) при окислении в процессе разложения H_2O_2 комплексным соединением Co(II) с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Максимум спектра ХЛ расположен при ~500 нм, в спектре присутствует дополнительный пик люминесценции димоля синглетного кислорода при 640 нм.

2. Индолы и карбонат-анион-радикал

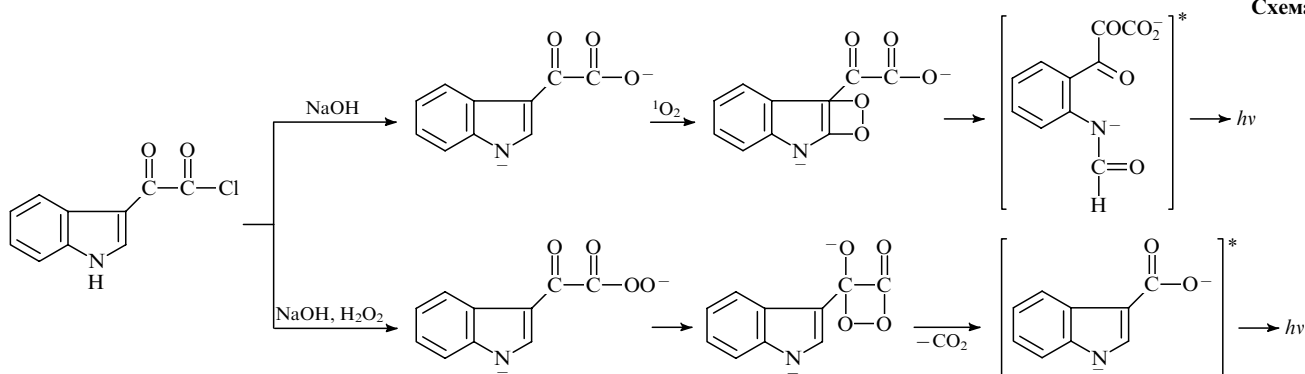
В работе⁴⁷ выявлена важная роль анион-радикала $\text{CO}_3^{\cdot-}$ в окислении и в ХЛ мелатонина (и, вероятно, не только мелатонина). В присутствии этого радикала интенсивность ХЛ увеличивается в несколько раз. В реакционной среде $\text{CO}_3^{\cdot-}$ появляется в результате окисления введенного в систему аниона HCO_3^- . В аэрированных щелочных растворах, особенно в щелочном ДМСО, анионы HCO_3^- появляются в результате поглощения CO_2 из воздуха.

3. Индолы и супероксид-анион-радикал

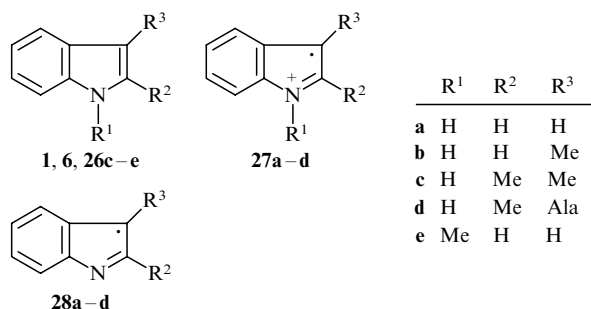
Ответ на вопрос о способах участия супероксид-анион-радикала в ХЛ индолов получен в работах^{48–50}.

В исследовании⁴⁸ изучены реакции радиолиза продуктов одноэлектронного окисления ряда индолов **1**, **6**, **26с–е**. Было установлено, что первичными продуктами одноэлектрон-

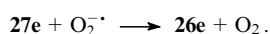
Схема 6



ного окисления соединений **1**, **6**, **26c,d** в нейтральных растворах являются соответствующие радикалы **28a–d**, а катион-радикалы **27a–d** образуются только в кислых растворах.



При взаимодействии катион-радикалов (показано для индола **27e**) с $O_2^{\cdot -}$ происходит перенос электрона



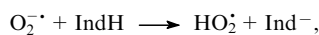
Авторы отметили, что в этой реакции мог бы образоваться синглетный кислород.

При взаимодействии радикалов **28** с $O_2^{\cdot -}$ появляется соответствующий 3-гидропероксид-анион, который дает начало световому пути превращений (см. схему 1).

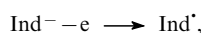
В работах^{49,50} супероксид-анион-радикал получали электрохимическим способом — восстановлением растворенного кислорода в ацетонитриле в присутствии перхлората тетраэтиламмония (фоновый электролит) на электродах из пиролитического графита. Синхронно регистрировали циклическую вольтамперограмму и сигнал ХЛ. Оказалось, что вольтамперограммы в присутствии и в отсутствие соединений, не способных быть донорами протонов, практически идентичны. В присутствии индолов — доноров протонов — снижается анодный ток, а катодный ток увеличивается; кроме того, появляется дополнительный пик анодного тока (при отсутствии пары в катодной области). Хемиллюминесценция регистрируется в момент «прохода» дополнительного анодного пика.

Авторы объяснили полученные результаты совокупностью следующих процессов:

1) переносом протона от производного индола (IndH) на супероксид-анион-радикал с образованием гидропероксидного радикала и малоподвижного аниона индольного соединения



2) одноэлектронным электроокислением аниона Ind^- в области дополнительного пика анодного тока с образованием радикала $\text{Ind}^{\cdot}$



3) присоединением радикала $\text{HO}_2^{\cdot}$ (или $O_2^{\cdot -}$) к радикалу $\text{Ind}^{\cdot}$ по атому углерода в положении 3 индольного фрагмента,

4) далее по схеме 1.

Таким образом, можно сделать вывод, что супероксид-анион-радикал необходим для возникновения ХЛ индолов при условии их предварительного одноэлектронного окисления.

Электрохемиллюминесценция триптофана и индола в присутствии пероксида водорода была использована⁵¹ для их определения с пределом обнаружения 10^{-7} моль $\cdot$ л $^{-1}$.

4. Индолы как неспецифические участники хемиллюминесцентного процесса

В ряде хемиллюминесцентных реакций индолы участвуют в качестве восстановителей, а также лигандов в комплексных соединениях. На основе таких реакций разработаны способы хемиллюминесцентного детектирования ряда биологически активных индольных соединений в высокоэффективной жидкостной хроматографии и в проточно-инжекционном анализе.^{52–60} Они характеризуются высокой чувствительностью: предел обнаружения соединения **3** (см.⁵⁴) составил 2, триптамина — 5 (см.⁵⁵), соединения **4** — 20 (см.⁵⁶), соединения **5** — 0.6 (см.⁵⁷), 115 (см.⁵⁸), соединения **2** — 10 (см.⁵⁵), 25 (см.⁵⁹), 2.5 нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ (см.⁶⁰).

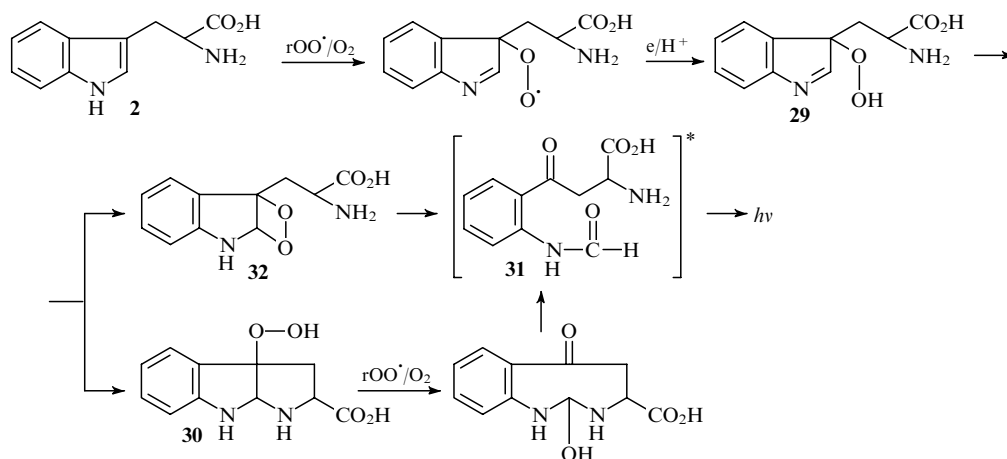
Авторами статей^{61,62} разработаны высокочувствительные способы хемиллюминесцентного детектирования индолов в виде дансилпроизводных (для *N*-метилтриптамина, 5-метилтриптамина, α -метилтриптамина, буфотенина и псилоцина) и в виде производных 6-аминометилфталгидразида (для 5-гидроксииндол-3-илуксусной кислоты и α -метилсеротонина).

VI. Сверхслабое свечение биологических объектов

Сверхслабое свечение (ССС) биологических объектов⁶³ длительное время связывали с реакциями пероксидного окисления липидов.⁶⁴ В последние годы появились веские основания предполагать, что окислительная деградация аминокислот и белков также может вносить существенный вклад в СССР.

Обнаружена^{65,66} ХЛ бычьего сывороточного альбумина (БСА) при его окислении пероксинитритом в фосфатном буфере при pH 8. Исследование влияния добавок (20 мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$) дибромантрацена (ДБА) — тест на триплеты — и дифенилантрацена (ДФА) — тест на синглеты — показало, что добавка ДФА приводит к заметному росту интенсивности ХЛ. Это указывает на синглетную природу эмиттера в хемиллюминесценции БСА. При окислении пероксинитритом индивидуальных аминокислот было найдено, что только окисление триптофана сопровождается заметной ХЛ.⁶⁶ Максимум испускания и БСА, и триптофана (**2**) находится в области 475–575 нм. Сделан вывод, что соединение **2** является субстратом окислительной ХЛ белков.

В работах^{67,68} изучена ХЛ, сопровождающая инициированное окисление белков и аминокислот. В качестве водорастворимого радикального инициатора был использован 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН). Оказалось, что из всех изученных аминокислот лишь тирозин и триптофан проявляют заметную окислительную ХЛ. Сравнение хемиллюминесцентного поведения этих аминокислот и некоторых белков в присутствии ААРН показало наличие общих закономерностей генерирования света при инициированном свободнорадикальном окислении. Авторы работ^{67,68} предложили схему 7 для механизма ХЛ триптофана — ключевого участника процессов «белкового» СССР. Схема основана в значительной мере на привлечении знаний об окислительной деградации этой аминокислоты, инициированной иными способами и в других условиях. Гидропероксид триптофана (**29**) — один из основных промежуточных продуктов реакции соединения **2** с одноэлектронными окислителями в присутствии кислорода.^{48,67–71} Интермедиат **30** был обнаружен в продуктах фотоокисления соединения **2**.⁷²



На схеме 7 показаны маршруты реакций только светового пути (без учета темновых путей) и ключевые пероксидные интермедиаты, которые могут получаться в окислительных процессах с участием различных форм активного кислорода. Такая схема была использована также для описания ХЛ триптофана при его окислении синглетным кислородом в работе⁷³.

В недавних работах по окислению синглетным кислородом соединения **2** (как свободного,⁷⁴ так и в составе белков и пептидов⁷⁵) основной акцент сделан на том, чтобы определить и структурно охарактеризовать продукты и интермедиаты. Однако, по признанию авторов исследования⁷⁴, несмотря на достигнутые к настоящему времени успехи, для установления детального механизма ХЛ при окислении соединения **2** еще предстоит немало сделать.

В работе⁷⁴ были изучены хемилюминесцентные свойства гидропероксида **30**. Он образуется в виде *цис*- и *транс*-изомеров при окислении соединения **2**. Установлено, что их термическая трансформация сопровождается свечением, спектр которого имеет две полосы — с максимумами около 436 и 510 нм. Коротковолновая полоса (436 нм) соответствует спектру флуоресценции формилкинурина (**31**), происхождение же длинноволновой полосы в настоящее время точно не установлено. По мнению авторов статьи⁷⁴, природа последней полосы испускания может быть различной — от образования эксиплексов до особенностей влияния внутримолекулярной водородной связи (между N—H и карбонильной группами) в молекуле **31** на процесс хемивозбуждения. Следует сказать и о том, что интенсивность ХЛ молекул гидропероксида **30** усиливается при введении щелочи, что было отнесено на счет каталитического ускорения распада диоксетанового интермедиата **32**, который, по-видимому, также может образовываться из гидропероксида **30**.

Следует отметить, что современные работы по изучению взаимодействия активных форм кислорода с триптофаном и ХЛ, сопровождающей эти процессы, являются продолжением работ по стимулированной ХЛ триптофана, глицилтриптофана и белков, выполненных И.И. Сапежинским и его учениками.⁷⁶ Знакомство с его работами на новом витке исследований — это и дань уважения предшественникам, и существенная экономия времени, ибо, как отмечено в интервью Н. Турро журналу *Spectrum*: «Three months in the laboratory can save a couple of hours in the library.»[†]

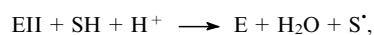
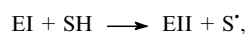
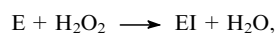
[†] *Spectrum*, **17** (1), 3 (2004).

VII. Хемилюминесценция индолов в ферментативных процессах

Исследования ХЛ при окислении индолов в ферментативных системах начались в конце 1960-х годов.⁷⁷ Основными объектами изучения в 1970–1990-х годах были: среди индолов — индол-3-илуксусная кислота (**5**), а среди ферментов — пероксидазы, выделяемые из органов животных и растений.

Информация о классификации и современном состоянии исследований пероксидаз растений представлена в публикациях^{78–83}. В контексте данного обзора мы отметим, что пероксидаза, в частности выделяемая из корней хрена (HRP), является гемсодержащим ферментом (молекулярная масса ~40 000), который в присутствии пероксида водорода реализует свою пероксидазную функцию, а в отсутствие H₂O₂ (или RO₂H) и в присутствии O₂ работает как оксидаза. Окисление соединения **5**, катализируемое HRP, — довольно сложный процесс. В ходе этого процесса исходный фермент переходит в несколько каталитически активных и пассивных форм, которые различаются окислительным состоянием гемового железа (Fe(II), Fe(III) и Fe(IV)) и его окружением. Соединение **5** окисляется по нескольким маршрутам, различающимся как интермедиатами, так и продуктами. В отличие от пероксидаз животного происхождения HRP имеет специфический центр связывания соединения **5**.

Пероксидазный цикл «работает» с различными окисляющимися субстратами; его можно представить последовательностью трех превращений:



где E, EI, EII — нативный фермент и его формы: соединение I и соединение II, а SH и S[•] — соответственно субстрат и продукт его одноэлектронного окисления.

Аэробный путь окисления у HRP высокоспецифичен к субстрату. Он начинается с образования тройного комплекса фермент—5—O₂, в котором происходит образование катион-радикала 5^{•+} и супероксид-анион-радикала. Катион-радикал 5^{•+} далее декарбоксилируется с образованием скатолил-радикала (Ind-3-CH₂[•]), который окисляется кислородом в пероксильный радикал. В нейтральной среде катион-радикал 5^{•+} быстро депротонируется с образованием незаряженного радикала, у которого декарбоксилирование протекает более чем в 100 раз медленнее.

Переход от пероксидазного окисления к аэробному (оксидантному) зависит от pH и отношения концентраций HRP и соединения **5**.

В пуле радикалов, образующихся в системе $5-HRP-H_2O_2-O_2$, протекает целый ряд радикальных (в том числе и цепных) реакций как при пероксидазном, так и при оксидантном действии фермента, некоторые из реакций сопровождаются хемилюминесценцией и испусканием света.⁸⁴

Особенно интересны реакции, сопровождающие аэробное окисление, как высокоспецифичные к индолу **5**. Вначале внимание исследователей привлекла ХЛ соединения **5** в ИК-области спектра, которая связана с появлением возбужденных молекул кислорода в состоянии $^1\Delta_g$. Образование синглетного кислорода при аэробном окислении соединения **5**, катализируемом пероксидазой, предполагалось авторами работ^{85,86}, а надежно установлено в исследовании⁸⁷ по испусканию света в ИК-диапазоне (~ 1270 нм), которое является «визитной карточкой» синглетного кислорода. Механизм образования синглетного кислорода, предполагавшийся в работах^{85,86}, основан на переносе энергии от первично возбужденного триплетта индол-3-карбальдегида на кислород, а в работах^{87,88} — это механизм Рассела⁸⁹ диспропорционирования радикалов $Ind-3-CH_2OO^\bullet$ с образованием шестицентрового тетраоксида, распадающегося на кислород, спирт и карбонильное соединение. Отметим, что ХЛ соединения **5** в ИК-области наблюдается лишь при $pH < 5$ и пропадает в нейтральной среде.⁸⁷ Время жизни синглетного кислорода в D_2O более чем в 10 раз продолжительнее, чем в H_2O , поэтому ХЛ в ИК-области при окислении соединения **5** значительно интенсивнее в тяжелой воде, где и была обнаружена в экспериментах, описанных в работе⁸⁷.

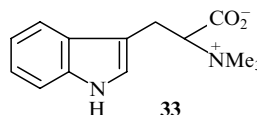
Синглетный кислород кроме полосы испускания в ИК-области спектра (1270 нм) имеет также полосу испускания димолей синглетного кислорода в красной области спектра (635 нм).^{85,86}

В работах^{90–92} были получены спектры ХЛ в области 350–570 нм при аэробном окислении соединения **5** в нейтральной среде. Спектры ХЛ в системе $HRP-5-O_2$ представлены на рис. 5. Условия регистрации спектров **1** и **2** очень похожи: концентрация HRP — $0.4 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (**1**) и

$1.1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (**2**), концентрация соединения **5** — соответственно 0.2 и $0.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$, pH — 7.0 и 7.4 , температура — 25 и 37°C . Однако спектры заметно различаются, несмотря на то что основной максимум во всех трех случаях находится в области 410–430 нм. Авторы работы⁹¹ предположили наличие нескольких эмиттеров. Для проверки такого предположения мог бы подойти прием, рассмотренный в работе⁹³. Он заключается в регистрации кинетики ХЛ в нескольких, сравнительно узких спектральных диапазонах, соответствующих максимумам испускания предполагаемых эмиттеров. Если отношения интенсивностей света, регистрируемого по различным спектральным каналам, зависят от времени, то в этом случае можно предполагать, что в процессе ХЛ участвует несколько эмиттеров, возникающих на различных химических маршрутах. Постоянство отношений, наоборот, является аргументом в пользу единственного эмиттера.

Для оценки доли света, испускаемого димольми синглетного кислорода, в общем потоке испускаемого света были получены⁹² кинетические кривые ХЛ в присутствии и в отсутствие красного светофильтра, установленного между реакционным сосудом и фотоприемником. Оказалось, что при $pH 7.4$ испускание в красной области составляет малую долю испускаемого света, и форма регистрируемых кинетических кривых различна. При $pH 5$ кинетика ХЛ сильно отличается от наблюдаемой при $pH 7.4$: интенсивность ХЛ сильно падает, доля красного света увеличивается, а профили кинетических кривых становятся похожи. Установлено,⁹⁰ что ХЛ в системе $HRP-5-O_2$ наблюдается в области pH от 5 до 9 и выход света максимален при $pH 7$. Замена H_2O на D_2O в оптимуме pH сопровождается значительным снижением выхода света. Эти данные в совокупности со спектрально-кинетическими результатами⁹² свидетельствуют о том, что ХЛ в области 350–570 нм при нейтральном pH не является следствием генерирования синглетного кислорода по механизму, предложенному в работе⁹⁴.

Также было замечено,⁹⁰ что при добавлении ингибитора свободнорадикальных реакций (2,5-ди-*трем*-бутилгидрохинона) в концентрации $19 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ на кинетической кривой ХЛ проявляется период индукции, который сильно увеличивается с ростом pH от 5 до 7. Подробно влияние фенольных антиоксидантов на ХЛ в системе $HRP-5-O_2$ исследовано в работе⁹⁵. Среди ингибиторов аэробного окисления соединения **5** особого упоминания заслуживает гипафорин (**33**) — бетаин триптофана. По данным работы⁸⁰, между соединениями **33** и **5** возникает конкуренция за специфический центр связывания соединения **5** пероксидазой. Использование гипафорина в исследованиях ХЛ представляет интерес, прежде всего, как инструмент целенаправленного вмешательства.



Широкое использование HRP в анализе стимулировало интерес к поиску новых хемилюминогенных субстратов, в том числе и среди индолов.

Было найдено,⁹⁶ что 5-бром-4-хлориндол-3-ил- β -D-галактопиранозид (**34**) является эффективным хемилюминогенным субстратом в системе $HRP-H_2O_2-O_2$ при $pH 7-9$. Вероятно, окисление соединения **34** происходит в пероксидазном цикле (ХЛ не наблюдается в отсутствие H_2O_2 или при добавлении каталазы в реакционную смесь, а супероксиддис-

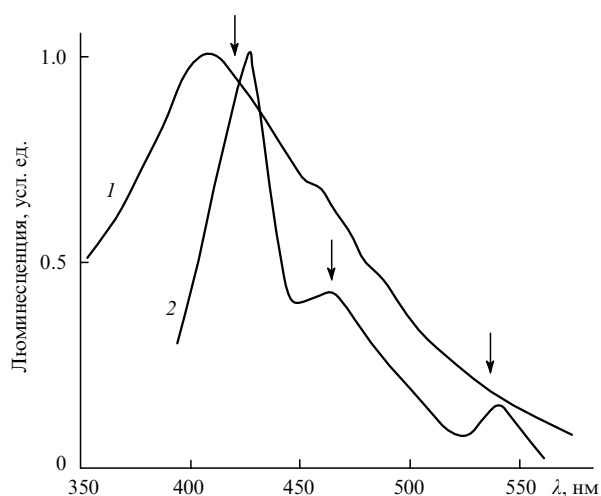
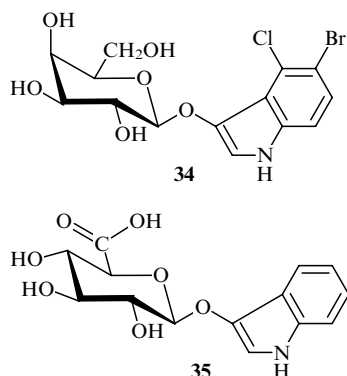


Рис. 5. Спектры хемилюминесценции в системе $HRP-5-O_2$ при нейтральном pH из работ⁹⁰ (**1**),⁹² (**2**).

Стрелками указано положение максимумов спектра из работы⁹¹.

мутаза не влияет на ХЛ). Интересно, что гликозид **35**, проявляющий окислительную ХЛ под действием реактива Фентона, в системе $\text{HRP} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{O}_2$ не проявляет ХЛ.^{97, 98}



Авторами статьи⁹⁹ выполнен поиск хемиллюминогенных субстратов среди 22 индолов в системе $\text{HRP} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{O}_2$ при pH 9.3 и температуре 37°C. Данные о хемиллюминесцентной активности этих соединений представлены в табл. 3. Подчеркнем, что, как и в работе⁹⁶, речь идет о ферментативном окислении в пероксидазном цикле (ХЛ отсутствует после термической инактивации фермента и в отсутствие H_2O_2). Анализ данных, представленных в табл. 3, особенно в сравнении с данными табл. 1 и 2, показал следующее. Во-первых, это влияние положения метоксигруппы в бензольном фрагменте (метоксилирование в положения 4 и 6 не влияет, а в положения 5 и 7 — снижает выход света в 5–12 раз). Во-вторых, влияние положения метильной группы среди метилиндолов, причем в порядке, отличном от того, что

Таблица 3. Выход света относительно индола при окислении индолов, катализируемом HRP.

Соединение	Выход света
2-Метилиндол	1672.0
2,5-Диметилиндол	221.0
3-Метилиндол	5.12
2,3-Диметилиндол	2.27
Мелатонин	1.41
6-Хлормелатонин	1.06
Индол	1.00
6-Метоксииндол	0.98
4-Метоксииндол	0.96
2-Иодмелатонин	0.67
5-Метилиндол	0.47
5-Метоксииндол-3-илуксусная кислота	0.31
N-Метилиндол	0.31
2-Метил-5-метоксииндол-3-илуксусная кислота	0.20
7-Метоксииндол	0.20
Индол-3-илуксусная кислота	0.10
5-Метоксииндол	0.08
2-Фенилиндол	0.04
6-Гидроксимелатонин	0
5-Гидрокситриптамиин (серотонин)	0
5-Метокситриптамиин	0
Триптофан	0

Примечание. Условия окисления: $[\text{HRP}] = 0.2 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$, pH 9.3, концентрация индолов — $1 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

был в неферментативных системах. В-третьих, гигантское (более чем в 1600 раз) различие выходов света у 2-метилиндола по сравнению с индолом.

При изучении ХЛ 2-метилиндола было установлено,⁹⁹ что повышение pH с 4.8 до 11.6 приводит к увеличению выхода света более чем в 1400 раз и снижению скорости потребления кислорода в 470 раз. Это означает, что ХЛ возникает при пероксидазном действии HRP, однако оксидазный цикл также функционирует и важен для ХЛ, на что указывает тушение ХЛ под действием супероксиддисмутазы.

Казалось бы, нет сомнений в последовательности реакций светового пути: субстрат в пероксидазном цикле испытывает одноэлектронное окисление, 2-метилиндол превращается в радикал; оксидазный цикл — поставщик радикалов $\text{O}_2^{\cdot-}$; радикал производного индола, соединяясь с $\text{O}_2^{\cdot-}$, образует анион 3-гидропероксида, а далее события развиваются по схеме 1. Однако в растворе при pH 9 анион диоксетана должен подвергаться быстрому гидролизу с образованием нейтрального диоксетана, а распад нейтрального диоксетана приводит к образованию *o*-ацетамидобензальдегида, у которого испускание с синглетного уровня лежит около 430 нм. Но максимум ХЛ 2-метилиндола расположен около 510 нм, что, вероятно, соответствует испусканию аниона ацетамидобензальдегида (максимум люминесценции аниона *o*-ацетамидоацетофенона около 520 нм, см. рис. 1). Можно предположить, что взаимодействие радикалов 2-метилиндола и $\text{O}_2^{\cdot-}$ происходит, если пиррольный фрагмент молекулы находится в гидрофобном кармане фермента, который защищает анион диоксетана от гидролиза. К этому предположению подталкивает и гигантское влияние структуры производного на ХЛ (см. табл. 3).

На примере исследования ХЛ в системе $5 - \text{HRP} - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}_2$ мы показали, что это непростое явление. И хотя известна ХЛ индолов в других ферментативных системах, мы не берем на себя смелость погружать читателя в этот вопрос далее, по крайней мере в этом обзоре.

VIII. Заключение

Исследования, начавшиеся как результат случайного совпадения, привели к множеству нетривиальных находок. Были получены соединения, которые мало уступают люциферинам по выходу хемивозбуждения. Были установлены механизмы хемиллюминесцентных превращений, которые, хотя и не универсальны, но охватывают широкий круг реакций с участием различных реагентов. Многие из найденных реакций легли в основу высокочувствительных методов анализа, другие — служат источником новых вопросов.

Обзор части публикаций по ХЛ индолов, а именно, работы по светоиндуцированной ХЛ триптофана и индол-3-илуксусной кислоты, не включены в настоящий обзор, так как рассмотрены нами ранее.¹⁰⁰

Подводя итог, невольно задаешь себе вопрос: случайно ли совпадение, что индольный фрагмент можно найти и в люциферинах, и в гормонах, регулирующих циркадный ритм, и в других метаболитах? Возможно, выражения «сиять от счастья» и «светиться от удовольствия» не лишены оснований и наполнены «биоллюминесцентным» смыслом?

Авторы благодарят за финансовую поддержку Отделение химии и наук о материалах Российской академии наук (программа 01-ОХНМ РАН) и Фонд содействия отечественной науке.

Литература

- G.E.Philbrook, J.B.Ayers, F.Garst, J.R.Totter. *Photochem. Photobiol.*, **4**, 869 (1965)
- F.McCapra, D.G.Richardson, Y.C.Chang. *Photochem. Photobiol.*, **4**, 1111 (1965)
- A.W.Berger, J.N.Driscoll, J.A.Pirog. *Photochem. Photobiol.*, **4**, 1123 (1965)
- G.E.Philbrook, J.R.Totter. *Techn. Rep. AD60279*. University of Georgia, Athens, 1964
- K.Hyland, C.Auclair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 531 (1981)
- R.F.Haseloff. *Anal. Chim. Acta*, **218**, 179 (1989)
- F.McCapra, Y.C.Chang. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 522 (1966)
- F.McCapra. *Quart. Rev. Chem. Soc.*, **20**, 485 (1966)
- N.Sugiyama, M.Akutagawa, T.Gasha, Y.Saiga, H.Yamamoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 347 (1967)
- N.Sugiyama, M.Akutagawa. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 240 (1967)
- N.Sugiyama, M.Akutagawa, H.Yamamoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 936 (1968)
- N.Sugiyama, H.Yamamoto, Y.Omote, M.Akutagawa. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 1917 (1968)
- Y.Omote, H.Yamamoto, K.Funasaki, M.Akutagawa, N.Sugiyama. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **42**, 3014 (1969)
- A.W.Berger, J.N.Driscoll, J.S.Driscoll, J.A.Pirog, H.Linschitz. *Photochem. Photobiol.*, **7**, 415 (1968)
- W.Adam, I.Bronstein, A.V.Trofimov. *J. Phys. Chem. A*, **102**, 5406 (1998)
- W.Adam, M.Matsumoto, A.V.Trofimov. *J. Org. Chem.*, **65**, 2078 (2000)
- M.Matsumoto, N.Watanabe, N.Hoshiya, H.K.Ijuin. *Chem. Rec.*, **8**, 213 (2008)
- A.A.Alwarthan. *Anal. Chim. Acta*, **317**, 233 (1995)
- Y.D.Liang, J.F.Song. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 100 (2005)
- M.Kaczmarek, S.Lis. *J. Alloys Compd.*, **451**, 186 (2008)
- J.Nikokavouras, G.Vassilopoulos. *Monatsh. Chem.*, **112**, 1239 (1981)
- N.Duran, K.Zinner, R.C.De Baptista, C.C.C.Vidigal, G.Cilento. *Photochem. Photobiol.*, **24**, 383 (1976)
- Y.Sawaki, Y.Ogata. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6313 (1977)
- Y.Ito, T.Matsuura, H.Kondo. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7105 (1979)
- Y.Ito, H.Yokoya, K.Kyono, S.Yamamura, Y.Yamada, T.Matsuura. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 898 (1980)
- D.T.Breslin, M.A.Fox. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11716 (1993)
- H.Nakamura, T.Goto. *Photochem. Photobiol.*, **30**, 27 (1979)
- W.Adam, M.Ahrweiler, K.Peters, B.Schmiedeskamp. *J. Org. Chem.*, **59**, 2733 (1994)
- W.Adam, D.Reinhardt. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1503 (1994)
- W.Adam, A.V.Trofimov. In *The Chemistry of Peroxides*. (Ed. Z.Rappoport). Wiley, Chichester, 2006. P. 1171
- T.Kawatani, J.-M.Lin, M.Yamada. *Analyst*, **125**, 2075 (2000)
- K.Boehme, H.D.Brauer. *Inorg. Chem.*, **31**, 3468 (1992)
- J.Lu, C.Lau, M.K.Lee, M.Kai. *Anal. Chim. Acta*, **455**, 193 (2002)
- E.McKeown, W.A.Waters. *Nature (London)*, **203**, 1063 (1964)
- E.A.de Almeida, G.R.Martinez, C.F.Klitzke, M.H.de Medeiros, P.Di Mascio. *J. Pineal Res.*, **35**, 131 (2003)
- M.Nakazono, Y.Sho, K.Zaitzu. *Anal. Sci.*, **19**, 123 (2003)
- M.Nakazono, A.Uesaki, K.Zaitzu. *Talanta*, **70**, 128 (2006)
- M.Nakazono, S.Nanbu, A.Uesaki, R.Kuwano, M.Kashiwabara, K.Zaitzu. *Org. Lett.*, **9**, 3583 (2007)
- P.F.de Violet, B.Veyret, P.Vincendeau, A.Caristan. *Photochem. Photobiol.*, **39**, 707 (1984)
- M.C.Cheregi, J.V.G.Mateo, J.M.Calatayud, A.F.Danet. *Rev. Chim. (Bucharest)*, **50**, 325 (1999)
- P.Fletcher, K.N.Andrew, A.C.Calokerinos, S.Forbes, P.J.Worsfold. *Luminescence*, **16**, 1 (2001)
- S.-L.Wei, L.-X.Zhao, X.-L.Cheng, J.-M.Lin. *Chin. J. Chem.*, **25**, 535 (2007)
- G.-N.Chen, X.-Q.Xu, J.-P.Duan, M.-M.He, F.Zhang. *Analyst*, **120**, 1699 (1995)
- W.G.Barb, J.H.Baxendale, P.George, K.R.Hargrave. *Trans. Faraday Soc.*, **47**, 462 (1951)
- В.С.Лебедев, И.В.Цыбанова, А.П.Руденко. *Журн. физ. химии*, **49**, 776 (1976)
- H.Y.Aboul-Enein, I.Kruk, K.Lichszeld. *Biospectroscopy*, **4**, 229 (1998)
- R.Hardeland, B.Poeggeler, R.Niebergall, V.Zelosko. *J. Pineal Res.*, **34**, 17 (2003)
- X.Shen, J.Lind, T.E.Erikson, G.Merényi. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 597 (1990)
- T.Okajima, T.Ohsaka. *Electrochim. Acta*, **47**, 1561 (2002)
- T.Okajima, T.Ohsaka. *J. Electroanal. Chem.*, **523**, 34 (2002)
- G.N.Chen, R.E.Lin, Z.F.Zhao, J.P.Duan, L.Zhang. *Anal. Chim. Acta*, **341**, 251 (1997)
- T.Nakagama, M.Yamada, S.Suzuki. *Anal. Chim. Acta*, **217**, 371 (1989)
- Y.T.Lee, C.W.Whang. *J. Chromatogr., A*, **771**, 379 (1997)
- N.W.Barnett, B.J.Hindson, S.W.Lewis. *Anal. Chim. Acta*, **362**, 131 (1998)
- A.J.Brown, C.E.Lenehan, P.S.Francis, D.E.Dunstan, N.W.Barnett. *Talanta*, **71**, 1951 (2007)
- G.N.Chen, F.X.Huang, X.P.Wu, F.Z.Zheng, J.P.Duan. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 873 (2003)
- A.I.P.Neves, J.R.Albert-Garcia, J.M.Calatayud. *Talanta*, **71**, 318 (2007)
- Z.Xi, Z.Zhang, Y.Sun, Z.Shi, W.Tian. *Talanta*, **79**, 216 (2009)
- H.Chen, L.Li, M.Zhou, Y.J.Ma. *Chin. Chem. Lett.*, **19**, 203 (2008)
- Z.Lin, X.Chen, Z.Cai, P.Li, X.Chen, X.Wang. *Talanta*, **75**, 544 (2008)
- J.Cepas, M.Silva, D.Pérez-Bendito. *Analyst*, **121**, 49 (1996)
- T.Yakabe, J.Ishida, H.Yoshida, H.Nohta, M.Yamaguchi. *Anal. Sci.*, **16**, 545 (2000)
- Б.Н.Тарусов, А.И.Поливода, А.И.Журавлев. *Биофизика*, **490** (1961)
- Ю.А.Владимиров. *Сопос. обр. журн.*, 25 (1999)
- B.P.Watts Jr., M.L.Barnard, J.F.Turrens. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 324 (1995)
- E.Pollet, J.A.Martínez, B.Metha, B.P.Watts Jr., J.F.Turrens. *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**, 74 (1998)
- A.Aspée, E.A.Lissi. *Luminescence*, **15**, 273 (2000)
- A.Aspée, E.A.Lissi. *J. Protein Chem.*, **20**, 479 (2001)
- T.J.Simat, H.Steinhardt. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 490 (1998)
- M.Nakagawa, S.Kato, S.Kataoka, T.Hino. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3136 (1979)
- S.Gebicki, J.M.Gebicki. *Biochem. J.*, **289**, 743 (1993)
- I.Sato, T.Matsuura, M.Nakagawa, T.Hino. *Acc. Chem. Res.*, **10**, 346 (1977)
- E.Alarcón, C.Henríquez, A.Aspée, E.A.Lissi. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 475 (2007)
- G.E.Ronsein, M.C.B.Oliveira, S.Miyamoto, M.H.G.Medeiros, P.Di Mascio. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1271 (2008)
- M.Gracanin, C.L.Hawkins, D.I.Pattison, M.J.Davies. *Free Radical Biol. Med.*, **47**, 92 (2009)
- И.И.Сапежинский. *Биополимеры. Кинетика радиационных и фотохимических превращений*. Наука, Москва, 1988
- H.Degn. *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 271 (1969)
- И.Г.Газарян, Д.М.Хушпульян, В.И.Тишков. *Успехи биол. химии*, **46**, 303 (2006)
- P.A.Savitsky, I.G.Gazaryan, V.I.Tishkov, L.M.Lagrimini, T.Ruzgas, L.Gorton. *Biochem. J.*, **340**, 579 (1999)
- T.Kawano, N.Kawano, H.Hosoya, F.Lapeyrie. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 546 (2001)

81. S.N.Krylov, H.B.Dunford. *Biophys. Chem.*, **58**, 325 (1996)
82. S.N.Krylov, H.B.Dunford. *J. Phys. Chem.*, **100**, 913 (1996)
83. D.Metodiewa, M.P.de Melo, J.A.Escobar, G.Cilento, H.B.Dunford. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 27 (1992)
84. W.Adam, G.Cilento. *Free Radical Biol. Med.*, **19**, 103 (1995)
85. M.P.de Mello, S.M.de Toledo, M.Haun, G.Cilento, N.Duran. *Biochemistry*, **19**, 5270 (1980)
86. N.Duran, A.Campa, L.C.Leite, G.Cilento, E.Cadenas. *Photobiochem. Photobiophys.*, **11**, 281 (1986)
87. J.R.Kanofsky. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14171 (1988)
88. J.R.Kanofsky. *Methods Enzym.*, **319**, 59 (2000)
89. G.A.Russell. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3871 (1957)
90. S.Kobayashi, K.Sugioka, H.Nakano, M.Nakano, S.Tero-Kubota. *Biochemistry*, **23**, 4589 (1984)
91. С.Н.Крылов, В.В.Лазарев, Л.Б.Рубин. *Докл. АН СССР*, **310**, 1000 (1990)
92. M.P.de Melo, J.A.Escobar, D.Metodiewa, H.B.Dunford, G.Cilento. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 34 (1992)
93. I.Neeman, D.Joseph, W.H.Bigglely, H.H.Seliger. *Lipids*, **20**, 729 (1985)
94. A.U.Khan, M.Kasha. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1574 (1966)
95. S.N.Krylov, S.M.Krylova, I.G.Chebotarev, A.B.Chebotareva. *Phytochemistry*, **36**, 263 (1994)
96. H.Arakawa, A.Tsuji, M.Maeda. *J. Biolum. Chemilum.*, **13**, 349 (1998)
97. S.Agatsuma, T.Nagoshi, M.Kobayashi, M.Usa, H.Watanabe, H.Sekino, H.Inaba. *Clin. Chem.*, **38**, 48 (1992)
98. S.Agatsuma, H.Sekino, T.Nagoshi, H.Watanabe. *Clin. Chem.*, **40**, 1580 (1994)
99. V.F.Ximenes, A.Campa, L.H.Catalani. *Arch. Biochem. Biophys.*, **387**, 173 (2001)
100. Р.Ф.Васильев, Ю.Б.Цаплев. *Успехи химии*, **75**, 1103 (2006)

CHEMILUMINESCENCE OF INDOLE AND ITS DERIVATIVES

R.F.Vasil'ev, A.V.Trofimov, Yu.B.Tsaplev

*N.M.Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
4, Ul. Kosygina, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)137-4101*

The results of studies of chemiluminescence of indole and its derivatives have been critically analyzed. It is shown that chemical transformations of indoles lead, depending on the structure and experimental condition, to various electronically excited products and emission of light. Many reactions considered are used as a basis for highly sensitive methods for detection of indoles in biology, medicine, ecology and forensics.

Bibliography — 100 references.

Received 10th April 2009