

УДК 541.515 : 535.37

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

В. Я. Шляпникох

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	684
II. Связь между хемилюминесценцией и механизмом реакций окисления органических веществ молекулярным кислородом	685
III. Применение хемилюминесцентных методов для исследования механизма действия антиоксидантов	687
IV. Хемилюминесцентные методы измерения констант скорости реакций свободных радикалов	691
V. Хемилюминесценция облученных белков, нуклеиновых кислот и синтетических полимеров	696

I. ВВЕДЕНИЕ

Более 40 лет назад в лаборатории электронной химии Ленинградского физико-технического института, возглавляемой Н. Н. Семеновым, были начаты работы по исследованию механизма и кинетики газовых реакций, которые в дальнейшем привели к созданию общей теории термических взрывных процессов. Новые представления о реакциях разветвления, возможности изотермических цепных взрывов, о влиянии размеров реактора и добавок инертных веществ на кинетику цепных реакций были развиты на основе количественных исследований реакции окисления паров фосфора. Интересно, что первоначальная задача этой работы состояла вовсе не в исследовании кинетики процесса, а в изучении влияния давления кислорода на выход хемилюминесценции, сопровождающей окисление. Импульсом к изучению кинетики послужило открытие своеобразных и удивительных критических явлений. Было показано^{1, 2}, что интенсивное свечение возникает только в определенном диапазоне давлений кислорода. При меньших и больших давлениях реакция вообще не идет и свечение отсутствует. В результате экспериментального и теоретического анализа этого явления, проведенного Н. Н. Семеновым, были сформулированы основные положения теории разветвленных цепных реакций. Таким образом, можно сказать, что новый этап в развитии кинетики и ряда смежных областей науки начался с исследований хемилюминесценции.

Хотя окисление фосфора было первым процессом, объясненным с точки зрения теории цепных разветвленных реакций, детальный механизм этого процесса до сего времени не известен и рассматриваемые кинетические схемы имеют гипотетический характер. Твердо установленным можно считать только тот факт, что окисление фосфора осуществляется радикально-цепным путем. Поэтому очевидно, что реакциями свободных радикалов обусловлена и хемилюминесценция, наблюдаемая в этой реакции.

Этот вывод о возникновении хемилюминесценции в результате реакций свободных радикалов относится не только к реакции окисления

фосфора. Для газозфазных реакций он имеет общий характер и полностью обоснован пионерскими количественными исследованиями хемилюминесценции, которые были выполнены М. Полани, В. Н. Кондратьевым, А. Н. Терениным и их сотрудниками. Рассмотрение работ этих авторов и других работ по газозфазным системам показывает, что во всех без исключения газозфазных химических процессах возникновение хемилюминесценции связано с реакциями рекомбинации (или диспропорционирования) свободных радикалов и атомов или с реакциями их присоединения к каким-либо частицам. Энергия этих элементарных актов, как правило, достаточно велика для получения электронно-возбужденных (или сильно колебательно-возбужденных) частиц.

На газозфазных реакциях были установлены основные закономерности хемилюминесценции. Показано, что ее интенсивность пропорциональна скорости той элементарной реакции, в которой образуются возбужденные частицы. Количественно изучено возможное влияние вторичных процессов (тушение возбужденных состояний, передача энергии) на интенсивность свечения. Проведенные исследования хемилюминесценции позволили получить количественную информацию об относительных и абсолютных концентрациях атомов и свободных радикалов в пламенах и продуктах сгорания, константах скорости реакций этих частиц, с распределении продуктов элементарных реакций по энергиям, о процессах обмена энергией при соударениях, об энергиях связи в некоторых молекулах и пр. Результаты этих работ достаточно хорошо известны, суммированы в ряде обзорных статей и монографий и здесь более подробно рассматриваться не будут. Цель настоящего обзора состоит в обсуждении значительно менее изученного вопроса — возможностей применения хемилюминесцентных методов для количественного исследования механизма и кинетики радикальных и цепных реакций, протекающих в жидкой фазе. Возможности этих методов демонстрируются, в основном, на работах, посвященных процессам жидкофазного окисления, выполненным в последние годы в Институте химической физики АН СССР.

II. СВЯЗЬ МЕЖДУ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ И МЕХАНИЗМОМ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МОЛЕКУЛЯРНЫМ КИСЛОРОДОМ

Недавно было показано, что хемилюминесценция в реакциях жидкофазного окисления органических веществ молекулярным кислородом возникает в результате актов диспропорционирования перекисных радикалов³. Поэтому в реакциях окисления интенсивность свечения характеризуется не скоростью процесса в целом, а скоростью взаимодействия перекисных радикалов, и интенсивность свечения пропорциональна скорости этой реакции.

В простейшем случае, когда проводится окисление индивидуального вещества при достаточно высокой концентрации кислорода в жидкой фазе в реакции участвует только один сорт радикалов — перекисные радикалы окисляемого вещества. Эти радикалы образуются по реакции окисляемого вещества с кислородом, либо в результате термического или каталитического распада перекисных соединений, образующихся в ходе процесса окисления, либо в результате распада специально вводимых инициаторов. Полученные радикалы участвуют в цепной реакции и погибают, возбуждая свечение.

В стационарных условиях скорость гибели радикалов равна скорости зарождения цепей. Следовательно, в системах со свободными радикалами одного сорта интенсивность свечения пропорциональна скорости процесса, в котором образуются свободные радикалы — скорости процесса

инициирования. Существование этой зависимости позволяет использовать измерения интенсивности хемилюминесценции как экспрессный метод определения кинетических характеристик реакции инициирования (исследование механизма инициирования, определение энергии активации, порядка и константы скорости реакции инициирования, числа радикалов, образующихся при распаде одной молекулы инициатора) ⁴⁻⁸.

Рассмотрим теперь более сложную систему, содержащую два сорта свободных радикалов — активные и малоактивные. Экспериментально такую систему можно получить, например, добавив в окисляемое вещество ингибитор. В такой системе по-прежнему сохраняется одна хемилюминесцентная реакция, поскольку реакции малоактивных радикалов (в данном случае радикалов ингибитора) недостаточно экзотермичны для возбуждения хемилюминесценции в видимой части спектра. Поскольку часть активных перекисных радикалов погибает, взаимодействуя с ингибитором, скорость диспропорционирования перекисных радикалов не равна скорости их образования и интенсивность свечения I в такой системе характеризует не скорость инициирования, а концентрацию перекисных радикалов RO_2 , причем

$$[RO_2] \sim \sqrt{I}$$

По мере увеличения концентрации ингибитора, взаимодействующего с перекисными радикалами, интенсивность свечения убывает. Как показано в работах ⁷⁻¹⁰, зависимость интенсивности свечения от концентрации (при постоянной скорости инициирования) можно использовать для измерения активности ингибиторов, их концентраций, определения числа цепей, обрываемых одной молекулой ингибитора, определения скорости инициирования, а также в целях исследования механизма действия ингибитора.

Если реакция идет с участием двух сортов активных радикалов, то в системе возможны три хемилюминесцентные реакции рекомбинации. Получить такую систему можно, например, путем добавки вещества, способного к реакции с активными радикалами. Одна из простейших систем с двумя сортами активных радикалов возникает при введении небольших количеств кислорода в раствор инициатора в окисляемом веществе. При этом по реакции с кислородом часть содержащихся в системе алкильных радикалов R превращается в RO_2 . При введении кислорода интенсивность свечения возрастает, так как кислородсодержащие продукты рекомбинации перекисных радикалов имеют полосы испускания в видимой части спектра. Такие полосы, как правило, отсутствуют у продуктов рекомбинации радикалов $R+R$ и $R+RO_2$. Поэтому фактически в рассматриваемой системе идет только одна хемилюминесцентная реакция и интенсивность свечения, как и в предыдущем случае, характеризует концентрацию перекисных радикалов. В такой системе из зависимости интенсивности от концентрации растворенного кислорода можно оценить относительную реакционную способность алкильных радикалов по отношению к кислороду ¹¹.

Квантовый выход хемилюминесценции меняется не только при переходе от одного типа радикалов к другому (например, от R к RO_2). Выход зависит также от строения радикала R , входящего в состав свободного перекисного радикала. Если в реакции участвуют перекисные радикалы двух сортов (как, например, в реакции соокисления двух веществ R_1H и R_2H), то с изменением состава смеси изменяется соотношение между концентрациями радикалов R_1O_2 и R_2O_2 и поэтому интенсивность свечения зависит от состава. Когда выходы хемилюминесценции в одновременно идущих реакциях рекомбинации различаются сравни-

тельно мало, то зависимость интенсивности свечения от концентрации одного из реагентов оказывается более сложной, чем в предыдущем случае. Однако и в таких системах при благоприятных условиях удается из измерений хемилюминесценции получить значения кинетических параметров реакции ¹².

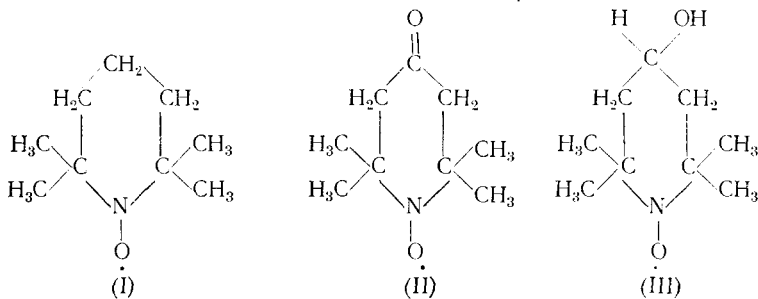
Таким образом, количественные исследования закономерностей хемилюминесценции в реакциях жидкофазного окисления показывают, что интенсивность свечения в системах с одной хемилюминесцентной реакцией (или в системах, где выход хемилюминесценции и одной из реакций много выше, чем в других) характеризует скорость рекомбинации свободных радикалов. Поэтому все факторы, влияющие на концентрацию радикалов — температура, концентрации реагентов, добавки ингибиторов, катализаторов и др., влияют на интенсивность свечения. Кроме того по интенсивности свечения часто удается проследить за превращением одного сорта радикалов в другой. Это открывает возможность измерять по интенсивности свечения относительную концентрацию свободных радикалов и регистрировать ее изменение как в ходе реакции, так и при изменении условий опыта. Ввиду большой чувствительности хемилюминесцентного метода, он нередко оказывается единственным прямым методом, позволяющим непосредственно регистрировать изменения концентрации свободных радикалов.

III. ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ АНТИОКИСЛИТЕЛЕЙ

В этом разделе рассматриваются результаты нескольких работ, в которых изложенные выше представления о механизме хемилюминесценции в реакциях ингибированного окисления использованы для выяснения механизма действия различных ингибиторов — антиоксидантов.

1. О механизме обрыва цепей окисления стабильными азотокисными радикалами

Фенолы и амины, используемые в качестве ингибиторов, при взаимодействии с перекисными радикалами образуют малоустойчивые промежуточные продукты — гидроперекиси, легко распадающиеся с образованием свободных радикалов, что снижает эффективность их действия. Поэтому большой интерес представляет поиск ингибиторов, обрывающих цепи без образования разветвляющихся агентов. К ингибиторам такого типа относятся стабильные азотокисные радикалы:



механизм ингибирующего действия которых исследовался в работе ¹³.

Опыты проводили при различных концентрациях азотокисных радикалов и различных парциальных давлениях кислорода в газовой смеси,

барботирующей через окисляющийся этилбензол. В ходе опытов методом ЭПР измеряли концентрации стабильных радикалов и хемилюминесцентным методом — концентрации перекисных радикалов. Опыты показали, что при достаточно больших концентрациях кислорода добавки стабильных радикалов не влияют на интенсивность свечения. Следовательно, азотокисные радикалы $\dot{\text{O}}\text{NR}'$ не взаимодействуют с перекисными. Однако они энергично реагируют с алкильными радикалами. Это видно из того факта, что в отсутствие кислорода азотокисные радикалы, когда их концентрация превышает $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, расходуются со скоростью инициирования. Таким образом, ингибирующая способность азотокисных радикалов определяется соотношением между скоростями двух конкурирующих реакций:

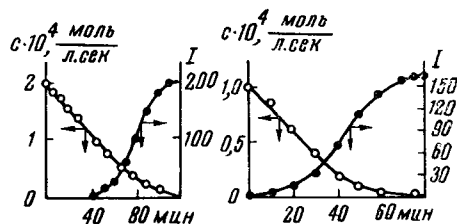


Рис. 1. Изменение концентрации азотокисных радикалов (I) и интенсивности хемилюминесценции (в условных единицах) при двух начальных концентрациях азотокиси (азот, барботирующийся через этилбензол, содержит 9,3% кислорода)

Р + $\text{O}_2 \xrightarrow{k_1} \text{RO}_2$ (1)
 $\text{R} + \dot{\text{O}}\text{NR}' \xrightarrow{k_2} \text{стабильные продукты}$ (2)

На рис. 1 показано как меняется интенсивность свечения и концентрация азотокисных радикалов I в области малых концентраций кислорода, когда реакции (1) и (2) идут со сравнимыми скоростями. По этим

данным была определена величина отношения кинетических констант $\frac{k_1}{k_2} = 26 \pm 3$ для азотокисных радикалов I, II и III. Для более стабильного алкильного радикала дифенилметана величина этого отношения составляет $1,4 \pm 0,2$, что можно объяснить уменьшением константы k_1 . Таким образом, азотокисные радикалы могут эффективно подавлять цепи окисления таких веществ, алкильные радикалы которых стабилизированы сопряжением и сравнительно медленно взаимодействуют с кислородом, причем эффективность действия радикалов $\dot{\text{O}}\text{NR}'$ увеличивается по мере уменьшения концентрации кислорода.

2. Взаимодействие гидроперекиси этилбензола с тиофенолом при окислении этилбензола

По имеющимся данным ¹⁴⁻¹⁶, при окислении органических веществ соединения типа тиофенола могут реагировать как с гидроперекисями, так и с перекисными радикалами. Существование обеих реакций легко обнаруживается по кинетике хемилюминесценции ¹⁷. Введение тиофенола RSH в окисляющийся этилбензол, содержащий инициатор — динитрил азоизомасляной кислоты, приводит к снижению интенсивности свечения I . Зависимость I от $[\text{RSH}]$ не отличается по виду от соответствующей зависимости для других ингибиторов, которые не реагируют с гидроперекисью, и может быть использована для определения константы скорости реакции взаимодействия тиофенола с перекисными радикалами. Сравнение с другими ингибиторами показывает, что тиофенол реагирует с перекисными радикалами столь же эффективно, как ионол, часто используемый в качестве антиокислителя.

Поскольку тиофенол действует как ингибитор, он постепенно расходуются, и в ходе реакции интенсивность свечения возрастает. Однако он расходуются значительно быстрее, чем ионол, реагирующий только с перекисными радикалами. Формально это видно из того, что среднее

число цепей, обрываемых одной молекулой тиофенола, равно 0,3 *. в то время как ионол обрывает две цепи. Это различие можно объяснить дополнительным потреблением тиофенола в реакции с гидроперекисью. Последняя реакция обнаруживается по хемилюминесценции, возникающей при введении тиофенола в этилбензол, содержащий гидроперекись ($\sim 5 \cdot 10^{-2}$ моль/л). До введения тиофенола свечение не наблюдается, так как гидроперекись распадается в условиях опыта слишком медленно. Добавки ингибитора α -нафтола возникающую хемилюминесценцию ослабляют. Это означает, что гидроперекись этилбензола реагирует с тиофенолом с образованием активных радикалов, которые в среде этилбензола превращаются в перекисные радикалы этилбензола.

Таким образом, рассмотрение закономерностей хемилюминесценции показывает, что на начальных стадиях реакции окисления, когда концентрация гидроперекиси мала, тиофенол действует как ингибитор. На более глубоких стадиях возникает дополнительная реакция с гидроперекисью.

3. Синергетическое действие ингибиторов в процессе окисления углеводородов

На рис. 2, А показаны кинетические кривые хемилюминесценции, характеризующие расходование двух ингибиторов и их смеси в реакции окисления этилбензола, инициированной динитрилом азонзоемассляной кислоты¹⁸. Из рис. 2 видно, что α -нафтол (кривая 1) — более сильный

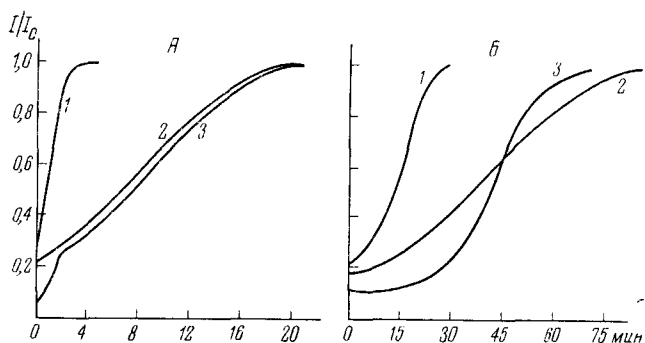


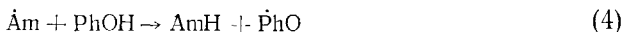
Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесценции в реакции окисления этилбензола, ингибированной добавками: А, 1 — α -нафтола ($0,22 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 — неозона D ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 3 — их смеси в тех же концентрациях. Б, 1 — неозона D ($1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 — фенольного ингибитора азолактона ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 3 — их смеси в тех же концентрациях

ингибитор, чем неозон D (кривая 2). Взятый в меньшей концентрации, α -нафтол в момент времени $t=0$ столь же сильно снижает интенсивность свечения, как и неозон D. Следовательно, в первый момент времени скорости расходования обоих ингибиторов одинаковы. Так как концентрация α -нафтола в 5 раз ниже, относительная скорость его расходования выше. При действии смеси ингибиторов в той же концентрации (кривая 3), сначала расходуются α -нафтол, а затем — неозон D. Это видно

* Число обрываемых цепей определяется из кинетических кривых хемилюминесценции¹⁰.

по форме кривых. Совсем по-иному (рис. 2, Б) ведет себя другая пара — неозон D (кривая 1) и фенольный ингибитор азолактон* (кривая 2). Из этих двух ингибиторов, как видно из рис. 2, Б, более активен неозон D. Однако при действии смеси (кривая 3) сначала расходуется более слабый фенольный ингибитор, а затем более активный. Этому соответствует пологий начальный участок кривой хемилюминесценции и на более поздних стадиях — значительно более крутой, совпадающий по форме с кривой хемилюминесценции в присутствии чистого неозона D. В то же время интенсивности свечения в момент $t=0$ для обеих смесей ингибиторов (рис. 2, А и Б) хорошо совпадают с расчетными, полученными по известным константам скорости взаимодействия каждого из ингибиторов в отдельности с перекисными радикалами¹⁹. Отсюда следует, что в момент смешения ингибиторы друг с другом не взаимодействуют.

Исследования^{18–22}, в которых сочетались описанные выше хемилюминесцентные методы и обычные методы анализа потребления ингибиторов в ходе реакции окисления, позволили объяснить синергетический эффект (рис. 2, Б) реакциями:



где AmH и $\dot{\text{Am}}$ — соответственно, амин и свободный радикал, PhOH и $\dot{\text{PhO}}$ — фенольный ингибитор и образующийся свободный радикал.

Из схемы следует, что с перекисными радикалами взаимодействует более активный ингибитор — амин, но он регенерируется по реакции (4). В результате амин начинает расходоваться только после потребления слабого ингибитора — фенола.

4. О механизме ингибирующего действия эфиров фосфористой кислоты

С целью выяснения механизма ингибирующего действия фосфитов в работе²³ исследовалась кинетика хемилюминесценции в реакции окисления этилбензола, инициированной динитрилом азоизомасляной кислоты, в присутствии фосфитов различного строения и веществ, входящих в состав молекул фосфитов.

Описанными уже выше методами по ослаблению хемилюминесценции и по кинетике хемилюминесценции, характеризующей расходование ингибитора, было показано, что высокой активностью по отношению к перекисным радикалам обладают только фосфиты с фенольными заместителями. Алкилзамещенные фосфиты и фосфаты, а также фосфористая кислота, с перекисными радикалами практически не реагируют.

Интересная особенность кинетических кривых хемилюминесценции в присутствии фосфитов с фенольными заместителями состоит в том, что эти соединения очень мало снижают интенсивность свечения, — и в этом отношении ведут себя как слабые ингибиторы, и в то же время очень быстро, как сильные ингибиторы, расходуются; причем скорость их расходования в 10—100 раз превышает скорость образования радикалов при распаде инициатора. Если хранить эти соединения не в вакууме, а в контакте с атмосферой, то по мере увеличения срока хранения характер кинетических кривых постепенно изменяется: фосфиты все

* 4(4'-окси, 3',5'-ди-*трет*-бутилбензаль)-2-фенилоксазолактон.

сильнее ослабляют свечение и скорости их расходования все больше снижаются, приближаясь к скорости инициирования. Отсюда следует, что ингибирующей способностью обладают не сами фосфиты, а фенолы, образующиеся в результате их гидролиза при хранении. Если при гидролизе образовалось несколько процентов сильного ингибитора, то свечение ослабляется мало, так как концентрация введенного ингибитора в десятки раз меньше концентрации фосфита, и при расчете получаются сильно завышенные скорости расходования, так как расчет ведется на концентрацию введенного фосфита.

Предположение о таком механизме действия подтверждается анализом кривых свечения в присутствии достаточно больших концентраций фосфитов. Для примера на рис. 3 показана кривая свечения для тритретичнобутилфенилпирока-техинофосфита. Кривая имеет два четко выраженных участка *ab* и *bc*. Максимальные угловые коэффициенты этих участков α точно совпадают с величинами α_1 для пирока-техина (участок *ab*) и α_2 для тритретичного бутилфенола (участок *bc*), как показано пунктирными прямыми. Таким образом, ингибирующее действие фосфитов в реакциях окисления связано с реакциями продуктов их гидролиза.

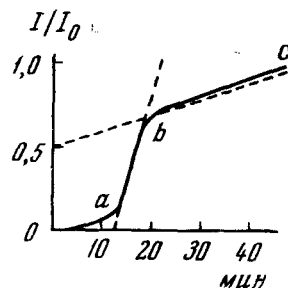


Рис. 3. Изменение относительной интенсивности хемилюминесценции в реакции окисления этилбензола, ингибированной добавкой тритретичнопирока-техинофосфата

IV. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ КОНСТАНТ СКОРОСТИ РЕАКЦИЙ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Большинство методов определения констант скорости реакций свободных радикалов основано на измерениях нестационарной кинетики. Определение кинетических констант путем прямого измерения стационарной концентрации радикалов встречает большие затруднения. Медленные химические процессы идут обычно при низких стационарных концентрациях радикалов, и лишь в редких случаях удастся найти достаточно чувствительный метод измерения. Следует отметить, что определение констант скорости реакций свободных радикалов является обычно делом сложным и трудоемким. Появившиеся недавно хемилюминесцентные методы в ряде случаев задачу существенно упрощают.

1. Хемилюминесцентный метод фотохимического последействия

Метод основан на измерении кинетики хемилюминесценции в реакции окисления, протекающей при нестационарном режиме в результате резкого изменения скорости инициирования²⁴. В нестационарном режиме изменение концентрации радикалов во времени описывается уравнением

$$\frac{d[RO_2]}{dt} = \omega_i - k_6 [RO_2]^2, \quad (5)$$

где ω_i — скорость инициирования и k_6 — константа скорости рекомбинации радикалов. Вид решения уравнения (5) определяется начальными условиями. Если проводить фотохимическую реакцию при постоянной интенсивности возбуждающего света, т. е. при $\omega_i = \text{Const}$, то в системе

установится стационарная концентрация радикалов

$$[\text{RO}_2]_{\text{ст}} = \sqrt{\frac{\omega_i}{k_6}} \quad (6)$$

После выключения света $\omega_i = 0$ и концентрация радикалов будет падать в результате их рекомбинации

$$-\frac{d[\text{RO}_2]}{dt} = k_6 [\text{RO}_2]^2 \quad (7)$$

Решение уравнения (7) имеет вид

$$\frac{[\text{RO}_2]_{\text{ст}}}{[\text{RO}_2]} - 1 = k_6 [\text{RO}_2]_{\text{ст}} t \quad (8)$$

Переходя от концентрации радикалов к интенсивности и используя соотношение (6), получаем выражение

$$\sqrt{\frac{I_{\text{ст}}}{I}} - 1 = \sqrt{k_6 \cdot \omega_i} t. \quad (9)$$

позволяющее определить значение k_6 по кинетике затухания хемилюминесценции. Экспериментальное определение значения ω_i — величины, входящей в соотношение (9), труда не составляет и может быть выполнено различными способами.

Среднее время жизни радикалов

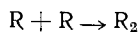
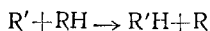
$$\tau = \frac{1}{\sqrt{\omega_i k_6}} \quad (10)$$

Константы скорости рекомбинации перекисных радикалов обычно заключены в пределах 10^4 — 10^8 л/моль · сек. Благодаря высокой чувствительности хемилюминесцентного метода, опыты можно проводить при ω_i порядка 10^{-10} моль/л · сек. В таких условиях 10 сек. $\leq \tau \leq 1000$ сек. и опыты по измерению кинетики хемилюминесценции можно проводить на стандартной аппаратуре с применением обычных самописцев ЭПП-09.

2. Хемилюминесцентный метод кислородного последействия

Методом кислородного последействия²⁴⁻²⁶, так же как и методом фотохимического последействия, определяются константы скорости рекомбинации радикалов по кинетике установления стационарного режима, регистрируемой по хемилюминесценции. Различие состоит в способе получения нестационарной концентрации радикалов. В методе кислородного последействия нестационарная концентрация перекисных радикалов создается путем быстрой подачи кислорода в систему, состоящую из вещества, способного к окислению RH и инициатора Y.

До введения кислорода в такой системе идут реакции: $Y \rightarrow R' + R' +$ + продукты (скорость иницирования — ω_i)



и стационарная концентрация радикалов R

$$[R]_{\text{ст}} = \sqrt{\frac{\omega_i}{k_4}}$$

В момент подачи кислорода очень быстро по реакции



происходит превращение радикалов R в RO_2 . Константа скорости реакции (11) настолько велика, что превращение происходит за очень малое время и можно считать, что концентрация перекисных радикалов в момент подачи кислорода $[RO_2]_0 = [R]_{ст}$. Поскольку в общем случае константа скорости рекомбинации перекисных радикалов k_6 отлична от константы скорости k_4 , начальная концентрация радикалов $[RO_2]_0$ будет нестационарной. Поэтому после подачи кислорода и превращения радикалов R в RO_2 концентрация последних начнет изменяться, стремясь к стационарному значению

$$[RO_2]_{ст} = \sqrt{\frac{\omega_i}{k_6}}$$

Кинетика изменения концентрации перекисных радикалов и, соответственно, — интенсивности свечения описывается уравнениями (12) и (13)

$$\ln \frac{[RO_2]_{ст} + [RO_2]}{[RO_2]_{ст} - [RO_2]} \cdot \frac{[RO_2]_{ст} - [RO_2]_0}{[RO_2]_{ст} + [RO_2]_0} = 2 \sqrt{\omega_i \cdot k_6} t \quad (12)$$

$$\ln \frac{\sqrt{I_{ст}} + \sqrt{I}}{\sqrt{I_{ст}} - \sqrt{I}} \cdot \frac{\sqrt{I_{ст}} - \sqrt{I_0}}{\sqrt{I_{ст}} + \sqrt{I_0}} = 2 \sqrt{\omega_i \cdot k_6} t \quad (13)$$

получаемыми из решения уравнения (5) при условии $[RO_2] = [RO_2]_0$ при $t=0$. Использование уравнения (13) позволяет находить значения k_6 .

Поскольку

$$k_4 [R]_{ст}^2 = k_4 [RO_2]_0^2 = k_6 [RO_2]_{ст}^2 = \omega_i,$$

то полученное значение k_6 можно использовать для определения k_4

$$k_4 = k_6 \frac{[RO_2]_{ст}^2}{[RO_2]_0^2}$$

или

$$k_4 = k_6 \frac{I_{ст}}{I_0} \quad (14)$$

Таким образом, метод кислородного последействия позволяет определить из одного опыта не только константу скорости рекомбинации перекисных радикалов k_6 (процесса, сопровождаемого свечением), но и радикалов R (при рекомбинации которых свечение практически отсутствует).

Возможные кинетические кривые хемилюминесценции при различных соотношениях между константами k_4 и k_6 показаны на рис. 4. Только в случае $k_4 = k_6$ (рис. 4, 3) метод кислородного последействия становится неприменимым.

В работе²⁴ эффект кислородного последействия измеряли в реакциях окисления кумола и этилбензола. Как показали измерения, для кумола

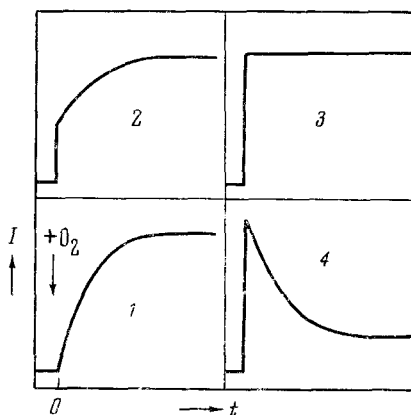


Рис. 4. Схемы кинетических кривых хемилюминесценции: 1 — $k_4 \gg k_6$; 2 — $k_4 > k_6$; 3 — $k_4 = k_6$; 4 — $k_4 < k_6$

$k_4 \gg k_6$. Это видно из кинетики хемилюминесценции (рис. 5) по отсутствию начального скачка интенсивности. В таком случае можно считать, что $[RO_2]_0 = 0$ и для описания кинетики использовать уравнение (13) в форме:

$$\ln \frac{\sqrt{I_{cr}} + \sqrt{I}}{\sqrt{I_{cr}} - \sqrt{I}} = 2\sqrt{k_6 \cdot \omega_i t} \quad (15)$$

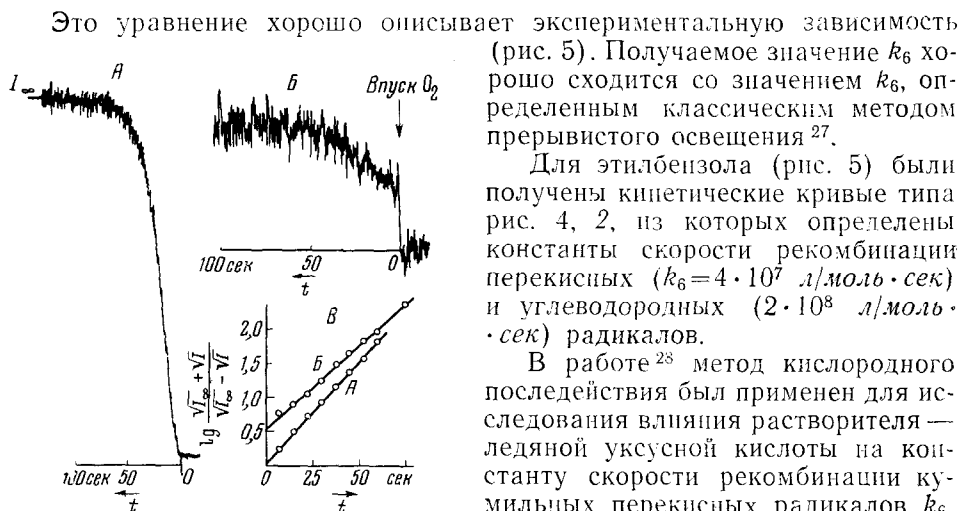


Рис. 5 Кинетика хемилюминесценции после быстрого насыщения кислородом. А — кумол, инициатор — дициклогексилпероксидкарбонат, 40° , $\omega_i = 1,49 \cdot 10^{-8}$ моль/л·сек; Б — этилбензол, инициатор — азоэтилбензол, 36° , $\omega_i = 1,75 \cdot 10^{-8}$ моль/л·сек; В — анаморфозы кривых А и Б

станты k_6 скорость окисления кумола в 30%-ном растворе падает в полтора раза (с учетом эффекта разведения).

3. Хемилюминесцентный метод быстрого разогрева

Для определения констант скорости радикальных реакций по кинетике хемилюминесценции можно использовать для создания нестационарного режима, кроме уже описанных методов, быстрый разогрев, введение какого-либо реагента (инициатора, окисляемого вещества, ингибитора и т. д.), прекращение или изменение интенсивности иницирования, осуществляемого ультразвуком, проникающей радиацией, электрохимической реакцией и т. д. Пока только часть этих методов использовалась для измерения констант скорости. Так, в работах ^{29, 30, 31} использовался метод разогрева для оценки константы скорости рекомбинации радикалов инициатора — динитрила азоизомасляной кислоты. Метод основан на введении инициатора (в малом объеме $\sim 0,1$ – $0,01$ мл) в нагретый инертный растворитель — хлорбензол (содержащий активатор — вещество, усиливающее свечение, и кислород) и регистрации кинетической кривой хемилюминесценции, отражающей кинетику накопления

радикалов инициатора. В момент введения инициатора $[RO_2]_0=0$; $I=0$ и кинетика хемилюминесценции описывается уравнением (15).

По проведенным оценкам $3 \cdot 10^7 < k_6 < 9 \cdot 10^7$ л/моль · сек²⁹; в работе³¹ приводится значение $(1,6 \pm 0,8) \cdot 10^8$ л/моль · сек.

В работе³² методом разогрева исследовали влияние среды на константы скорости рекомбинации перекисных радикалов метилэтилкетона. Отличие от только что упоминавшихся работ состояло в том, что малый объем раствора инициатора вводили не в нагретый инертный раствори-

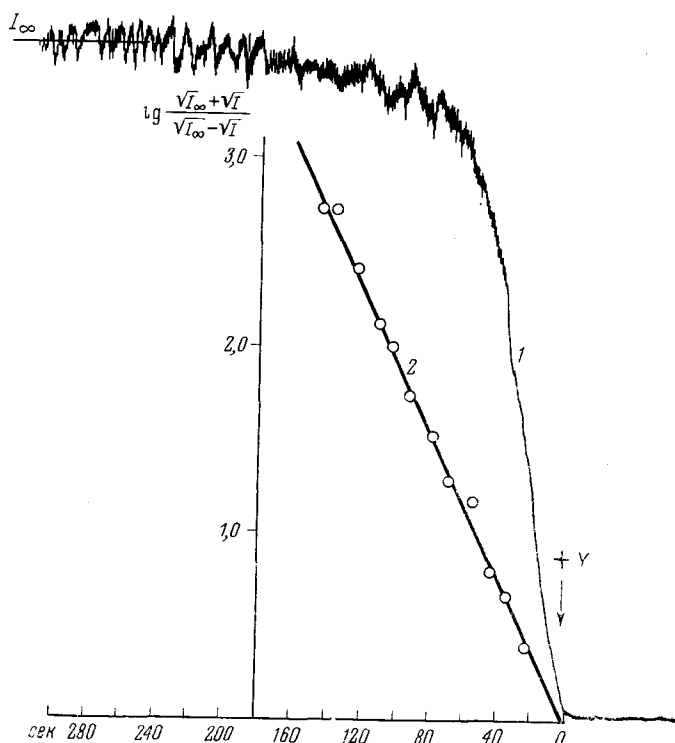


Рис. 6. Кинетика хемилюминесценции (I) после введения инициатора в раствор метилэтилкетона в бензоле (1:4), $\omega_i = 3,8 \cdot 10^{-8}$ моль/л · сек, 60° . 2 — полулогарифмическая анаморфоза кривой 1. Момент введения инициатора Y указан стрелкой

тель, а в окисляемое вещество — метилэтилкетон, либо в метилэтилкетон, смешанный с каким-либо растворителем (бензол, вода, нитробензол). Кинетика хемилюминесценции в этой системе также описывается уравнением (15), которое, как видно из рис. 6, хорошо выполняется.

В работе³² показано, что добавки бензола и воды вызывают уменьшение значений k_6 , а добавки нитробензола — увеличение. Эффекты довольно значительны: добавление 20 мол. % бензола снижает k_6 более, чем в 2 раза, воды — почти в 4 раза, нитробензола — увеличивает k_6 в 7 раз.

Хотелось бы отметить, что работы^{28, 32} — это первые исследования влияния растворителя на константы скорости элементарных реакций свободных радикалов в процессах окисления. Прежде такие исследования не проводились, так как измерение даже одного значения константы было связано с очень большими затратами времени.

V. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ОБЛУЧЕННЫХ БЕЛКОВ, НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

В последнее время появились работы по исследованию хемилюминесценции облученных белков, нуклеиновых кислот и синтетических полимеров, в которых была установлена связь между свободно-радикальными процессами и хемилюминесценцией. В этих работах хемилюминесцентные методы применены для идентификации свободных радикалов, для измерения кинетики гибели радикалов, для выявления реакций, приводящих к образованию свободных радикалов, и для оценки радио-защитного эффекта соединений различных классов.

В работах³³⁻³⁵ была обнаружена хемилюминесценция сухих облученных синтетических полимеров и биополимеров (полиметилметакрилат, полистирол, бычий сывороточный альбумин, сывороточный альбумин человека, яичный альбумин, казеин и др.). Сопоставление кривых

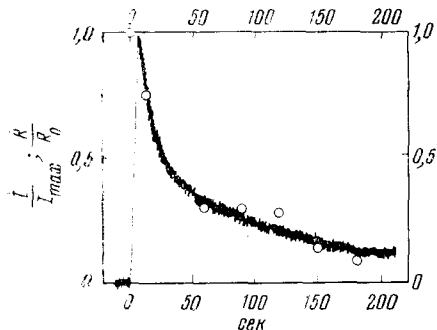


Рис. 7. Кинетика изменения относительной интенсивности хемилюминесценции (сплошная кривая) и кинетика изменения относительной концентрации радикалов (точки на кривой) при растворении облученного полиметилметакрилата в 1,2-дихлорэтаноле

представлены кинетические кривые свечения (сплошная линия) и концентрации радикалов (точки) при растворении облученного полиметилметакрилата в дихлорэтаноле. Как видно из рис. 7, и в этом случае временной ход свечения повторяет кинетику убыли радикалов.

Свечение ослабевает или полностью исчезает при удалении кислорода. Добавление в раствор ингибиторов свободно-радикальных процессов (например, ионола) ведет к уменьшению интенсивности свечения.

В цитированных выше работах показано, что свечение связано с реакцией рекомбинации перекисных радикалов. Совпадение кинетических кривых свечения и гибели радикалов авторы объясняют тем, что кинетику гибели лимитируют процессы растворения, диффузии кислорода и растворителя. Ввиду сложности систем экспериментальные данные не позволяют пока получить, без многих допущений, количественную информацию об элементарных процессах присоединения кислорода и константах скорости рекомбинации радикалов.

Для радиационной биологии особый интерес представляют исследования реакций свободных радикалов в растворах. В этих исследованиях также возможно применение хемилюминесцентных методов. Использование высокочувствительной проточной установки³⁶ позволило зарегистри-

затухания хемилюминесценции и падения концентрации свободных радикалов после облучения (концентрации радикалов измерялись методом ЭПР) показало, что кривые хемилюминесценции количественно характеризуют падение концентрации радикалов. Если совместить кривые свечения и концентрации радикалов в одной точке путем изменения масштаба по оси ординат, то кривые полностью совмещаются. Это позволяет исследовать кинетику гибели радикалов хемилюминесцентным методом при малых дозах облучения, когда не хватает чувствительности спектрометра ЭПР.

Аналогичные зависимости были получены при изучении вспышки хемилюминесценции при растворении облученных белков и полимеров³⁵. На рис. 7

стрировать явление длительного послесвечения водных растворов некоторых белков и полимеров (сывороточный альбумин, гемоглобин, трипсин, полиэтиленоксид, поливинилпирролидон и др.), облученных ультрафиолетом и рентгеновскими лучами при малых дозах облучения^{37, 38}. Проведенное исследование привело к выводу, что послесвечение представляет собой хемилюминесценцию, возникающую при рекомбинации перекисных радикалов³⁸.

Исследование действия различных веществ на кинетику послесвечения показало^{39, 40}, что вещества, обладающие радиозащитным действием (вещества, содержащие серу, фенолы), наиболее сильно увеличивают скорость затухания свечения. Те же вещества еще сильнее влияют на кинетику, если они вводятся в систему до облучения. В то же время вещества со слабо выраженным радиозащитным действием на кинетику послесвечения влияют мало. По-видимому, дальнейшие исследования механизма длительного послесвечения помогут выяснить некоторые вопросы первичного действия излучения. Кроме того измерения кинетики послесвечения могут оказаться полезными для предварительного отбора радиозащитных веществ.

В работах^{41, 42} изучалось послесвечение облученных (при комнатной температуре) водных растворов ДНК. Хемилюминесценция наблюдалась при нагревании растворов выше 40°. Было показано, что свечение связано с распадом неустойчивых перекисных соединений ДНК, образующихся в ходе облучения в присутствии кислорода. По кинетике затухания свечения, характеризующей скорость распада инициатора, получены значения константы скорости распада перекисных соединений и энергии активации (13 ккал/моль). Это значение совпадает с энергией активации реакции распада наименее устойчивой гидроперекиси ДНК и гидронерекиси цитозина⁴². Начальная интенсивность свечения пропорциональна концентрации перекисных соединений ДНК, что может быть использовано как метод определения содержания перекисных соединений в облученных растворах. Хемилюминесценция в этих системах, очевидно, связана с реакциями свободных радикалов, о чем свидетельствует ослабление свечения антиокислителями. Наиболее эффективно снижают интенсивность хемилюминесценции ДНК те из ингибиторов (например, пропилгаллат), которые значительно уменьшают послерадиационное падение вязкости растворов ДНК. При добавках после облучения ингибиторы, слабо влияющие на послерадиационное падение вязкости, незначительно меняют и интенсивность свечения. Эти данные еще раз показывают возможность применения хемилюминесцентных методов для оценки радиозащитного действия различных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Chariton, Z. Watta, Ztschr. Phys., **39**, 547 (1926).
2. N. Semenov, Там же, **46**, 109 (1927).
3. В. Я. Шляпнито, О. Н. Карпухин, Л. М. Постников, И. В. Захаров, А. А. Вичутинский, В. Ф. Цепалов, Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов, Изд. «Наука», М., 1966.
4. И. В. Захаров, В. Я. Шляпнито, Кинетика и катализ, **4**, 706 (1963).
5. И. В. Захаров, В. Я. Шляпнито, ДАН, **150**, 1069 (1963).
6. С. С. Иванчев, А. Ф. Гук, В. Я. Шляпнито, Ж. прикл. спектроск., **1966**, № 5.
7. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпнито, Н. В. Золотова, Изв. АН СССР, сер. хим., **1963**, 1718, 1722.
8. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпнито, Н. В. Золотова, З. Г. Козлова, И. Ф. Русина, ЖФХ, **37**, 1636 (1963).
9. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпнито, И. Ф. Русина, Н. В. Золотова, Ж. аналит. химии, **18**, 1021 (1963).

10. О. Н. Карпухин, Канд. диссертация, МФТИ, М., 1964.
11. В. Я. Шляпинтох, Докт. диссертация, ИХФ АН СССР, М., 1964.
12. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпинтох, И. Д. Михайлов, ЖФХ, **38**, 156 (1964).
13. М. С. Хлоплянкина, А. Л. Бучаченко, М. В. Нейман, А. Г. Васильева, Кинетика и катализ, **6**, 394 (1965).
14. G. W. Kennerly, W. L. Patterson, Ind. Eng. Chem., **48**, 1917 (1956).
15. И. Л. Кнулянец, А. Ф. Фокин, Усп. химии, **19**, 545 (1950).
16. Б. М. Михайлов, А. Н. Блохина, Проблемы механизма органических реакций, Изд. АН СССР, М., 1954.
17. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Л. И. Матиенко, Сб. трудов конф. по химии перекисных соединений, Изд. «Наука», М., 1966.
18. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Л. И. Матиенко, Нефтехимия, (в печати).
19. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, О. Н. Карпухин, ЖФХ, **39**, 498 (1965).
20. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль, ДАН, **152**, 110 (1963).
21. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль, ДАН, **160**, 158 (1965).
22. Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль, Нефтехимия, **5**, 394 (1965).
23. М. С. Хлоплянкина, О. Н. Карпухин, А. Л. Бучаченко, П. И. Левин, Нефтехимия, **5**, 49 (1965).
24. А. А. Вичутинский, ДАН, **157**, 150 (1964).
25. А. А. Вичутинский, XIII Совещ. по люминесценции, Тезисы докладов, М., 1964.
26. А. А. Вичутинский, Канд. диссертация, ИФХ АН СССР, М., 1965.
27. H. W. Melville, S. Richards, J. Chem. Soc., **1954**, 944.
28. А. А. Вичутинский, А. Ф. Гук, В. Ф. Цепалов, В. Я. Шляпинтох, Изв. АН СССР, сер. хим. (в печати).
29. А. А. Вичутинский, Nature, **206**, 292 (1965).
30. А. А. Вичутинский, Сб. Химия, серия Мир глазами молодого ученого, Изд. «Наука», М., 1966.
31. В. М. Гольдберг, Л. К. Обухова, ДАН, **165**, 860 (1965).
32. Г. Е. Занков, А. А. Вичутинский, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль, ДАН (в печати).
33. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, Н. М. Эмануэль, Сб. Биолуминесценция, Труды МОИП, т 21, Изд. «Наука», М., 1965.
34. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, Тезисы докладов на симпозиуме МОИП «Свободно-радикальные процессы в биологических системах» М., 1964, стр. 46.
35. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, Н. М. Эмануэль, ДАН, **151**, 584 (1963).
36. И. И. Сапежинский, см. ³⁴, стр. 45.
37. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, Н. М. Эмануэль, ДАН, **159**, 1378 (1964).
38. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, Е. Г. Донцова, Биофизика, **10**, 429 (1965).
39. И. И. Сапежинский, Ю. В. Силаев, ДАН, **162**, 691 (1965).
40. И. И. Сапежинский, Е. Г. Донцова, Радиобиология (в печати).
41. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, ДАН, **163**, 931 (1965).
42. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Сб. трудов конф. по химии перекисных соединений, Изд. «Наука», М., 1966.

Ин-т химической физики
АН СССР