

УДК 544.02
© 2017

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТРИТИЯ В МОЛЕКУЛАХ УГЛЕВОДОВ

А.О. Мариянац, И.А. Шестаков, О.С. Горшкова, А.Б. Сазонов
Россия, г. Москва, Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева

Исследовано распределение трития в клетках растения, выросшего в атмосфере тритийсодержащей воды, а также изотопное равновесие трития между водой и углеводами, являющимися распространенными составляющими биополимеров. Описаны механизмы концентрирования трития в растворе при сушке, определены значения констант изотопного равновесия. Показано, что тритий накапливается в органическом веществе клетки с константой равновесия, равной $\sim 1,5$. Это говорит о том, что данный радиоактивный изотоп водорода оказывает большее воздействие на клеточные структуры, чем следует из модели его равномерного распределения внутри живой клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ТРИТИЙ, РАСТВОРЫ, УГЛЕВОДЫ, ГЛЮКОЗА, ФРУКТОЗА, САХАРОЗА, РИБОЗА, ДЕЗОКСИРИБОЗА, КОНСТАНТА РАВНОВЕСИЯ, РЕАКЦИИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА

Тритий поступает в окружающую среду из многих источников. Основным источником природного трития является атмосфера, где он образуется в результате взаимодействия протонов и нейтронов космического излучения с водородом, кислородом, аргоном и азотом. Около 99 % общего количества природного трития превращается в тритиевую воду (НТО) и участвует в нормальном земном круговороте воды. Тритий широко используется в промышленности и научных исследованиях, является одним из радионуклидов, образующихся в ядерном топливном цикле. Техногенный тритий поступает в окружающую среду, в основном, во время проведения ядерных испытаний и на различных этапах ядерного топливного цикла. Нарождающаяся термоядерная энергетика в будущем может стать основным источником поступления трития в окружающую среду. Подсчитано, что в гипотетическом термоядерном реакторе трития будет образовываться в 10^4 – 10^5 раз больше, чем на АЭС такой же электрической мощности.

Поскольку β -частицы малой энергии трития не распространяются на большие расстояния, то тритий не представляет внешней

радиационной опасности. Что касается внутреннего облучения, то тритий в составе воды относительно быстро выводится из организма, и однократное попадание небольшого количества тритиевой воды в организм не представляет серьезной угрозы. Однако способность трития встраиваться в биомолекулы (в том числе ДНК) может привести к увеличению периода его выведения из организма и, соответственно, к возрастанию риска отдаленных последствий облучения, в том числе канцерогенного риска.

Свойство трития замещать водород в биологически важных молекулах в сочетании с малым пробегом испускаемых им β -частиц создает проблему при оценке локальных доз на уровне клеточных структур, так как в большинстве случаев константы изотопного равновесия трития между водой и органическими веществами, входящими в состав клетки, неизвестны или определены недостаточно точно. Так, например, в работе [1] измеренные коэффициенты разделения в системах, содержащих воду и различные моно- и полисахариды, лежат в интервале от 1,1 (крахмал) до 6,2 (агартин). Подобная разница полученных значений сомнительна с точки зрения строения молекул

углеводов, в которых весь водород, способный к изотопному обмену, входит в состав близких по своему окружению гидроксильных групп.

В связи с этим целью настоящей работы стало изучение равновесного распределения трития между водой и углеводами, присутствующими (индивидуально или в виде фрагментов макромолекул) в живых клетках. Для достижения поставленной цели мы исследовали распределение трития между водой и органическим веществом в тканях растения, выросшего в атмосфере НТО, определив при этом соотношение необменоспособного и лабильного трития. С учетом этих данных мы определили коэффициент распределения лабильного трития между водой и органическим веществом в тканях растения, а также экспериментально доказали эффект концентрирования трития в молекулах углеводов, являющихся одним из основных составляющих клеток растения.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование распределения трития между свободной водой и органическим веществом растительных клеток

Ростки толстянки яйцевидной (*Crassula Ovata*) были высажены в стеклянном боксе объёмом 27 л в грунт, состоящий из слоев керамзита (дренаж), активированного угля (для предотвращения загнивания) и грунта для комнатных растений. Высаженные ростки были однократно политы тритийсодержащим дистиллятом с удельной активностью $\sim 2 \cdot 10^4$ Бк/мл, после чего бокс был герметично закрыт. Толстянка росла при естественном освещении около трёх месяцев. За это время каждый росток дал несколько новых листьев. Эти листья были сорваны и механически измельчены. Полученную биомассу расфасовывали по 1,0 г в открытые виалы, которые помещали в эксикатор, заполненный водоотнимающим агентом (CaCl_2). Эксикатор термостатировали при 5 °C. По мере сушки образцов их извлекали из эксикатора и анализировали на содержание трития в соответствии со следующей методикой.

Образец переносили в стеклянную колбу и доводили его массу до 1,0 г добавлением дистиллированной воды. После этого в колбу

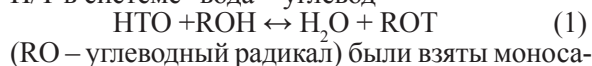
добавляли смесь концентрированных серной и азотной кислот. К колбе присоединяли обратный холодильник и нагревали ее до появления бурой окраски раствора. Выделяющиеся при этом пары H_2O и NO_2 конденсировались, и конденсат возвращался в колбу. Неконденсирующиеся низшие оксиды азота сбрасывались в вытяжную вентиляцию. К полученной в результате этих операций жидкости добавляли раствор NaOH до $\text{pH}=7$. Нейтральный раствор подвергали однократной дистилляции.

Пробу финального дистиллята массой 1 г смешивали в полиэтиленовой виале с 5 мл жидкого сцинтиллятора Optiphase "Hisafe" 3 (*Perkin Elmer*) и измеряли её активность на спектрометре 300 SL (*Hidex*). Статистическая погрешность измерения, связанная с радиоактивным распадом, составляла $<1\%$ для всех образцов. Для перехода к абсолютной активности использовался метод отношения тройных и двойных совпадений [2]. При этом эффективность регистрации мало менялась при переходе от образца к образцу, составляя около $35 \pm 2\%$.

Для определения доли необменоспособного органически связанного трития (ОСТ) навески биомассы (2 г), высушенной до полной потери свободной тканевой воды, помещали в колбу и приливали к ним 35 мл 40%-ного раствора этанола. Колбы нагревали до 45, 60, 75 или 90 °C, поддерживая установленную температуру в течение нескольких часов. Через 10, 20, 30 и далее каждые 30 мин в полиэтиленовую виалу отбирали пробу раствора (~ 1 мл), измеряли ее массу, приливали жидкий сцинтиллятор и определяли активность. Эффективность регистрации составляла около 33 %, относительная погрешность измерения – 4–5 %. По окончании эксперимента биомассу отделяли от раствора этанола, сушили, окисляли и анализировали на содержание трития согласно вышеописанной методике.

Определение констант изотопного равновесия в системе "вода-углевод"

Для экспериментального определения констант изотопного равновесия реакции обмена Н/Т в системе "вода – углевод"



хари́ды, распространенные в тканях растений: глюкоза (остатки которой являются структурной единицей целлюлозы, наиболее распространенного растительного биополимера), рибоза и дезоксирибоза (структурные фрагменты молекул РНК и ДНК, соответственно), фруктоза (структурный фрагмент сахарозы, встречается в природе в свободном виде), а также сахароза (широко распространенный в природе дисахарид).

В растворы индивидуальных углеводов добавлялось известное количество тритийсодержащей дистиллированной воды. Концентрация углеводов в полученных растворах составила порядка 10, 20 и 40 % общей массы, удельная активность – около 1 кБк/мл. Радиоактивные растворы разливали в полиэтиленовые виалы, измеряли их массу и затем помещали в эксикатор, заполненный CaCl_2 . С интервалом ~1 сут виалы извлекали, измеряли потерю массы, компенсировали потерянную массу добавлением такой же массы дистиллированной воды, не содержащей трития, добавляли жидкий сцинтиллятор и проводили измерение активности на спектрометре 300 SL. Эффективность регистрации, определяемая методом отношения тройных и двойных совпадений, составила для дезоксирибозы – около 32 %, для остальных углеводов – 39–43 %. Проведение эксперимента с раствором дезоксирибозы с концентрацией более 20 % оказалось невозможным из-за быстрого окрашивания сцинтиллятора в оранжевый цвет и связанного с этим сильного оптического гашения сцинтилляций. Отметим, что в опытах с растворами дезоксирибозы с концентрацией 10 % и 20 % окраска появлялась не сразу, а лишь через несколько часов после смешивания, в растворах рибозы – через несколько суток, а в растворах глюкозы, фруктозы и сахарозы не появлялась вовсе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для представления и дальнейшей обработки полученных данных использовалась система координат "относительная потеря массы δm – относительная потеря активности δA ":

$$\delta m = \frac{m_0 - m}{m_0}, \quad (2)$$

$$\delta A = \frac{A_0 - A}{A_0}, \quad (3)$$

где m_0 и m – массы образца до и после сушки; A_0 и A – соответствующие активности. Результаты для препаратов листьев *Crassula Ovata* представлены на рис. 1.

Первоначально полученные данные (величины A_0) были скорректированы на величину активности необменоспособного ОСТ. Для этого использовались результаты эксперимента по выходу трития из высушенных листьев *Crassula Ovata* в раствор этанола при различной температуре. Из кинетических кривых (рис. 2) видно, что уже за первые 30–60 мин большая часть трития вне зависимости от температуры выходит из сухого препарата в раствор. В дальнейшем концентрация трития в растворе практически не меняется, и можно говорить о том, что весь тритий, оставшийся в органическом веществе, является необменоспособным. Сравнивая среднюю активность сухого остатка, полученного после опытов по извлечению трития раствором этанола, с образцом, из которого не извлекали обменоспособный ОСТ, мы получили, что необменоспособный тритий составляет около 70 % от всего ОСТ в препарате растения. Это практически совпадает с результатом работы [3], несмотря на различие в метаболизме исследуемых растений (ячмень, кукуруза) и условиях роста (гидропоника). В свою очередь, доля ОСТ

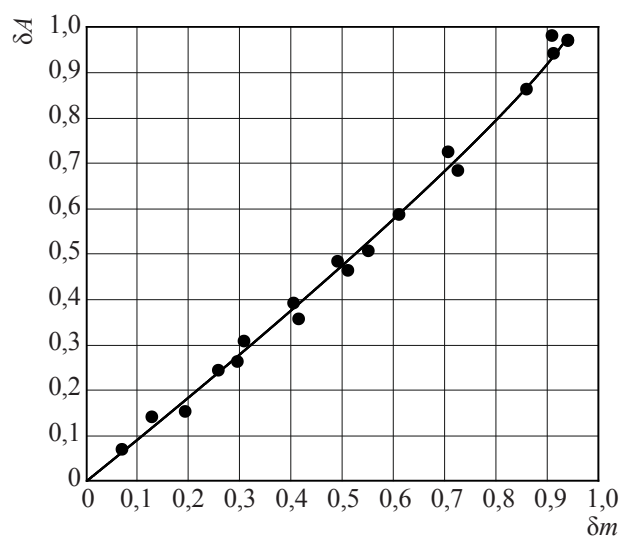


Рис. 1. Зависимость относительной потери активности препаратов листьев *Crassula Ovata* от относительной потери массы

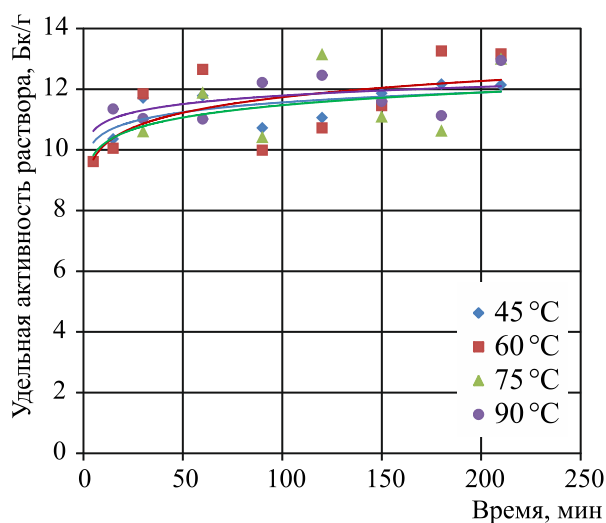


Рис. 2. Кинетические кривые выхода трития из высушенных листьев *Crassula Ovata* в раствор этанола

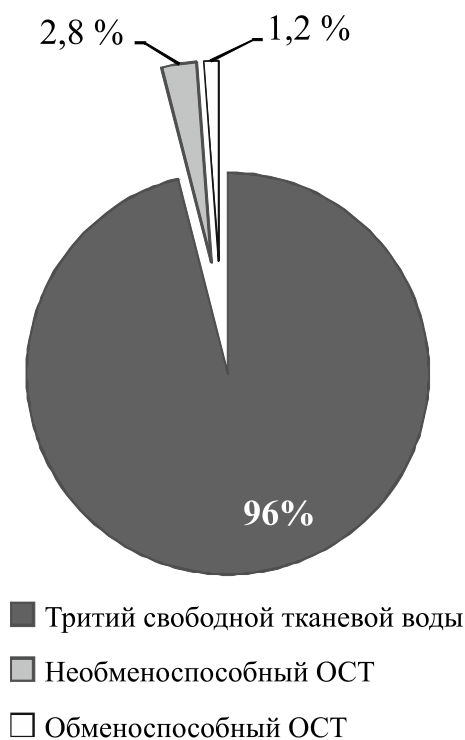


Рис. 3. Распределение трития в препарате листьев *Crassula Ovata*, выросшей в атмосфере НТО

в общем количестве трития в листьях *Crassula Ovata* составляет около 4 %. Полученное распределение трития по различным формам представлено на рис. 3.

Регрессионный анализ представленных на рис. 1 данных показывает, что даже с учётом погрешности анализа экспериментальные точки не укладываются на прямую, выходящую из начала координат. Это свидетельствует о том, что в ходе сушки образцов изменяется удельная активность испаряющейся воды. В проведенных нами "холостых" опытах было найдено, что при испарении тритийсодержащей воды в эксикаторе с высушивающим агентом CaCl_2 наблюдается фракционирование изотопов водорода. Остаток неиспарившейся воды при малых потерях массы обогащен тритием, в результате чего соответствующая кривая потерь активности в координатах $\delta m - \delta A$ заметно вогнута по направлению к оси абсцисс. Объяснением этому является изотопный эффект при переходе молекул воды из жидкости в пар. Как известно [4], скорость испарения молекул с поверхности жидкости при заданной температуре пропорциональна давлению насыщенного пара P и обратно пропорциональна квадратному корню из массы M молекулы. Тогда, считая разреженный водяной пар идеальным газом, а раствор НТО в воде – идеальным раствором (и то и другое оправдано), получим, что отношение скоростей испарения $\text{H}_2\text{O}/\text{НТО}$ (коэффициент разделения при фазовом изотопном обмене) равно

$$\alpha_{\Phi} = \frac{P_{\text{H}_2\text{O}}}{P_{\text{НТО}}} \cdot \sqrt{\frac{M_{\text{НТО}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}}} \quad (4)$$

Первый множитель в этом выражении хорошо известен – это равновесный коэффициент разделения изотопов при фазовом обмене α_0 (например, при ректификации воды). При 293 К он составляет около 1,1 [5]. Тогда, подставляя в (4) значения молекулярных масс, получаем, что коэффициент разделения изотопов при испарении воды в вакуум $\alpha_{\Phi} = 1,16$. В реальных условиях, таким образом, α_{Φ} может принимать значения от 1,1 (при равновесии "жидкость – пар") до 1,16 (в отсутствие обратного потока молекул из пара в жидкость).

Таким образом, испарение влаги из образца, содержащего растворенное вещество (а также взвешенные или коллоидные частицы),

всегда будет сопровождаться фракционированием изотопов водорода за счёт фазового изотопного обмена. Другой причиной изменения удельной активности испаряющейся воды может быть изменение относительного содержания свободной и связанной воды при изменении концентрации раствора (при условии, что при переходе от свободной воды к связанной наблюдается равновесный изотопный эффект).

В растворах углеводов в общем случае может присутствовать как свободная вода, так и связанная одной водородной связью с молекулой углевода. Кроме того, при высоких концентрациях становится существенной доля мостиковой воды, связанной водородными связями с двумя молекулами углевода. В связи с этим для дальнейшей интерпретации полученных данных будем рассматривать все три формы воды.

Уравнение, выражающее материальный баланс трития в растворе, теряющем воду, с учетом равновесного распределения трития будет выглядеть следующим образом:

$$A_0 - A' = m_1 a_1 \sum_i \alpha_i \varphi_i + m_2 a_1 K_{21}, \quad (5)$$

где A' – потерянная при сушке активность;

m_1 – масса воды (текущая);

a_1 – удельная активность свободной воды;

α_i – коэффициент распределения трития между свободной и i -ой формой воды ($\alpha_1 \equiv 1$);

φ_i – доля соответствующей формы;

m_2 – масса органического вещества (постоянная);

K_{21} – коэффициент распределения трития между свободной водой и органическим веществом.

В то же время динамика потерь активности описывается следующим дифференциальным уравнением

$$\frac{dA'}{dm_1} = -\frac{a_1}{\alpha_\phi} \sum_i \alpha_i \varphi_i. \quad (6)$$

Комбинируя эти два уравнения и переходя к выбранной системе координат $\delta m - \delta A$, получим

$$\frac{d\delta A}{d\delta m} = \frac{(1 - \delta A) \sum_i \alpha_i \varphi_i}{\alpha_\phi (1 - \delta m) \left[(1 - x_m) \sum_i \alpha_i \varphi_i + x_m K_{21} \right]}, \quad (7)$$

где x_m – массовая доля органического вещества, связанная с относительной по-

терей массы соотношением

$$x_m = \frac{x_0}{1 - \delta m}, \quad (8)$$

где x_0 – массовая доля органического вещества в растворе начального состава.

В самом первом приближении, выражающем только статистический закон, доля однократно связанной воды φ_2 пропорциональна произведению мольных долей органического вещества (x) и воды ($1 - x$), а доля свободной (φ_1) и мостиковой (φ_3) воды – квадрату мольных долей воды и органического вещества, соответственно:

$$\varphi_1(x) = (1 - x)^2, \quad (9)$$

$$\varphi_2(x) = 2x(1 - x), \quad (10)$$

$$\varphi_3(x) = x^2. \quad (11)$$

Связь между массовой и мольной долей органического вещества

$$x = \frac{\mu x_m}{1 + x_m(\mu - 1)}, \quad (12)$$

где μ – отношение молярных масс воды и органического вещества.

Квадратичная зависимость доли связанной воды в растворах углеводов (глюкозы, фруктозы, сахарозы) от их мольной доли подтверждается результатами работы [6], однако точного количественного совпадения не наблюдается. По этой причине при подстановке формулы (12) в формулы (9)–(11) в общем случае следует рассматривать величину μ как независимый параметр (далее – μ').

Аналитическое интегрирование уравнения (7) осложняется зависимостью величин φ_i от концентрации раствора. Тем не менее, численное интегрирование дает возможность в каждом конкретном случае осуществить подбор параметров, описывающих распределение трития между различными формами обменоспособного водорода в рассматриваемой системе.

Учитывая, что молекула воды содержит два, а молекула органического вещества – N атомов водорода, способных к изотопному обмену, можно найти константу равновесия реакции (1) изотопного обмена,

$$K = \frac{2 \cdot K_{21}}{N \cdot \mu}, \quad (13)$$

Обработка данных экспериментов с растворами индивидуальных углеводов осуществлялась путем подбора параметров α_2 , α_3 , α_ϕ ,

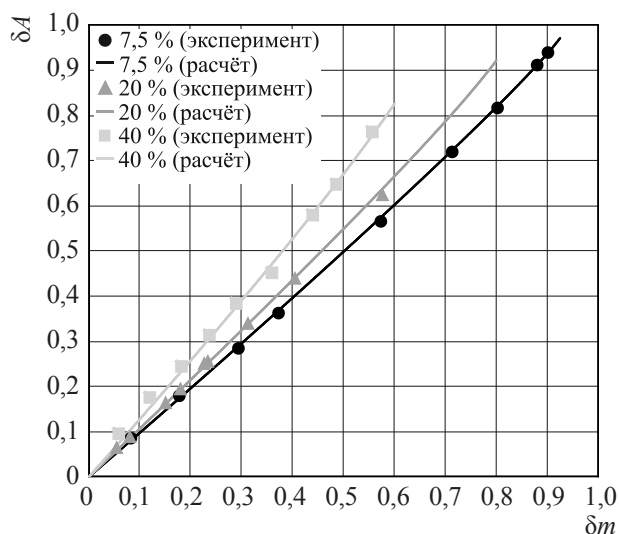


Рис. 4. Зависимость относительной потери активности раствором глюкозы от относительной потери массы

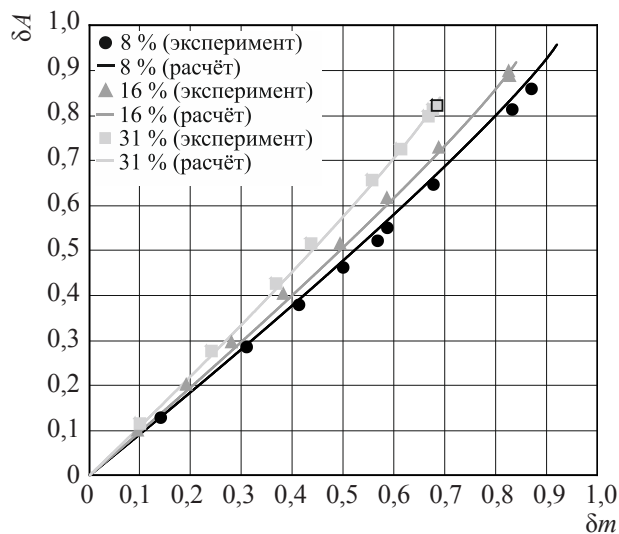


Рис. 5. Зависимость относительной потери активности растворами фруктозы от относительной потери массы

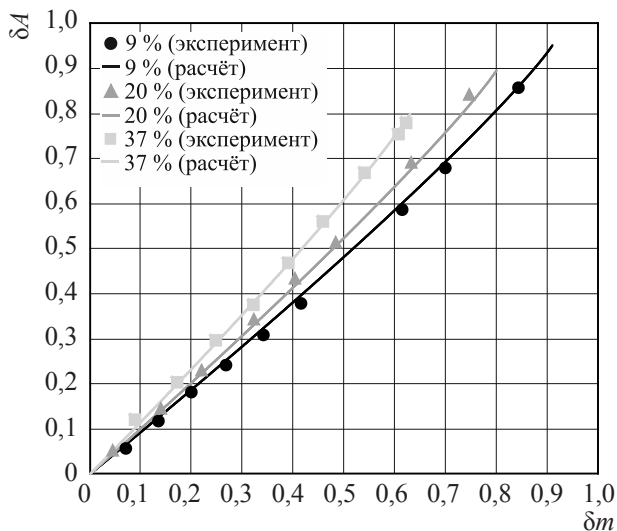


Рис. 6. Зависимость относительной потери активности растворами сахарозы от относительной потери массы

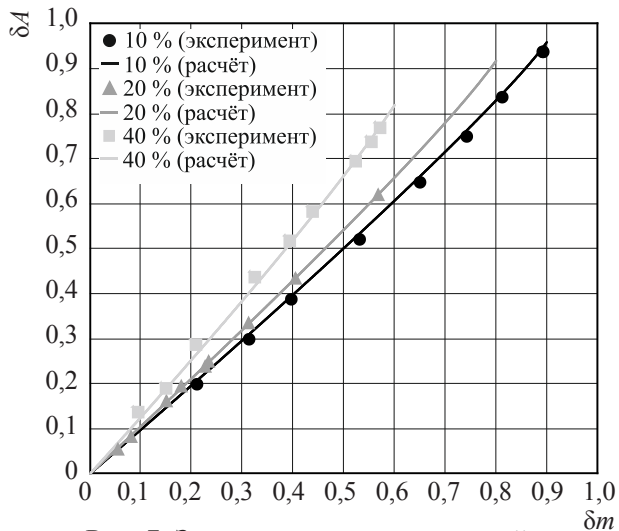


Рис. 7. Зависимость относительной потери активности растворами рибозы от относительной потери массы

K_{21} и μ' , минимизирующих среднеквадратичное отклонение σ рассчитанных значений $\delta A(\delta m)$ от экспериментальных результатов. Полученные расчётные зависимости представлены на рис. 4–8 сплошными линиями. Можно видеть, что все они достаточно хорошо описывают экспериментальные данные (точки).

Результаты определения констант равновесия реакций изотопного обмена, а также других параметров уравнения (7) представлены в таблице.

Можно видеть, что значения константы K – величины одного порядка для всех исследованных углеводов, что и ожидалось с самого

Таблица

Константы равновесия реакции изотопного обмена трития между водой и углеводами (293 К) и величины среднеквадратичного отклонения теории от эксперимента

	M	N	μ'	α_2	α_3	K_{21}	α_Φ	K	$\sigma, \%$
Глюкоза	180	5	0,29	1,5	1,5	0,37	1,08	1,48	0,9
Фруктоза	180	5	0,35	1,3	1,3	0,38	1,15	1,52	1,4
Сахароза	342	8	0,06	1,3	1,3	0,36	1,15	1,71	1,1
Рибоза	150	4	0,25	1,5	1,5	0,37	1,10	1,54	1,0
Дезоксирибоза	134	3	0,25	1,5	1,5	0,36	1,10	1,79	2,0

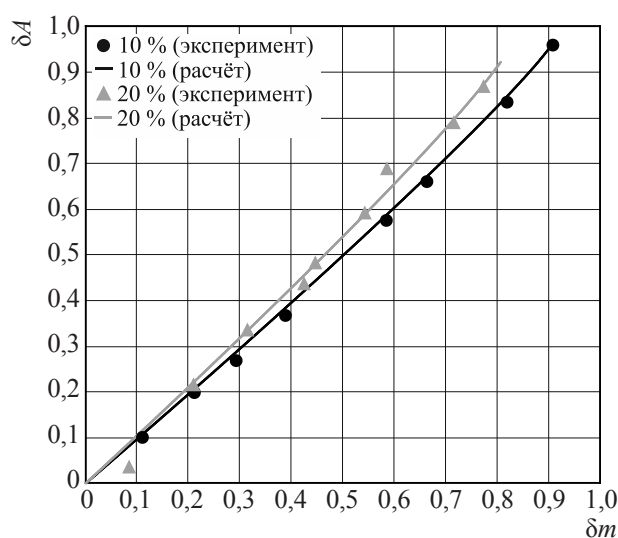


Рис. 8. Зависимость относительной потери активности растворами дезоксирибозы от относительной потери массы

начала. Кроме того, величины коэффициентов распределения между свободной и связанными формами воды также весьма близки: как между собой, так и к значениям K . Таким образом, гидратная оболочка молекул углеводов, как и сами углеводы, заметно концентрирует тритий.

Вернёмся к препаратам листьев *Crassula Ovata*. Если принять, что большая часть сухого вещества в них представлена полимерами глюкозы (целлюлоза и др.), то, согласно (13), при $N=3$ и $\mu=18/162$ получаем константу равновесия реакции изотопного обмена равную 1,5. Значения остальных параметров: $\alpha_2=\alpha_3=1,5$, $\alpha_\Phi=1,15$, $\mu'=0,25$; величина среднеквадратично-

го отклонения σ составляет 2,2 %. Таким образом, равновесие, как и в растворах углеводов, в данном случае смещено в сторону накопления трития в органическом веществе.

Очевидно, что растворы сахаров имеют весьма близкие свойства по отношению к тритию. Это значит, что тритий может и должен концентрироваться в углеводах растительной клетки, в частности в глюкозе, фруктозе и построенных из них олиго- и полимерных молекул, (в частности, сахарозе). Кроме того, концентрирование трития должно иметь место в молекулах, где такие углеводы, как рибоза или дезоксирибоза, выступают в качестве фрагмента (РНК, ДНК). Таким образом, учитывая химический состав, строение и размеры клеточных структур, можно ожидать большего воздействия излучения трития на органеллы, чем следует из модели его равномерного распределения внутри живой клетки.

ВЫВОДЫ

На примере ряда моно- и дисахаридов экспериментально показано, что термодинамический изотопный эффект направлен в сторону концентрирования трития в гидроксильных группах этих углеводов. Рассчитанные константы равновесия обмена тритием между водой и углеводами лежат в пределах 1,48–1,79. Экспериментально подтвержден факт концентрирования трития в органическом веществе растительных клеток в процессе их роста. Исследование распределения трития в клетках листьев *Crassula Ovata*, выросших в атмосфере НТО, показывает, что доля органически связанного трития составляет около 4 % от обще-

го его количества в клетках растения. Около $\frac{3}{4}$ такого трития занимает позиции, недоступные для изотопного обмена с водой. Сравнение результатов, полученных на растворах индивидуальных углеводов и на биологическом материале, указывает на способность трития концентрироваться в целлюлозе, а также в молекулах других биополимеров, содержащих углеводные фрагменты (ДНК, РНК, некоторые белки). В связи с эффектом концентрирования в углеводных фрагментах хроматин клеточного ядра получает большую дозовую нагрузку, чем следует из модели равномерного распределения трития. Недооценка этого эффекта может быть существенной при оценке рисков отдаленных последствий облучения β -частицами трития для человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wierczinski B., Müllen G., Rosenhauer S. Tritium enrichment from aqueous solutions using cryosublimation of mono-and polysaccharides // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. – 2008. – V. 277. – №. 1. – P. 19–23.
2. Сапожников Ю.А., Алиев Р.А., Калмыков С.Н. Радиоактивность окружающей среды. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006.
3. Baumgärtner F., Donhaerl W. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2004. – V. 379. – No. 2. – P. 204–209.
4. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика Т. 5. Статистическая физика. Ч. 1. – М.: Наука, 1976.
5. Van Hook W.A. Vapor Pressures of the Isotopic Waters and Ices // *J. Phys. Chem.* – 1968. – V. 72. – No. 2. – P. 1234.
6. Giangiacomo R. Study of water–sugar interactions at increasing sugar concentration by NIR spectroscopy // *Food Chemistry*. – 2006. – V. 96. – No. 3. – P. 371–379.

1. Wierczinski B., Müllen G., Rosenhauer S.