

УДК 544.55

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРОКСИАЗОТИСТОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА НА ВОЗДУХЕ

© 2014 г. И. М. Пискарев*, И. П. Иванова**,***, С. В. Трофимова**,***,
А. А. Ичеткина**,***, О. Е. Бурхина***

*Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова
119234, Москва, Воробьевы горы
E-mail: i.m.piskarev@gmail.com

**Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

***Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского –
Национальный исследовательский университет
603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 02.04.2014 г.
В окончательном виде 30.04.2014 г.

Исследована реакция стабильного свободного радикала ДФПГ* с водой, обработанной излучением плазмы искрового разряда на воздухе, сразу после облучения и в течение 13 сут после. Выбор связан с тем, что пероксиазотистая кислота ONOOH , которая может образовываться под действием излучения, является донором атомарного водорода, и реакция с ДФПГ* позволяет определить ее концентрацию. Образование ONOOH идентифицировано на 4-й день после обработки $[\text{ONOOH}] = (1.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ моль/л. Это подтверждает сделанное ранее предположение, что в воде образуется комплекс, содержащий пероксинитрит и пероксиазотистую кислоту, который распадается 13–14 сут.

DOI: 10.7868/S0023119714050123

Пероксинитрит (ONOO^-) и пероксиазотистая кислота (ONOOH) обладают высокой биологической и химической активностью и сильно влияют на процессы, происходящие в живом организме [1]. Образование пероксинитрита в воде под действием излучения плазмы искрового разряда на воздухе идентифицировано в [2]. Влияние излучения плазмы на биологические объекты исследовано мало. Обычно используется непосредственный контакт плазмы с образцом. При этом воздействию плазмы подвергается поверхность объекта. В [3] установлено, что при обработке *E. coli* плазмой диэлектрического барьерного разряда при количестве бактерий в образце 10^6 – 10^7 наблюдается 100% бактерицидный эффект, в то время как при количестве бактерий 10^9 степень дезактивации не превышает несколько процентов. При обработке тех же бактерий УФ-излучением ртутной лампы характерной величиной, описывающей процесс дезактивации, является доза излучения, при которой количество бактерий уменьшается в 10 раз. То есть под действием УФ-излучения процент уменьшения количества бактерий при определенной дозе излучения не зависит от начального количества бактерий [4]. В [5] дается оценка цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы на опухолевые клетки. Установлены значительные нарушения в структуре цито-

плазматической и ядерной мембран, белковые молекулы этих клеток претерпевают выраженную окислительную модификацию. Механизмы воздействия излучения плазмы не совсем ясны. Одним из основных активных факторов может быть пероксинитрит. В [2] установлено, что пероксинитрит появляется в обработанной импульсным излучением плазмы воде на 4–5 сут после облучения, его концентрация достигает максимума на 10–11 сут и уменьшается до уровня фона на 14-е сут.

С образованием как пероксинитрита, так и пероксиазотистой кислоты может быть связана высокая биологическая активность излучения плазмы. Поэтому представляет интерес исследовать образование под действием импульсного излучения плазмы образование пероксиазотистой кислоты, так как в [2] предположено, что пероксинитрит и пероксиазотистая кислота образуют комплекс, распадающийся за время ~14 сут после облучения. В [2] идентифицирован пероксинитрит, а пероксиазотистая кислота – нет. Целью настоящей работы было исследование реакции стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ*) с обработанной излучением плазмы водой, так как радикал ДФПГ* может восстанавливаться пероксиазотистой кислотой и служить индикатором ее появления.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Использовался генератор излучения плазмы искрового разряда ИР-10, описанный в [6]. Частота повторения импульсов составляла 10 Гц. Длительность переднего фронта импульса 50 нс. Полная длительность импульса 100 мкс. Энергия, выделяемая в импульсе, 5.9×10^{-2} Дж. Плотность потока энергии фотонов УФ-С диапазона за время длительности импульса (100 мкс, 10 Гц) на расстоянии 1 см от электродов (импульсная мощность) составляет 2 Дж/см², средняя мощность излучения на том же расстоянии равна $(2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ Дж см⁻² с⁻¹, поток фотонов УФ-С диапазона 1.26×10^{10} моль см⁻² с⁻¹. Максимум спектра излучения лежит при $\lambda = 220$ нм. По мере остывания искрового шнура максимум спектра излучения смещается в сторону более длинных волн и проходит УФ и видимый диапазон до 800 нм.

Готовили раствор стабильного свободного радикала дифенилпикрилгидразина ДФПГ[•] в 96% этиловом спирте, 5 мг ДФПГ[•] на 200 мл спирта. Для изучения реакции ДФПГ[•] с продуктами, образовавшимися в воде под действием излучения плазмы, обработанную воду смешивали со спиртовым раствором ДФПГ[•] в соотношении 1 : 1. Смесь выдерживали 3 мин, после чего измеряли спектр поглощения. Контрольный образец готовили смешиванием спиртового раствора ДФПГ[•] с необработанной дистиллированной водой 1 : 1. Обработка растворов излучением плазмы искрового разряда осуществлялась в стерильных пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. Объем жидкости 4 мл. Время обработки 1–50 мин. Расстояние от поверхности жидкости до электродов 30 мм. Реакцию с ДФПГ[•] изучали путем измерения спектра поглощения смеси спиртового раствора ДФПГ[•] с обработанной водой (1 : 1) в диапазоне длин волн 200–800 нм. Спектры измеряли через 3 мин после смешивания растворов. Обработанную 20 мин воду хранили 13 сут, ежедневно беря ее образец, смешивая со спиртовым раствором ДФПГ[•] и измеряя спектр поглощения смеси. Все измерения повторяли 3–5 раз.

Спектры измеряли на спектрофотометре “Флюорат-02 Панорама” (“Люмэкс”, Санкт-Петербург, Россия). Толщина кюветы 10 мм. Величину рН измеряли прибором “Эксперт 001” (фирма “Эконикс”, Россия). Использовали химически чистые реактивы, дистиллированная вода (рН₀ 5.9).

РЕЗУЛЬТАТЫ

После обработки излучением плазмы в течение 20 мин величина рН уменьшалась от 5.9 до 3.1. Спектры поглощения растворов представлены на рис. 1: спиртовый раствор ДФПГ[•], разбав-

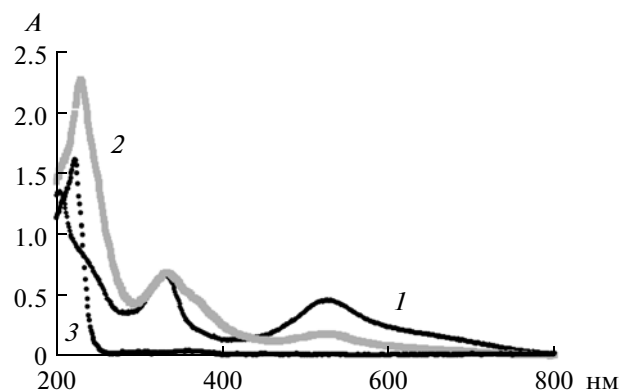


Рис. 1. Спектры поглощения растворов: 1 – ДФПГ[•] + дистиллированная вода, 1 : 1; 2 – ДФПГ[•] + обработанная 20 мин вода, 1 : 1; 3 – обработанная 20 мин вода, разбавленная дистиллированной водой 1 : 1.

ленный дистиллированной водой, 1 : 1 (1); спиртовый раствор ДФПГ[•], смешанный с обработанной 20 мин излучением плазмы водой, 1 : 1 (2); обработанная 20 мин излучением плазмы вода, смешанная с дистиллированной водой, 1 : 1 (3). Спектры растворов с ДФПГ[•] измерялись через 3 мин после смешивания. Это время шла реакция, и оптическая плотность раствора менялась. При времени задержки более 3 мин цвет растворов и его насыщенность сохранялись.

Из рис. 1 видно, что в спектре раствора ДФПГ[•], разбавленного необработанной водой (кривая 1), имеются максимумы при $\lambda = 330$ и 520 нм. Линия 520 нм связана с самим ДФПГ[•]. Линия 330 нм – его восстановленная форма ДФПГ-Н [7]. Концентрация ДФПГ[•], оцененная исходя из оптической плотности пика 520 нм, $[\text{ДФПГ}^{\bullet}] = (3.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ моль/л ($\epsilon = 10^4$ л моль⁻¹ см⁻¹) [8]. При смешивании с обработанной 20 мин водой линия 520 нм сильно уменьшается (кривая 2), оптическая плотность линии 330 нм не меняется. На правом склоне линии 330 нм появляется неразрешенный пик, который можно идентифицировать, как линия 355 нм, связанная с ионами ДФПГ⁻ [8]. Пик при 220–230 нм связан с этилнитратом, продуктом взаимодействия этилового спирта с ионами NO₃⁻, которые накапливаются в воде при обработке излучением плазмы [9].

В спектре обработанной воды, разбавленной дистиллированной водой 1 : 1 (3), виден максимум ~220 нм и слабый максимум 350–360 нм, связанный с азотсодержащими соединениями, включающими ионы NO₂⁻ [9]. Для оценки природы пика 350–360 нм измеряли спектр раствора NaNO₂ 0.005 моль/л. Картина спектра была такая, как на рис. 1, кривая 3. В кислой среде рН ~ 3, наблюдающейся в условиях эксперимента после

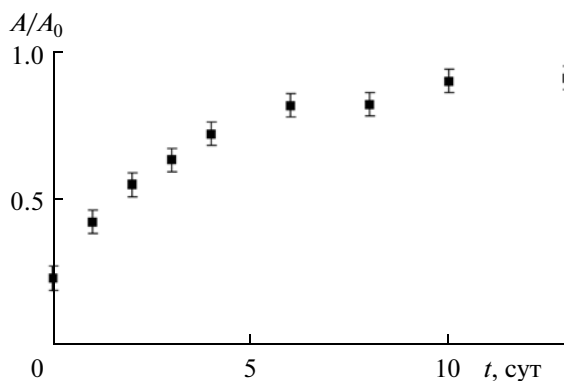


Рис. 2. Зависимость отношения оптических плотностей смеси проб обработанной воды и спиртового раствора ДФПГ* для пика при $\lambda = 520$ нм A/A_0 , где A – оптическая плотность пика в день измерения, A_0 – оптическая плотность для смеси с необработанной водой, от времени выдерживания раствора t (сут). Время $t = 0$ соответствует свежеработанному раствору.

обработки 20 мин, ионы NO_2^- в течение 3–5 сут трансформируются в ионы NO_3^- , максимум 350–360 нм через 3 сут становится незаметным, пик 220–230 нм остается таким же. Пропадание пика ~360 нм через 3 сут после обработки воды тем же излучением плазмы установлено в [2].

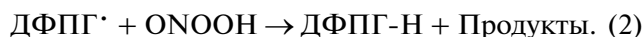
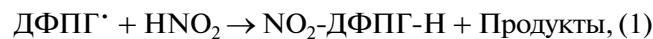
Был наработан объем воды, достаточный для анализа в течение 13 дней. Спектры поглощения, аналогичные рис. 1, для проб воды, взятых через время t после обработки ($t = 0$ соответствует воде сразу после обработки), измерялись в течение 13 сут. Зависимость отношения оптических плотностей A пика 520 нм в день измерения к оптической плотности для необработанной воды A_0 представлена на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пропадание пика ~360 нм, связанного с азотсодержащими продуктами, через 3 сут после обработки и появление пика ~300 нм, связанного с пероксинитритом, наблюдали в [2]. Пик ~300 нм появлялся в спектре воды через 4–5 сут после обработки, достигал максимума на 10–12 сут и уменьшался до уровня, близкого уровню шума, через 14 сут. Появление пероксинитрита связывалось в [2] с образованием под действием излучения плазмы комплекса, включающего пероксинитрит и пероксиазотистую кислоту. Концентрация комплекса, образующегося в дистиллированной воде, $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ моль/л.

Исследуемая в настоящей работе реакция воды с ДФПГ* не может быть инициирована пероксинитритом. Из-за пространственных затруднений стабильный радикал не может взаимодействовать

со сложными соединениями. Он – плохой индикатор активных форм кислорода [7]. Основной канал расходования ДФПГ* – реакция с легким атомом – водородом. Пероксиазотистая кислота может быть донором водорода [10]. При наличии в растворе азотистой HNO_2 и пероксиазотистой ONOON кислот возможны реакции:



В реакции (2) должно наблюдаться уменьшение линии 520 нм и увеличение линии 330 нм. Реально наблюдается только уменьшение линии 520 нм. Это может означать, что в (2) образуется более сложный продукт, чем ДФПГ-Н, так как пероксиазотистая кислота (донор водорода) входит в состав комплекса. В первые дни после обработки, пока в растворе есть азотистая кислота, в расходование ДФПГ* вносят вклад реакции (1) и (2). На 4-е сут после обработки азотистая кислота пропадает [2] и расходование ДФПГ* происходит в реакции (2).

Согласно предположению о том, что под действием импульсного излучения плазмы образуется комплекс, содержащий как ONOON , так и ONOO^- [2, 11], при распаде комплекса должны наблюдаться как пероксинитрит, так и пероксиазотистая кислота.

Расход ДФПГ* на 4-е сут после обработки, когда азотистая кислота распадается, должен определяться пероксиазотистой кислотой. Его расход составляет ~33% исходного значения. При начальной концентрации $[\text{ДФПГ}^*] = 3.5 \times 10^{-5}$ моль/л такое уменьшение соответствует расходованию в (2) пероксиазотистой кислоты $[\text{ONOON}] = (1.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ моль/л. Эту величину следует считать мгновенной концентрацией. С увеличением времени после обработки эта концентрация уменьшается. На 13-й день она составляет $(0.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ моль/л. Таким образом, наблюдение пероксиазотистой кислоты в реакции с ДФПГ* подтверждает предположение об образовании под действием импульсного излучения плазмы искрового разряда комплекса, содержащего пероксиазотистую кислоту и пероксинитрит, сделанное в [2]. Время наблюдения пероксиазотистой кислоты примерно 13 сут, что и наблюдения пероксинитрита (14 сут).

Результаты работы позволяют предполагать, что под действием импульсного излучения плазмы искрового электрического разряда в воде образуется комплекс, содержащий пероксиазотистую кислоту и пероксинитрит. Концентрация комплекса, образующегося в нейтральной воде (рН 5.9) за время облучения 20 мин, составляет $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ моль/л. Комплекс распадается с образованием пероксиазотистой кислоты и пероксинитрита за 14 сут. Максимальные мгновен-

ные концентрации: $[\text{ONOON}] = (1.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ моль/л и $[\text{ONOO}^-] = (2 \pm 1) \times 10^{-5}$ моль/л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М.: Книжный дом Либроком, 2011.
2. Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В., Ичеткина А.А., Бурхина О.Е. // Химия высоких энергий. 2014. Т. 48. № 3. С. 252.
3. Joshi G., Cooper M., Yost A., Paff M., Ercan U.K., Fridman Gregory, Friedman Gary, Fridman Alexander, Brooks A.D. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011. V. 55. № 3. P. 1053.
4. Hellweger F.L., Bucci V., Litman M.R., Gu A.Z., Onnis-Hayden A. // J. Environ. Engineering. 2009. V. 135. № 5. P. 372.
5. Иванова И.П., Трофимова С.В., Ведунова М.В., Жаберева А.С., Бугрова М.Л., Пискарев И.М., Карпель Вель Лейтнер Н. // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6. № 1. С. 14.
6. Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В., Аристова Н.А. // Химия высоких энергий. 2012. Т. 46. № 5. С. 406.
7. Ionita P. // Chem. Pap. 2005. V. 59. № 1. P. 11.
8. Hristea E.N., Caproiu M.T., Pencu G.P., Hildebrand M., Constantinescu T., Balaban A.T. // Radicals and Anions, Int. J. Mol. Sci. 2006. V. 7. P. 130.
9. Иванова И.П., Трофимова С.В., Карпель Вель Лейтнер Н., Аристова Н.А., Архипова Е.В., Бурхина О.Е., Сысоева В.А., Пискарев И.М. // Современные технологии в медицине. 2012. № 2. С. 20.
10. Лобачев В.Л., Рудаков Е.С. // Успехи химии. 2006. Т. 5. С. 422.
11. Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P.G., Kopprenol W.H. // Chem. Res. Toxicol. 1997. V. 10. P. 1285.