

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Metodyka wykonywania pomiarów

Dla uzyskania możliwie pełnego obrazu przemian zachodzących w aminokwasach i peptydach zawierających grupę tioeterową podczas utleniania rodnikiem OH konieczne było wykorzystanie kilku technik pomiarowych.

Do śledzenia szybkich przemian krótkożyjących produktów rodnikowych stosowana była radioliza impulsowa.

Trwale, cząsteczkowe produkty reakcji rodnikowych oznaczane były za pomocą stacjonarnej γ -radiolizy połączonej z czułymi metodami analitycznymi: chromatografią gazową i wysokociśnieniową chromatografią jonowykluczającą.

Niektóre z produktów rodnikowych γ -radiolizy były identyfikowane metodą EPR w zamrożonych roztworach wodnych.

4.1.1. Odczynniki. Przygotowanie próbek do pomiarów

Wszystkie stosowane odczynniki były najwyższej dostępnej na rynku czystości. Badane kwasy alkilotiokarboksyłowe, aminokwasy i S-alkiloglutationy pochodziły z firmy SIGMA, estry metylowe L-metioniny i N-acetylo-L-metioniny z firmy Bachem Ester metylowy tiaproliny został otrzymany w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii UAM w Poznaniu z tiaproliny firmy SIGMA. Synteza D,L-homometioniny została wykonana w Hahn-Meithner-Institut für Kernforschung, Berlin wg. procedury opisanej w pracy (Kjaer i Wagner 1955), synteza γ -Glu-Met-Gly została wykonana w Department of Pharmaceutical Chemistry University of Kansas, Lawrence, kwas nadechlorowy był produkcyjny firmy MERCK, wodorotlenek potasowy, p-nitroacetofenon i kwas askorbinowy produkcyjny firmy Aldrich.

Do przygotowania roztworów stosowałem wodę trzykrotnie destylowaną, przy czym drugi stopień destylacji odbywał się z nadmanganianu potasowego, a trzeci z nadmanganianu potasowego. Przed pomiarami roztwory badanych związków były doprowadzane do żądanego pH poprzez dozowanie odpowiedniej ilości roztworów HClO_4 lub KOH. Wartość pH była kontrolowana z dokładnością 0,05, za pomocą przenośnych pH-metrów Cole-Parmer Chemcadet 5986-25, Medicat MAT 1202 i Radelkis OP-113 wyposażonych w elektrody uniwersalne. Bezpośrednio przed napromienianiem badane roztwory były w ciągu 15 - 20 minut nasycały podtlenkiem azotu (o zawartości azotu poniżej 1,7%

objętościowego). W eksperymentach stacjonarnej γ -radiolizy z detekcją chromatograficzną stosowany podtlenek azotu był uprzednio przepuszczany przez płuczkę zawierającą jednomolowy roztwór KOH w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń oraz dwutlenku węgla. W eksperymentach radiolizy impulsowej płuczka zawierała wodę destylowaną.

Nasycanie badanych roztworów N_2O ($[N_2O] \sim 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) miało na celu wyeliminowanie elektronu hydratowanego w procesach rodnikowych z jednoczesnym zwiększeniem wydajności rodników OH obecnych w roztworze. W tym układzie jedynymi aktywnymi produktami radiolizy wody są rodniki OH i atomy wodoru H^1 (Dainton i Peterson 1962, Janata i Schuler 1982). Reakcja konwersji e_{aq}^- w OH zachodzi zgodnie z równaniem [2] (patrz punkt 1.3.1), ze stałą szybkości $k = 9,1 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Janata i Schuler 1982).

Wartości dawki pochłoniętej przez badane roztwory były tak dobrane aby maksymalne zużycie związku badanego nie przekraczało 15% w eksperymencie γ -radiolizy i 1% w eksperymencie radiolizy impulsowej. Próbkki do badań metodą EPR, zawierające od 20 do 100 mg/ml badanego związku w $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ były przed napromienieniem zamrażane przez szybkie zanurzenie wypełnionych nimi rurek kwarcowych w ciekłym azocie.

4.1.2. Radioliza impulsowa

4.1.2.1. Źródła impulsów jonizujących. Akceleratory elektronów

Pomiary widm absorpcyjnych oraz kinetyk powstawania, i zaniku krótkożyciowych indywiduów przejściowych były wykonane metodą radiolizy impulsowej. Ze względu na krótkie czasy życia oczekiwanych indywiduów przejściowych, rzędu dziesiątek ns, konieczne było stosowanie układów do radiolizy impulsowej pozwalających na uzyskanie impulsu elektronów o czasie trwania od kilku do kilkuset ns.

Wykorzystane były układy pomiarowe znajdujące się w trzech ośrodkach naukowych: 1) Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej w Łodzi (MITR), 2) Instytucie Izotopów Węgierskiej Akademii Nauk w

¹ Produkty reakcji atomów H z aminokwasami tioeterowymi wykazują tylko niewielką absorpcję ($\epsilon_{280} = 200 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i nie wpływają znacząco na sygnały obserwowane w tych aminokwasach podczas utleniania przez rodniki OH (Mee i Adelstein 1974, Lichtin i Shafferman 1974, Mee *i in.* 1977, Hiller *i in.* 1981).

Budapeszcie (KFKI), 3) Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie (IChTJ).

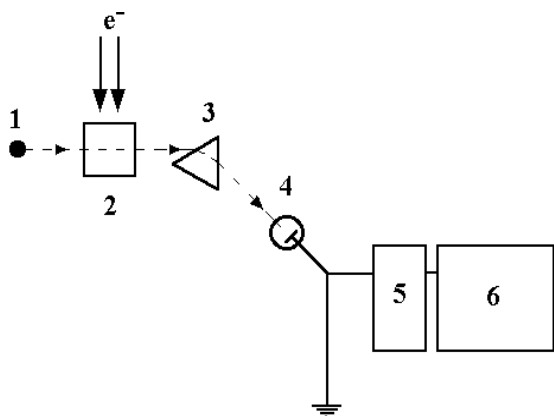
W MITR źródłem impulsów jonizujących jest liniowy akcelerator elektronów produkcji radzieckiej ELU-6E. Jest to liniowy akcelerator wysokiej częstotliwości, tzw. akcelerator z wędrującą falą. Akcelerator ten pozwala na formowanie impulsów elektronów o czasie trwania 2, 7 i 17 ns oraz od 0,3 do 4,5 μ s. Fala elektromagnetyczna wytwarzana jest w magnetronie MI320 pracującym przy częstotliwości 1886 MHz. Wiązka przyspieszonych elektronów, o energii 8 MeV, wyprowadzana jest poprzez okienko z folii tytanowej o grubości 50 μ m. Bliższe dane techniczne dotyczące tego akceleratora można znaleźć w pracach (Karolczak *i in.* 1986, 1992, 1996).

W KFKI źródłem impulsów jonizujących jest liniowy akcelerator elektronów produkcji czechosłowackiej LPR-4. Jest to akcelerator działający na podobnej zasadzie jak ELU-6E. Pozwala on na formowanie impulsów elektronów o energii od 3 do 5 MeV i normalnym czasie trwania 2,6 μ s. Zastosowano tutaj, pomiędzy diodą zasilaną przez modulator emitujący 3 ms (45 kV) pulsy a sekcją przyspieszającą, układ elektrostatycznego odchylenia wiązki. Umożliwia on wydzielenie z 2,6 μ s impulsu fragmentu o czasie trwania 40 lub 80 ns. Źródłem fali przyspieszającej jest w tym przypadku magnetron pracujący przy częstotliwości 2865 MHz. Przyspieszona wiązka elektronów jest wyprowadzana poprzez okienko z folii tytanowej o grubości 35 μ m. Działanie tego akceleratora zostało opisane w pracach (Teplý *i in.* 1975, Földiák *i in.* 1988a, 1988b).

W IChTJ źródłem impulsów elektronów był liniowy akcelerator elektronów produkcji radzieckiej LAE 13/9. Zasada działania tego akceleratora jest taka sama jak dwóch opisanych powyżej. Źródłem fali przyspieszającej elektrony jest tutaj klistron KIU 17 pracujący z częstotliwością 1818 MHz. Akcelerator ten pozwala na formowanie impulsów elektronów o energii od 9 do 13 MeV i czasie trwania 0,5; 2,5 i 5,5 μ s (Zimek *i in.* 1972, 1990, Bobrowski *i in.* 1976).

4.1.2.2. Pomiary absorpcji optycznej.

Pomiary wykonywałem stosując przepływowe kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 2,5; 1,5 i 1 cm. Absorbpcję mierzyłem za pomocą układów do spektrofotometrii kinetycznej powiązanych funkcjonalnie z wyżej opisanymi akceleratorami liniowymi. Ideowy schemat takiego układu przedstawia rysunek 4.1.2_1.



Rys. 4.1.2_1 Uproszczony schemat układu do radiolizy impulsowej: e^- - wiązka elektronów, 1- źródło światła analizującego, 2 - kuweta pomiarowa, 3 - monochromator, 4 - fotopowielacz, 5 - oscyloskop, 6 - mikrokomputer.

wejściową monochromatora. Opcjonalnie stosowano monochromatory siatkowe Bausch & Lomb, Kratos, Acton Research Co. SpectraPro-275² oraz monochromator pryzmatyczny Carl Zeiss Jena. Po wyjściu z monochromatora światło padało na katodę fotopowielacza Hamamatsu 1P28 lub R 928. Sygnał z fotopowielacza rejestrowany był za pomocą oscyloskopu cyfrowego. Równoczesne stosowanie , wariantowo kilku oscyloskopów - Hewlett Packard 54510A 250 MHz, Philips PM 3320E 200 MHz, Tektronix 7834 450 MHz i Tektronix TDS 540 500 MHz umożliwiało jednoczesną rejestrację zmian absorpcji optycznej przy kilku podstawach czasu. Do rejestracji i przetwarzania danych pomiarowych wykorzystano mikrokomputer IBM PC AT sprzężony z oscyloskopami za pomocą interfejsu IEEE488. Pojedynczy przebieg (uśredniony z kilku niezależnych pomiarów) zapamiętywany był na dyskach elastycznych 5,25 i 3,5 cala. Program obsługi oscyloskopów i zapisu danych umożliwia także rejestrację napięcia U_o , dawki zmierzonej za pomocą cewki Rogowskiego, długości fali światła analizującego oraz dodatkowego opisu tekstowego (Karolczak *i in.* 1986, 1992, 1996).

² Podczas pomiarów w zakresie spektralnym powyżej 400 nm, w układach pomiarowych wyposażonych w monochromatory siatkowe stosowany był filtr odcinający zakres ultrafioletu. Filtr produkcji Karl-Zeiss Jena, oznaczony numerem 724, był umieszczony przed szczeliną monochromatora.

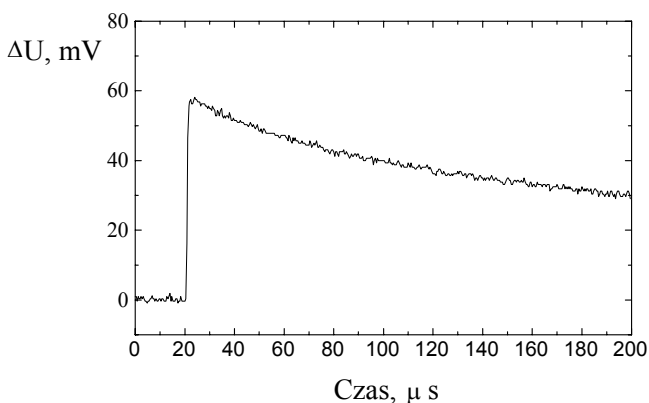
W układzie stosowanym w MITR PŁ źródłem światła analizującego była lampa ksenonowa 150 W firmy Osram, wyposażona w układ dopalania impulsowego.

Przechodzące przez próbkę światło analizujące (w zakresie 230 - 850 nm) kierowane było za pomocą układu soczewek i zwierciadeł na szczelinę

W Instytucie Izotopów Węgierskiej Akademii Nauk do pomiarów optycznych został przystosowany spektrometr kinetyczny Applied Photophysics, Ltd., Model 347 (Applied Photophysics 1982). Przystosowanie to polegało na rozseparowaniu chłodzonej wodą lampy ksenonowej 250 W Thorn EMI oraz przestrzeni, w której umieszcza się próbkę, od monochromatora i fotopowielacza. Monochromator i fotopowielacz, tak jak w układzie stosowanym w MITR PŁ, znajdują się poza pomieszczeniem akceleratora. Transmisję światła analizującego do monochromatora rozwiązano stosując światłowody; ciekły 5 m długości i średnicy 8 mm lub światłowody kwarcowe 4 m długości 5 mm i 3,5 mm średnicy. Światłowód ciekły może transmitować światło w zakresie 300 - 600 nm, kwarcowe w zakresie 400 - 1000 nm. Stosowany był monochromator siatkowy Model 7300 oraz fotopowielacze Hamamatsu 1P28, 1P28A oraz R928 (Földiák *i in.* 1988a, 1988b). Do analizy sygnału z fotopowielacza używano oscyloskopów firmy Philips PM 3375 100 MHz i PM 3335 60 MHz. Gromadzenie i analizę danych rozwiązano podobnie jak w MITR PŁ za pomocą komputera PC AT i dysków elastycznych 3,5 i 5,25 cala.

W układzie stosowanym w IChTJ źródłem światła analizującego była lampa ksenonowa XBO 150 W Osram, wyposażona w układ dopalania impulsowego. Przechodzące przez próbkę światło analizujące kierowane było za pomocą układu soczewek i zwierciadeł na szczelinę wejściową monochromatora pryzmatycznego SPMZ Carl Zeiss Jena. Po wyjściu z monochromatora światło padało na katodę fotopowielacza Hamamatsu R 928. Sygnał z fotopowielacza rejestrowany był za pomocą oscyloskopu IWATSU TS 8123 (100 MHz). Podobnie jak w KFKI i MITR PŁ do rejestracji i przetwarzania danych pomiarowych wykorzystano mikrokomputer IBM PC AT sprzężony z oscyloskopem za pomocą interfejsu.

W eksperymencie radiolizy impulsowej zbiór danych zapisany na dysku elastycznym przedstawiał odczytaną z oscyloskopu zależność ΔU - spadku napięcia wywołanego pochłanianiem światła przez próbkę w funkcji czasu po impulsie promieniowania jonizującego (rysunek 4.1.2_2).



Rys. 4.1.2_2 Zmiana napięcia na wejściu oscyloskopu wywołana pochłonięciem przez roztwór dozymetru rodankowego (patrz niżej) dawki 4,35 Gy w impulsie o czasie trwania 6 ns.

Każdy z wykorzystywanych przeze mnie programów obróbki danych wykonywał operację przeliczania wartości odczytywanych na absorpcję. Wartość absorpcji obliczana była ze wzoru (I):

$$A = \log \frac{U_0}{U_0 - \Delta U} \quad (\text{I})$$

gdzie: U_0 - wartość napięcia będącego miarą początkowego natężenia światła przechodzącego przez próbkę.

Wartość absorpcji jest powiązana z ilością wygenerowanego produktu znaną zależnością Lamberta-Beera (II):

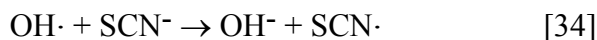
$$A = \varepsilon * c * l \quad (\text{II})$$

gdzie: A - absorpcja; ε - molowy współczynnik absorpcji [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]; c - stężenie [mol dm^{-3}]; l - długość drogi optycznej [cm].

Znajomość położenia pasma absorpcji, współczynnika ε oraz zmian absorpcji w czasie pozwala na jakościową i ilościową interpretację widm.

4.1.2.3. Dozymetria promieniowania impulsowego.

W badaniach stosowałem, zależnie od możliwości układu pomiarowego impulsy o czasie trwania 2, 7, 17 i 80 ns oraz 0,5 μs . Wielkość dawki pochłoniętej podczas impulsu wyznaczałem przy użyciu napowietrzonego dozymetru rodankowego (wodny roztwór KSCN o stężeniu $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ (Földiák *i in.* 1988a, Broszkiewicz 1971)), którego zasada działania opiera się na reakcjach [34] i [35]:



Wydajność anionorodnika $(\text{SCN})_2\cdot^-$ jest równa wydajności rodnika $\text{OH}\cdot$ powstającego w radiolizie wody (w warunkach wysokiego stężenia SCN^- i zmiecenia wszystkich e_{aq}^- przez cząsteczki rozpuszczonego w roztworze tlenu). Absorpcja światła przez $(\text{SCN})_2\cdot^-$ jest łatwa do zmierzenia dla długości fali światła

analizującego $\lambda = 475$ nm, dla której molowy współczynnik absorpcji $(\text{SCN})_2^-$ wynosi $\varepsilon = 7.35 * 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Wzór pozwalający obliczyć dawkę pochłoniętą otrzymuje się wykorzystując zależność Lamberta-Beera (II) oraz wzór (III) pozwalający na obliczenie stężenia rodników powstałych w wyniku napromieniowania

$$c = \frac{G * D * \rho}{N * 1,602 * 10^{-17}} \quad (\text{III})$$

gdzie: G - wydajność chemoradiacyjna tj. liczba cząsteczek produktu powstająca lub zanikająca podczas pochłonięcia przez układ 100 eV ($1G = 0,1036 * 10^{-6} \text{ mol J}^{-1}$); D - dawka pochłonięta [Gy]; ρ - gęstość roztworu dozymetrycznego [kg dm^{-3}], N - liczba Avogadro

Stąd wartość dawki pochłoniętej wyraża się wzorem (IV):

$$D = \frac{A * N}{\varepsilon * l * G * \rho} * 1,602 * 10^{-17} \text{ [Gy]} \quad (\text{IV})$$

który po uwzględnieniu wartości $G = 2,9$, liczby Avogadro, współczynnika absorpcji i przyjęciu gęstości $\rho = 1 \text{ kg dm}^{-3}$ przyjmuje postać (V):

$$D = 4,53 * 10^2 * A / l \text{ [Gy]} \quad (\text{V})$$

W niektórych przypadkach stosowałem dozymetr rodankowy nasycony N_2O , przyjmując za (Schuler i Patterson 1980) $G((\text{SCN})_2^-) = 6,13$ i $\varepsilon = 7,58 * 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dla $\lambda = 472$ nm.

Dawka pochłonięta przez roztwór dozymetryczny przyjmowała wartości od 2 do 12 Gy w zależności od stosowanego układu i długości impulsu. Dozymetrię chemiczną wykonywałem na początku i na końcu każdej sesji pomiarowej. Podczas trwania sesji pomiarowej dla oceny dawki posługiwałem się odczytem wartości prądu wzbudzonego w cewce Rogowskiego przez elektrony pulsu, która to wartość jest liniowo powiązana z wartością dawki pochłoniętej przez próbkę (Zimek 1978, Zimek i Grodkowski 1987). W jednym cyklu pomiarowym rozrzut dawki, zmierzonej cewką Rogowskiego, wokół obliczonej średniej nie przekraczał dziesięciu procent. Stosowanie badanych roztworów wodnych i wodnego roztworu

dozymetrycznego wyeliminowało konieczność uwzględniania poprawki na różnicę gęstości elektronowych podczas obliczania dawki pochłoniętej przez roztwór badany. Wyniki pomiarów z każdej serii były normalizowane na dawkę średnią dla serii pomiarowej.