

# НИТРОВАНИЕ ТИРОЗИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИМПУЛЬСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ГОРЯЧЕЙ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО РАЗРЯДА

Доц. Аристова Н.А.,<sup>1</sup> проф. Иванова И.П.<sup>2</sup>, вед. научн. сотр. Пискарев И.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Нижнетагильский технологический институт (филиал). Россия, 622031, г. Нижний Тагил, Свердловской обл., ул. Красногвардейская, 59.*

<sup>2</sup> *институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского. Россия, 603950, Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23 ;*

<sup>3</sup> *Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, (НИИЯФ МГУ). Ленинские горы, 1, стр. 2, ГСП-1, Москва, 119234 Россия*

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

## **Аннотация.**

Исследован механизм действия продуктов, образующихся в водном растворе под действием импульсного излучения горячей плазмы электрического разряда. Установлено, что в случае раствора тирозина основным механизмом является нитрование. Идентифицировано образование 3-нитротирозина. Разрушение ароматического кольца под действием излучения горячей плазмы не происходит. Связано с тем, что радикалы  $\text{HO}_2^\bullet$ , образующиеся под действием излучения, имеют малую окислительную способность. Показано, что под действием гидроксильных радикалов, генерируемых в коронном электрическом разряде, ароматическое кольцо тирозина разрушается.

### **Введение.**

Воздействие холодной плазмы и дистанционное воздействие горячей плазмы на водные растворы сильно различается. Холодная плазма непосредственно контактирует с обрабатываемым объектом, и активные частицы проникают в раствор через поверхность раздела газ-жидкость [1]. Основной активной частицей холодной плазмы является гидроксильный радикал.

Горячая плазма воздействует на объект, не повреждая его, через излучение и через диффузию активных частиц, образовавшихся в области разряда. Исследования показали, что роль частиц, диффундирующих из области разряда, мала [2]. В работе [2] показано, что основную роль играет излучение, так как оно проникает в жидкость на значительную глубину. Поэтому далее речь будет идти об излучении горячей плазмы. Установлено, что в случае воздействия импульсного излучения горячей плазмы на неорганические вещества выход окисления и восстановления примерно одинаков, абсолютная величина выходов близка к выходу в радиационно-химическом процессе и составляет  $5.1 \pm 0.9$  и  $6.2 \pm 1$   $(100 \text{ эВ})^{-1}$  для окисления и восстановления соответственно [4]. Представляет интерес изучить изменения под действием излучения горячей плазмы, на органические соединения и сравнить с изменениями под действием холодной плазмы.

Ароматические аминокислоты, входящие в состав белков (триптофан, тирозин, фенилаланин) являются удобной пробой для изучения состояния белков. Изменения, происходящие в структуре ароматических аминокислот, сразу проявляются в спектрах поглощения и флуоресценции [5]. В качестве объекта исследования в работе выбран тирозин, так как он и продукты его превращения идентифицируются по спектрам поглощения [6 - 8]. Механизм образования 3-нитротирозина изучался в работах [9, 10]. Обзор работ по нитрованию тирозина в составе белков дается в работе [11].

Цель работы; исследование механизма воздействия продуктов, образующихся под действием импульсного излучения горячей плазмы, на водный раствор. В качестве пробного вещества выбран тирозин. Сравниваются изменения в растворе тирозина под действием холодной плазмы коронного электрического разряда и импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда.

## Материалы и методы

### Общие условия

Эксперимент выполнен с использованием приборов, генерирующих активные частицы: источника импульсного излучения горячей плазмы ИР10 и реактора коронного электрического разряда. Обоими источниками активных частиц обрабатывался раствор тирозина в дистиллированной воде концентрацией 160 мг/л, ( $8.8 \cdot 10^{-4}$  моль/л), рН = 5.65. Спектры поглощения растворов измерялись спектрофотометром СФ-102. Величина рН измерялась прибором Эксперт-001. Во всех экспериментах использовались химически чистые реактивы и дистиллированная вода, рН = 6.5.

### Источник импульсного излучения горячей плазмы ИР10

Источник излучения ИР10 смонтирован в виде двух модулей: модуль разряда 1 и модуль источника питания 2. Блок-схема источника излучения ИР10 представлена на рис. 1.

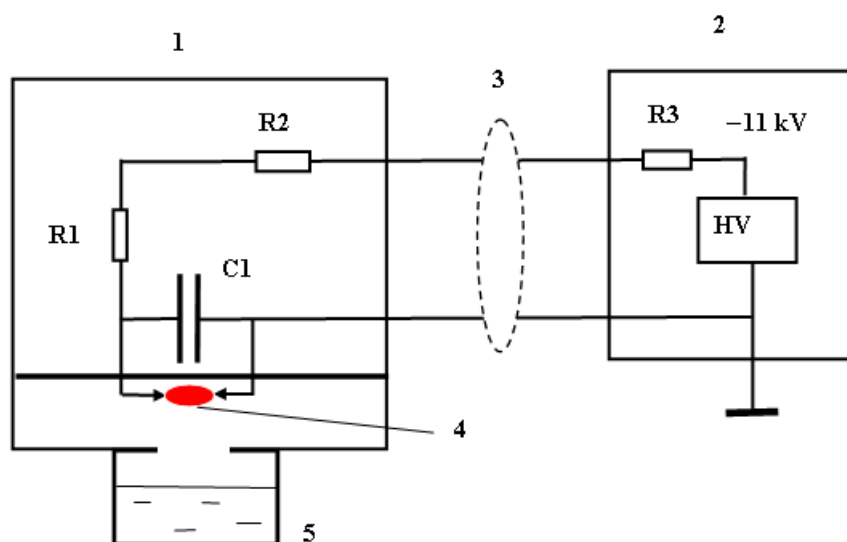


Рисунок 1. Блок-схема источника импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда ИР10. 1 – модуль излучателя, 2 – модуль источника питания, 3 – ВЧ кабель,  $\rho =$

В разрядном модуле 1, изготовленном из фторопласта-4, помещены электроды из нержавеющей стали толщиной 2 мм, между которыми происходит разряд. Расстояние между электродами 3 мм, что соответствует пробивному напряжению промежутка 6 кВ. Электроды соединены с конденсатором 3300 пф. При включении высокого напряжения начинался самостоятельный искровой разряд. Длительность импульса тока 100 мкс, передний фронт 50 нс, энергия в импульсе  $5.9 \times 10^{-2}$  Дж, частота повторения импульсов 10 Гц, мощность, выделяемая в разряде, 0.59 Дж/с. Горячая плазма излучала как черное тело, нагретое до температуры  $\sim 10^4$  °К, максимум спектра излучения находился при длине волны 220 нм [3].

Интенсивность УФ излучения генератора ИР10 составляла  $(1.26 \pm 0.2) \cdot 10^{-10}$  моль(см<sup>2</sup> с)<sup>-1</sup> [2, 3] на расстоянии 3 см от области разряда. Условия разряда подобраны так, что плазма была слабо ионизована, степень ионизации меньше 0.1%. Электронная плотность была  $\sim 10^{11}$  см<sup>-3</sup> и энергия электронов не превышала 1 эВ [3, 4].

Высокое напряжение подается в модуль разряда радиочастотным кабелем, волновое сопротивление  $\rho = 75 \Omega$ . Заземленная жила кабеля соединена непосредственно с одной обкладкой конденсатора. Центральная жила кабеля соединена со второй обкладкой конденсатора С1 через два резистора R1 and R2 330 кΩ 2 Вт, установленными в разрядном модуле 1. Резисторы R1 and R2 предназначены для гашения отраженной волны, возникающей в момент разряда. В модуле источника питания 2 помещен высоковольтный выпрямитель на 11 кВ. Отрицательный полюс выпрямителя соединен через балластный резистор R3 = 8 МΩ с центральной жилой кабеля. Напряжение – 11 кВ подается на зарядку конденсатора С1 через резисторы R1, R2 and R3. Разрядная полость через отверстие диаметром 2 см соединена со стеклянной чашкой Петри диаметром 40 мм, в которую помещается проба обрабатываемой жидкости объемом 10 мл. Расстояние от области разряда до поверхности жидкости составляет 30 мм.

Активными частицами, образующимися под действием импульсного излучения горячей плазмы в воде, являются радикалы  $\text{HO}_2^\bullet$ , перекись водорода, азотистая кислота и комплекс (...ONOON/ONOO<sup>-</sup>... , pK<sub>a</sub> = 6.8), распадающийся длительное время на пероксинитрит и пероксиазотистую кислоту [3, 4]. Энергия, выделяемая в искровом разряде за 20 минут составляла  $710 \pm 40$  Дж на 10 мл обрабатываемого раствора.

## Реактор коронного электрического разряда.

Блок-схема реактора представлена на рис. 2.

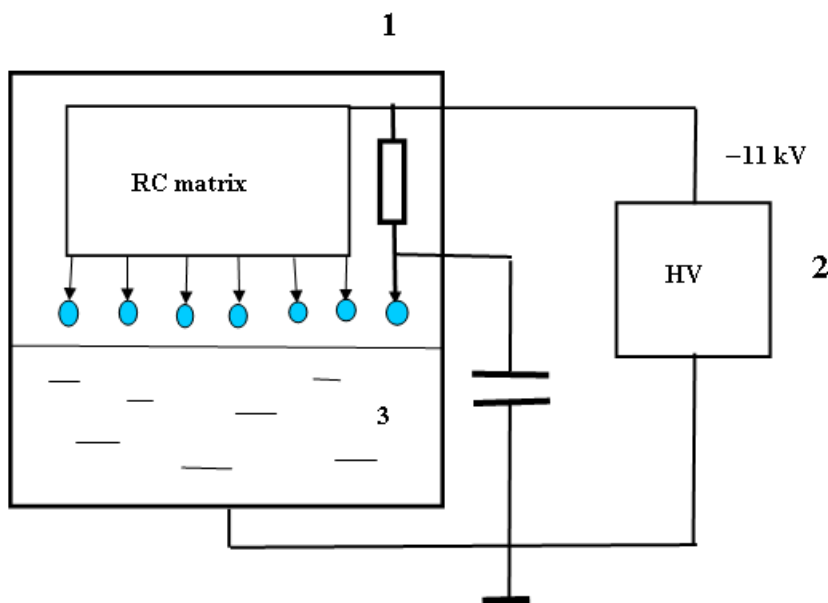


Рисунок 2. Блок-схема обработки проб холодной плазмой коронного электрического разряда. 1 – корпус реактора коронного электрического разряда, 2 – блок источника питания, 3 – обрабатываемая жидкость.

Реактор выполнен на базе стеклянной емкости 1 объемом 0.5 л, на дно которой наливали пробу обрабатываемой жидкости 50 мл. Через отверстие в дне проба жидкости заземлялась. На расстоянии 6 мм от поверхности жидкости располагались 7 разрядных электродов. Электроды закреплялись на расстоянии 25 мм друг от друга. На каждый электрод через набор резисторов общим сопротивлением 20 МΩ (6 резисторов 3.3 МΩ, 2 Вт) подавалось высокое напряжение отрицательной полярности от источника питания – 11 кВ. Ток разряда каждого электрода 70 мкА, величина высокого напряжения на каждом электроде относительно жидкости с учетом падения напряжения на резисторах 9.6 кВ. Каждый электрод соединялся с землей через конденсатор 30 пФ. Схема соединения для одного электрода показана на рисунке 2.

Активными частицами, образующимися в коронном разряде в присутствии паров воды, являются радикалы  $\text{OH}^\bullet$ , перекись водорода и озон [12]. Энергия, выделяемая в коронном разряде, составляла  $1100 \pm 60$  Дж и  $2200 \pm 120$  Дж на 10 мл обрабатываемого раствора за 20 и 40 минут соответственно.

## Результаты и обсуждение

### Обработка излучением горячей плазмы

В процессе обработки излучением горячей плазмы значение рН раствора тирозина уменьшается, и за 20 минут становится равным рН = 3. Спектр поглощения раствора тирозина сразу после обработки в течение 20 минут представлен на рис. 3. Видно, что основная линия поглощения 274 нм связанная с ароматическим кольцом, практически не изменилась. При длинах волн больше 300 нм появились линии азотистой кислоты (335 – 385 нм) [2, 3].

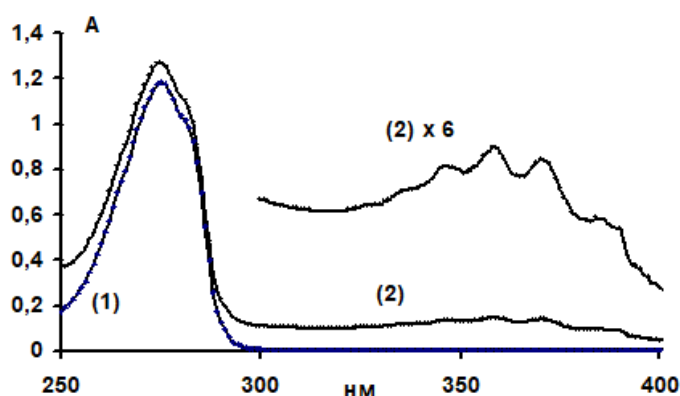


Рисунок 3. Спектр поглощения раствора тирозина (А – оптическая плотность), исходного 160 мг/л (1), и сразу после обработки излучением горячей плазмы искрового разряда в течение 20 минут (2) в диапазоне длин волн 250 – 400 нм. (2) x 6 – увеличено в 6 раз.

Спектр того же раствора на второй день после обработки представлен на рис. 4.

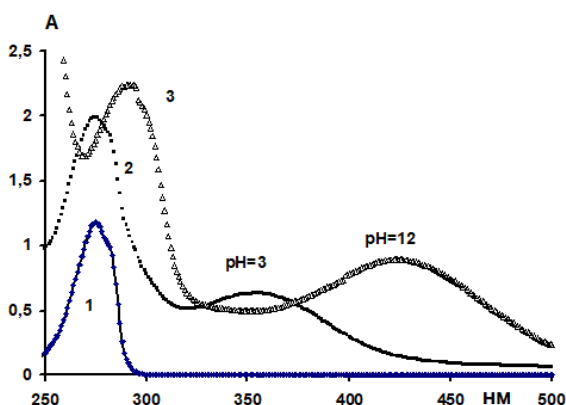


Рисунок 4. Спектр поглощения раствора тирозина: (1) – исходного; (2) - через 2 дня после обработки импульсным излучением горячей плазмы в течение 20 минут (рН = 3). (3) – тот же раствор после введения кристаллического NaOH до уровня рН = 12.

По сравнению с рис. 3 спектр изменился. Это означает, что за время обработки накопились продукты, которые медленно расходуются. Пик тирозина 274 нм, связанный с ароматическим кольцом, остался практически без изменений (рис 4, кривая 2). Его оптическая плотность относительно базовой линии осталась такой же, как в исходном растворе (рис. 4, кривая 1). Линии азотистой кислоты исчезли, так как она за это время распалась. Появился пик 353 нм, который может быть связан с 3-нитротирозином [7]. Для идентификации продукта при  $\lambda = 353$  нм в раствор тирозина на второй день после обработки излучением плазмы в течение 20 мин вводили кристаллический NaOH до получения pH = 12. Пик 353 нм сдвигается до  $\lambda = 425$  нм (рис. 4, кривая 3). Известно, что так меняется пик 3-нитротирозина при переходе из кислой среды в щелочную [7]. Это позволяет утверждать, что под действием импульсного излучения горячей плазмы происходит нитрование, и одним из продуктов нитрования является 3-нитротирозин.

#### **Обработка холодной плазмой коронного разряда**

При обработке пробы тирозина холодной плазмой коронного разряда согласно схеме на рис. 2 значение pH раствора не меняется. Спектр поглощения раствора тирозина сразу после обработки холодной плазмой коронного электрического разряда представлен на рис. 5.

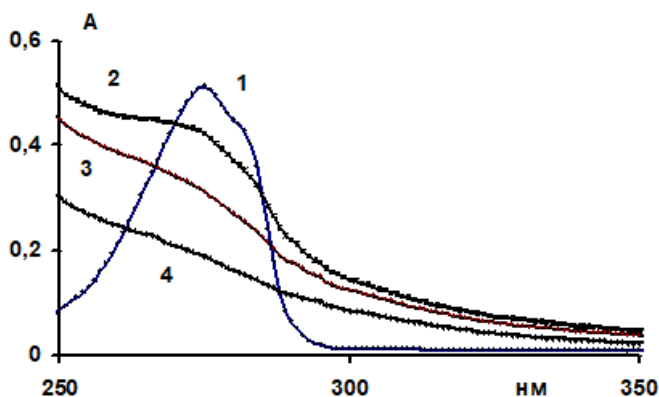


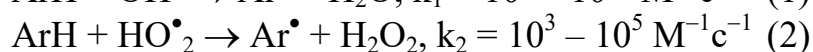
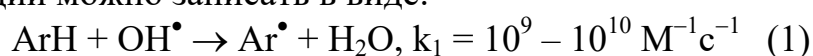
Рисунок 5. Спектр поглощения раствора тирозина (1 – исходного) и после обработки холодной плазмой коронного электрического разряда в течение времени: 20 минут (2), 30 минут (3) и 40 минут (4).

В этом случае линия поглощения, характерная для тирозина (274 нм) уменьшается и со временем обработки исчезает. Вид спектра обработанного холодной плазмой раствора не меняется в течение нескольких дней. Это означает, что все активные продукты расходуются сразу при обработке излучением.

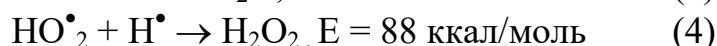
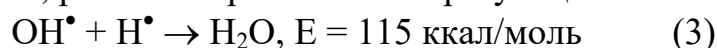
## Окисление радикалами $\text{HO}_2^\bullet$

Проанализируем полученные результаты. Основными окислителями, образующимися под действием излучения горячей плазмы в водном растворе, являются радикалы  $\text{HO}_2^\bullet$  [3]. Эти радикалы намного менее активны, чем радикалы  $\text{OH}^\bullet$ , образующиеся при коронном разряде [12]. При взаимодействии радикалов  $\text{HO}_2^\bullet$  и  $\text{OH}^\bullet$  с органическими веществами в первую очередь происходит отрыв атома водорода, если он энергетически возможен.

В случае окисления ароматического кольца начальную стадию реакции можно записать в виде:



Константы скорости реакций из справочника [13]. В реакциях отрыва атома водорода от ароматического кольца (реакции 1, 2) выделяется энергия, равная энергии связи образующейся молекулы:

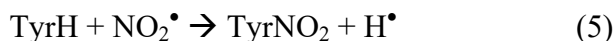


Энергии связи из справочника [14]. Энергия, высвобождающаяся в реакциях (3) и (4) используется для отрыва атома водорода от молекулы. Если энергии недостаточно, то отрыв атома водорода в реакциях (1) и (2) невозможен. Энергия отрыва атома водорода для ароматического кольца составляет 89 ккал/моль [14]. Отсюда следует, что ароматическое кольцо может окисляться радикалами  $\text{OH}^\bullet$ , и не может окисляться радикалами  $\text{HO}_2^\bullet$ . Рисунки 3, 4 и 5 подтверждают этот вывод.



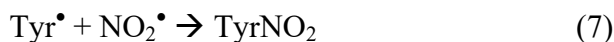
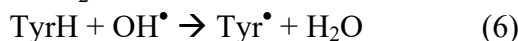
### Механизм нитрования.

Процесс нитрования ароматического кольца тирозина можно записать через начальное и конечное состояние:



Энергия связи атома водорода в ароматическом кольце тирозина  $\sim 89$  ккал/моль, энергия связи группы  $\text{NO}_2^\bullet$ , присоединившейся на место атома водорода,  $\sim 19$  ккал/моль. Поэтому реакция нитрования тирозина экзотермическая, выделяется энергия  $\sim 70$  ккал/моль [14]. Энергетически наиболее вероятно образование 3-нитротирозина [7, 8]. В литературе обсуждаются два возможных механизма реакции: радикальный и через образования иона нитрония  $\text{NO}_2^+$  [11].

Радикальный механизм возможен при распаде пероксиазотистой кислоты на радикалы  $\text{OH}^\bullet$  и  $\text{NO}_2^\bullet$ . Радикал тирозина образуется при взаимодействии молекулы тирозина с гидроксильным радикалом, после чего на это место присоединяется радикал  $\text{NO}_2^\bullet$ .



В принципе, такой механизм возможен, так как оба радикала образуются в одном месте и при распаде одной молекулы пероксиазотистой кислоты.

Альтернативный канал связан с образованием иона нитрония  $\text{NO}_2^+$ . Ион нитрония образуется в кислой среде при наличии кислотных остатков азотной или азотистой кислоты [11]. Выход иона нитрония увеличивается при наличии в растворе серной кислоты. Процесс можно представить следующим образом.



Далее образуется переходное состояние



При распаде переходного состояния выделяется энергия и образуется конечный продукт нитрования.



Образование переходного состояния – медленная стадия. Согласно экспериментальным данным, когда 3-нитротирозин появляется на второй день после обработки, она может продолжаться 2 – 3 дня.

Если щелочь вводилась сразу после обработки, никаких изменений в спектре поглощения раствора через 2 дня не наблюдалось. Пик 3-нитротирозина не появлялся. Отсюда можно сделать два вывода. Ион нитрония не образуется в щелочной среде, поэтому механизм нитрования через ион нитрония может иметь место. В щелочной среде время жизни пероксинитрита больше, чем пероксиазотистой кислоты в кислой среде. Поэтому продукты его распада; радикалы  $\text{OH}^\bullet$  и  $\text{NO}_2^\bullet$  должны образовываться. Однако продукт нитрования после добавления щелочи сразу после обработке появляется. Значит, радикальный механизм нитрования в изучаемом процессе не имеет места.

## **Вывод**

Основным механизмом воздействия импульсного излучения горячей плазмы искрового разряда на раствор тирозина является нитрование. Связано с тем, что радикалы  $\text{NO}_2^\bullet$  обладают малой активностью и не могут инициировать окисление тирозина.

## Список литературы

1. *Bruggeman P.J., Kushner M.J., Locke B.R., et al.* (41 authors) // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2016. V. 25. 053002 (59 pp).
2. *Piskarev I.M.* // *Plasma Chem. & Plasma Process.* 2021. V. 41(5), 1347.
3. *Piskarev I.M., Ivanova I.P.* // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2019. 28. 085008 (10 pp).
4. *Пискарев И.М.* // *ХВЭ.* 2021. Т. 55(2). 145.
5. *Warren J.J., Winker J.R., Gray H.B.* // *FEBS Lett.* 2012. V. 586(2). 596.
6. *Antosiewicz J.M., Shugar D.* // *Biophys. Rev.* 2016. V. 8. 163.
7. *De Filippis V., Frasson R., Fontana A.* // *Protein Science.* 2006. V. 15. 976.
8. *Goppi A., Anushree and Devoraju KS.* // *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2014. V. 5(1). 269.
9. *De Felippis M.R., Murthy C.P., Broitman F. et al.* // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. 3416.
10. *Song Q.-H., Guo Q.-X., Yao S.-D., Liu N.-Y.* // *Res. Chem. Intermed.* 2002. V. 28(4). 329.
11. *Bartesaghi S., Radi R.* // *Redox Biology.* 2018. V. 14. 618.
12. *Piskarev I.M.* // *Plasma Chem. Plasma Proc.* 2021. V. 41. 1415.
13. *Handbook of Chemistry and Physics, Haynes William M. Editor-in-Chief.* CRC Press. 97 Edition. 2016-2017 Years.
14. *Luo Yu-Ran,* 2003. *Handbook of bond dissociation energies. Organic compound.* CRC Press. Boca Raton, London, New York, Washington.