

УДК 541.127

## РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В СВОБОДНЫХ РАДИКАЛАХ. СПИНОВЫЕ pH-ЗОНДЫ

*Хра мцов В. В., В а йнер Л. М.*

Обобщены кинетические и термодинамические закономерности процессов переноса протона с участием короткоживущих и стабильных радикалов. Продемонстрированы широкие возможности использования pH-чувствительных нитроксильных радикалов для измерения кислотности в микрогетерогенных химических и биологических системах, включая клеточные.

Библиография — 102 ссылки.

### Оглавление

I. Введение	1440
II. Теоретическое рассмотрение реакций переноса протона в радикалах	1441
III. Протонный обмен в короткоживущих радикалах	1442
IV. Протонный обмен в стабильных нитроксильных радикалах	1444
V. Использование нитроксильных радикалов в качестве pH-зондов	1461

### I. ВВЕДЕНИЕ

Перенос протона — одна из самых распространенных реакций в органической химии [1, 2]. Актуальность изучения реакции протонного переноса обусловлена ее важной ролью в кислотном и щелочном катализе [2, 3], технологических и биологических процессах [4]. Физико-химиков привлекает также простота этих реакций, протекающих без взаимодействия электронных оболочек реагентов, что позволяет проводить моделирование данных реакций методами теоретической химии, и способствует более глубокому пониманию природы и кинетики элементарного акта в конденсированных средах [1, 2, 5]. Большая величина водородного изотопного эффекта является побудительной причиной для проведения многочисленных исследований таких эффектов в реакциях переноса протона. Эти исследования служат серьезной проверкой теории изотопных эффектов и дают существенную информацию о механизме рассматриваемых процессов [5, 6]. Вследствие уникальных свойств протона (отсутствие электронной оболочки, аномальная подвижность) реакции переноса протона являются наиболее быстрыми из реакций, протекающих в растворе; это предопределяет методические сложности при изучении кинетических параметров данной реакции. Для изучения кинетики переноса протона чаще всего применяют релаксационные методы (методы скачка температуры, давления, импульса электрического поля и т. д.), а также метод ЯМР (исследование уширения линий  $^1\text{H}$ ,  $^{17}\text{O}$  в спектрах ЯМР) [1]. Релаксационные методы основаны на наблюдении кинетики возвращения системы в положение равновесия (оптическими или электрическими методами) после быстрого изменения внешних параметров; их применение ограничено областью обратимых реакций переноса протона. Метод ЯМР свободен от указанного ограничения, так как его применение основано на анализе формы спектра участвующей в реакции молекулы. Однако при его использовании необходимы большие концентрации реагентов, а в случае сложных неразрешенных спектров ЯМР возникает проблема интерпретации экспериментальных данных. Наибольший интерес представляют методы, позволяющие непосредственно следить за состоянием реагирующих частиц в процессе протонного обмена (из указанных таким является метод ЯМР). Очевидно, что разработка новых методических подходов, позволяющих получать количественную информацию о кинетических и термодинамических характеристиках реакций протонного обмена, является весьма актуальной задачей. Перспективным представляется использование метода

ЭПР, который обладает высокой чувствительностью, позволяет непосредственно наблюдать за парамагнитным реагентом реакции, и получать количественную информацию о кинетике протонного переноса. Можно ожидать, что применение метода ЭПР к реакциям переноса протона в стабильных радикалах позволило бы использовать данные реакции в качестве модельных для получения количественной информации о влиянии стерического фактора, растворителя, электронодонорных и акцепторных заместителей на кинетические и равновесные параметры протонного переноса. При протекании обратимой реакции переноса протона в радикалах может наблюдаться влияние рН на спектры ЭПР радикалов. В связи с этим появляется возможность измерения рН методом ЭПР.

Измерение рН является одной из наиболее важных задач химии и биологии, так как от этой величины зависит протекание огромного количества химических реакций и многих процессов жизнедеятельности клеток и клеточных органелл. Традиционно для этого применяют электрометрический метод с использованием стеклянных электродов [7]. Основным недостатком данного метода является значительный размер стеклянных электродов и невозможность их введения в замкнутые структуры (клеточные органеллы, мембранные модельные везикулы и т. д.). Указанное ограничение, несмотря на развитие в последнее время микроэлектродной рН-метрии [8], в большинстве случаев не позволяет использовать стеклянные электроды для измерения локальных значений рН (внутри указанных структур, на поверхности раздела фаз и т. д.). В связи с этим в настоящее время в биологических системах широко используют флуоресцентные зонды и метод ЯМР, основываясь на влиянии рН среды на определенные характеристики спектров этих зондов (интенсивность флуоресценции, химический сдвиг) [9—16]. Применение флуоресцентных зондов ограничено сложностями в интерпретации интенсивности флуоресценции, чувствительной к взаимодействию зонда с липидной мембраной, к виду используемого буфера, к ионной силе раствора и т. д. Существенным ограничением метода ЯМР является его низкая чувствительность. В связи с этим представляется перспективным использование стабильных нитроксильных радикалов (НР) в качестве рН-зондов. Это определяется высокой чувствительностью метода ЭПР и большими успехами органической химии НР [17, 18]. Обнаруженное в последнее время [19—21] значительное влияние рН на спектры ЭПР стабильных НР позволяет по-новому взглянуть на перспективы их использования для исследования механизмов реакций переноса протона и в качестве рН-зондов.

В настоящем обзоре рассмотрены результаты исследования влияния рН на спектры ЭПР короткоживущих и стабильных радикалов различных типов. Особенно подробно рассмотрен перенос протона в радикалах типа имидазолина и имидазолидина, поскольку именно эти радикалы позволяют получить информацию о механизме протонного переноса и являются наиболее перспективными для использования в качестве рН-зондов в различных системах, включая биологические [22].

## II. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ РАССМОТРЕНИЕ РЕАКЦИЙ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В РАДИКАЛАХ

Обратимая реакция переноса протона (протонный обмен) между сопряженными основанием (радикал  $\dot{R}$ ) и кислотой ( $BH^+$ ) описывается уравнением:



Необходимым условием применения метода ЭПР для наблюдения за ходом реакции (1) является различие магнитно-резонансных параметров радикала в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$ . В этом случае реакция (1) должна приводить к частотному обмену между соответствующими компонентами спектров ЭПР радикалов в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$ . Форма линии сигнала ЭПР

$G(X)$  в случае частотного обмена по двум положениям, соответствующим  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$ -формам радикала, описывается уравнением [23]:

$$G(X) = I_m \left\{ iG_0 \frac{\tau_{RH^+} + \tau_R + \tau_{RH^+}\tau_R(p_{RH^+}\alpha_R + p_R\alpha_{RH^+})}{(1 + \alpha_R\tau_R)(1 + \alpha_{RH^+}\tau_{RH^+}) - 1} \right\} \quad (2)$$

где  $G_0$  — постоянный коэффициент.

$\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  — времена жизни радикала в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  соответственно;  $p_R = \tau_R/(\tau_R + \tau_{RH^+})$ ,  $p_{RH^+} = \tau_{RH^+}/(\tau_R + \tau_{RH^+})$ ,  $\alpha_R = (1/T_2)_R - i\gamma X$ ,  $\alpha_{RH^+} = (1/T_2)_{RH^+} - i\gamma(X + \Delta\omega/\gamma)$ ;  $\Delta\omega$  — разность частот соответствующих линий в спектрах ЭПР радикалов в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$ ;  $(T_2)_R$ ,  $(T_2)_{RH^+}$  — времена поперечной релаксации радикалов  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  соответственно;  $\gamma$  — гироманнитное отношение электрона. Переменная  $X$  связана с «постоянным» магнитным полем  $H_0$  соотношением  $X = H_0 - H_0^R$ , где  $H_0^R$  — напряженность поля, соответствующая центру сигнала ЭПР радикала в форме  $\dot{R}$ .

В соответствии с уравнением (2) экспериментально реализуются различные случаи обмена: быстрый ( $1/\tau_R$ ,  $1/\tau_{RH^+} \gg \Delta\omega$ ), медленный ( $1/\tau_R$ ,  $1/\tau_{RH^+} \ll \Delta\omega$ ) или промежуточный ( $1/\tau_R$ ,  $1/\tau_{RH^+} \sim \Delta\omega$ ) в масштабе времени ЭПР. Независимо от частоты обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  по спектрам ЭПР, согласно (2), можно определить отношение  $\tau_R/\tau_{RH^+}$ . В то же время анализ уравнения (2) показывает, что определение времен жизни  $\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  возможно лишь в случае промежуточного обмена [23]. При наличии хорошо разрешенных линий в спектрах ЭПР выражение (2) значительно упрощается и для нахождения величин  $\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  достаточно знать положения и ширины линий [23]. Зная отношение  $\tau_R/\tau_{RH^+}$  можно определить константу равновесия  $K$ :

$$K = k_f/k_r = \frac{[BH^+][\dot{R}]}{[B][\dot{R}H^+]} = \frac{\tau_R}{\tau_{RH^+}} \frac{[BH^+]}{[B]} \quad (3)$$

В случае, когда реакция (1) описывает обмен с протоном растворителя ( $BH^+ \equiv H_{sol}^+$ , т. е. сольватированный протон, уравнение (3) связывает константу равновесия  $K$  с концентрацией протонов  $[H^+]$  ( $K = \frac{\tau_R}{\tau_{RH^+}} [H^+]$ ),

что открывает принципиальную возможность использования радикалов в качестве pH-зондов.

Величины  $\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  определяют кинетические параметры реакции (1), а именно константы скоростей  $k_f$  и  $k_r$ :

$$k_f = \frac{1}{\tau_R} [BH^+], \quad k_r = \frac{1}{\tau_{RH^+}} [B] \quad (4)$$

Таким образом, в указанных случаях анализ формы сигнала ЭПР позволяет получить количественную информацию о термодинамике и кинетике протонного обмена в радикалах.

В случае необратимых реакций переноса протона в радикалах, различие магнитно-резонансных параметров форм  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  позволяет регистрировать методом ЭПР непосредственно накопление (исчезновение) одной из форм радикала. Характерные времена, доступные изучению методом ЭПР, ограничены временем «запуска» реакций (например, в методе остановленной струи время смешения реагентов  $\geq 10^{-3}$  с).

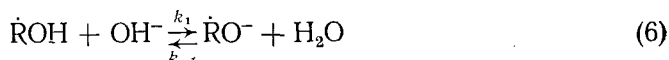
### III. ПРОТОННЫЙ ОБМЕН В КОРОТКОЖИВУЩИХ РАДИКАЛАХ

Авторы [24—26] обнаружили изменения спектров ЭПР ряда спиртовых радикалов ( $\dot{R}OH$ ) в кислой среде. Эти изменения проявляются в обратимом слиянии линий дублета, обусловленного сверхтонким взаимодействием (СТВ) с гидроксильным протоном, в синглет, вследствие протекания протонного обмена:

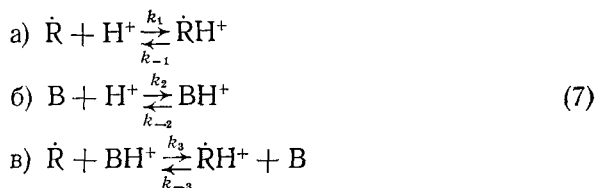


Реакция (5) приводит к изменению проекции ядерного спина гидроксильного протона радикала  $\dot{\text{R}}\text{OH}$  и, таким образом, к частотному обмену между линиями дублета, обусловленного СТВ с данным протоном. Анализ положения и ширины линий в спектрах ЭПР радикалов  $\dot{\text{R}}\text{OH}$  позволил определить константу скорости протонного обмена  $k_1$ , которая лежит в диапазоне  $6,5 \cdot 10^6 - 1,8 \cdot 10^8$  л/моль·с. Была также найдена температурная зависимость константы скорости реакции протонирования гидроксиметильного радикала  $k_1$ , которая характеризуется энергией активации  $\Delta E = 2,8$  ккал/моль [26].

Если в работах [24—26] влияние pH на спектры ЭПР было следствием протонирования OH-группы гидроксиалкильных радикалов в кислой среде, то в [27—29] такое влияние было обусловлено процессом депротонирования OH-группы, согласно реакции:



Различие спектров ЭПР форм  $\dot{\text{R}}\text{OH}$  и  $\dot{\text{R}}\text{O}^-$  позволило определить значения  $pK$  изученных радикалов, а в двух случаях, когда наблюдался промежуточный обмен, и значения констант скоростей: для радикала  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$   $pK = 11,51$  и  $k_1 = 7 \cdot 10^9$  л/моль·с, а для  $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{OH}$   $pK = 12,03$  и  $k_1 = 9 \cdot 10^9$  л/моль·с [27—29]. Следует отметить, что в случае медленного и промежуточного обмена спектры ЭПР изученных радикалов [28] имели весьма сложный вид при  $pH \sim pK$ . Поэтому в раствор радикала добавляли 1М ортофосфорную кислоту с  $pK = 12,32$ . При этом скорость протонного обмена увеличивается [30, 31], что приводит к упрощению спектра ЭПР. Суть предложенного подхода легко понять, рассмотрев все реакции протонного обмена с участием радикала и добавленного буфера В [30]:



Значения  $pK_1$ ,  $pK_2$  и  $pK_3$  связаны соотношением [31]:

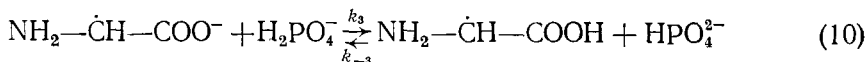
$$pK_3 = pK_1 - pK_2 \quad (8)$$

Добавление в систему буфера приводит к изменению лишь кинетических параметров обмена  $\dot{\text{R}} \rightleftharpoons \dot{\text{R}}\text{H}^+ (\tau_R, \tau_{\text{RH}^+})$ , в то время как равновесие этой реакции  $(\tau_R/\tau_{\text{RH}^+})$  не нарушается:

$$\begin{aligned} \text{а) } 1/\tau_R &= k_3[\text{ВH}^+] = k_3\text{В}_0/(1 + 10^{pH-pK_2}) \\ \text{б) } 1/\tau_{\text{RH}^+} &= k_{-3}[\text{В}] = k_{-3}\text{В}_0/(1 + 10^{pK_2-pH}) \\ \text{в) } \tau_{\text{RH}^+}/\tau_R &= [\text{RH}^+]/[\text{R}] = 10^{pK_1-pH} \end{aligned} \quad (9)$$

где  $\text{В}_0 = [\text{В}] + [\text{ВH}^+]$  — концентрация буфера; при этом подразумевается, что  $k_3[\text{ВH}^+] \gg k_1[\text{H}^+]$ ;  $k_{-3}[\text{В}] \gg k_{-1}$ . Согласно (9), наиболее эффективное ускорение обмена (уменьшение  $\tau_{\text{RH}^+}$  и  $\tau_R$ ) наблюдается при условии  $pK_1 \approx pK_2$ .

В работе [31] изучена реакция протонного обмена между двумя формами радикала глицина:



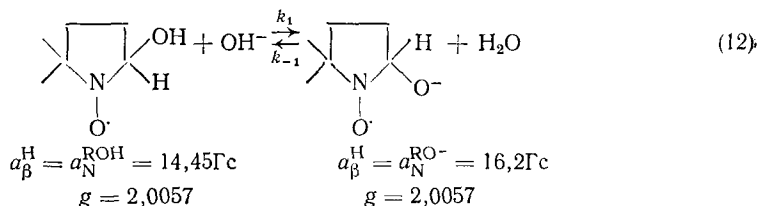
В отсутствие буфера протонный обмен по реакции (7а) приводит к медленному обмену между соответствующими линиями спектра ЭПР радикала глицина. Добавление фосфатного буфера ( $pK_2 = 6,4$ ) позволило перейти в область промежуточного обмена и рассчитать константы скоростей протонного обмена (10):  $k_3 = (2,5 \pm 0,5) \cdot 10^9$  л/моль·с,  $k_{-3} = (1,4 \pm 0,5) \cdot 10^9$  л/моль·с. В 0,5 М фосфатном буфере реализовался слу-

чай быстрого обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  и из зависимостей констант СТВ:  $a_N^{CH}(pH)$  и  $a_N(pH)$  было рассчитано значение  $pK_1 = 6,65$  карбоксильной группы в радикале глицина. При анализе зависимостей  $a(pH)$  пользовались формулой (11), легко получаемой для случая быстрого обмена из (2) и (9в):

$$a(pH) = a_R \cdot p_R + a_{RH^+} \cdot p_{RH^+} = (a_R + a_{RH^+} \cdot 10^{pK_1 - pH}) / (1 + 10^{pK_1 - pH}) \quad (11)$$

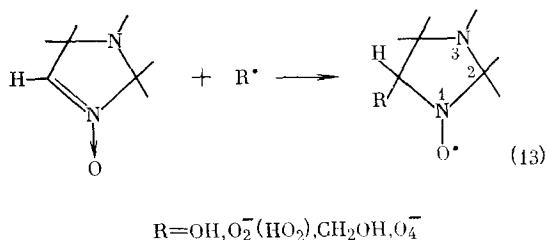
где  $a_R$ ,  $a_{RH^+}$  — константы СТВ радикалов в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  соответственно.

Интересный случай проявления депротонирования OH-группы наблюдался [32] в гидроксинитроксильном радикале:



Протонированная (ROH) и депротонированная (RO<sup>-</sup>) формы радикала отличались константами СТВ. В области  $pH \sim pK$  наблюдался быстрый обмен  $\dot{R}OH \rightleftharpoons \dot{R}O^-$  зависимость  $a_N = a_\beta^H(pH)$  описывалась формулой (11).

В работе [33] обнаружено влияние pH на спектры ЭПР ряда спиновых аддуктов, образующихся в реакции



Изменение спектров ЭПР, образующихся по реакции (13) в диапазоне pH 2—5 короткоживущих НР авторы этой работы объяснили протонированием атома азота N(3). Ряд работ [34—38] посвящен изучению методом ЭПР реакций протонного обмена в семихиноновых, семидиноновых и других короткоживущих радикалах.

Таким образом, проявления протонного обмена в спектрах ЭПР короткоживущих радикалов достаточно хорошо изучены. Анализ этих спектров позволяет измерять как константы равновесия реакций протонного обмена, так и бимолекулярные константы протонирования. В ряде работ отмечается, что значения  $pK$  радикалов значительно меньше  $pK$  соответствующих диамагнитных молекул [27—32], что связывают с электроноакцепторным влиянием радикального центра. Константы протонирования лежат в диапазоне  $5 \cdot 10^6 - 10^{10}$  л/моль · с [24—26, 28, 30, 31, 35—37].

Использование рассмотренных радикалов в качестве pH-зондов в общем случае не представляется возможным вследствие их нестабильности.

#### IV. ПРОТОННЫЙ ОБМЕН В СТАБИЛЬНЫХ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛАХ

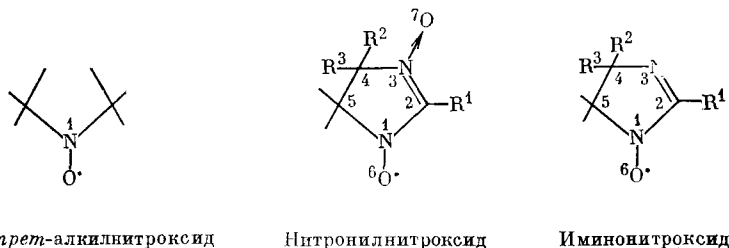
Как следует из предыдущего раздела, наличие способных протонироваться (депротонироваться) групп в структуре радикала в непосредственной близости от радикального центра приводит к различию спектров ЭПР протонированной ( $\dot{R}H^+$ ) и депротонированной ( $\dot{R}$ ) форм радикала. Однако одновременное выполнение двух требований — нахождения

функциональной группы вблизи радикального центра и стабильности радикалов — является непростой задачей. Поэтому проявление протонного обмена в спектрах ЭПР стабильных радикалов удалось зарегистрировать лишь в редких случаях.

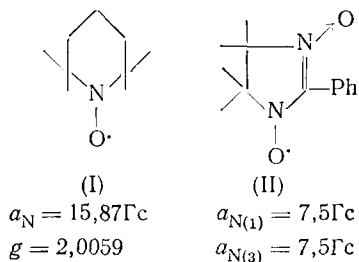
Наибольших изменений параметров спектров ЭПР НР следует ожидать при их протонировании по радикальному центру, на котором локализована основная часть спиновой плотности.

## 1. Протонирование нитроксильных радикалов по радикальному центру

Спиновая плотность в ди-*трет*-алкилнитроксильных радикалах локализована в основном на нитроксильном фрагменте ( $\rho_o^\pi \approx 0,6$ ;  $\rho_{N(1)}^\pi \approx 0,4$  [39]), в нитронилнитроксильных радикалах (ННР) — на двух нитроксильных группах ( $\rho_{N(1)}^\pi \approx \rho_{N(3)}^\pi \approx 0,22$ ;  $\rho_{O(6)}^\pi \approx \rho_{O(7)}^\pi \approx 0,21$  [39]), а в иминонитроксильных радикалах (ИНР) — на нитроксильном фрагменте и атоме азота иминной группы ( $\rho_{N(1)}^\pi \approx 0,38$ ;  $\rho_{O(6)}^\pi \approx 0,4$ ;  $\rho_{N(3)}^\pi \approx 0,16$  [40]):

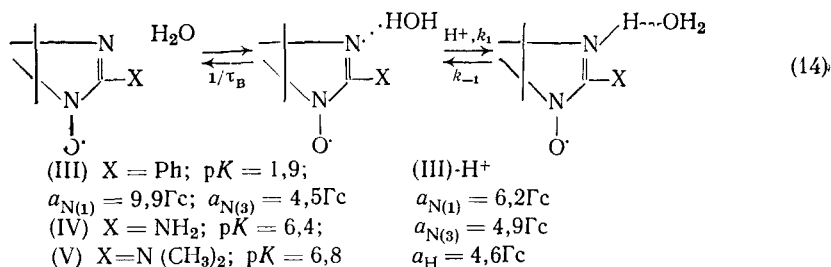


Протонирование фрагмента  $N-O^\bullet$  в НР осуществляется лишь в очень кислых средах [41–43]. Для радикала (I) такое протонирование в водном 80%-ном растворе серной кислоты приводит к увеличению константы  $a_N$  ( $\Delta a_N = 5,7$  Гс) и уменьшению  $g$ -фактора ( $\Delta g = 0,0013$ ) радикала, а также к появлению дополнительного дублетного расщепления  $a_{II} = 3,12$  Гс, обусловленного СТВ с присоединенным протоном [43]:



Для большинства НР протонирование по кислороду! фрагмента  $N-O^\bullet$  наблюдать не удается, так как в водных растворах этот процесс сопровождается диспропорционированием НР на соответствующие оксоаммониевый и гидроксаммониевый катионы [44]. Протонирование атома кислорода такого же фрагмента ННР в водных растворах не наблюдалось вследствие диспропорционирования данных радикалов в кислой среде [45]. Однако в бензоле в присутствии трифторуксусной кислоты удалось наблюдать спектр ЭПР протонированного по кислороду нитроксильной группы радикала (II); при этом происходило уменьшение констант СТВ с обоими атомами азота ( $\Delta a_N = 1,8$  Гс;  $\Delta a'_N = 2,8$  Гс) и появлялось дополнительное дублетное расщепление, обусловленное СТВ с присоединенным протоном ( $a_{II} = 4,7$  Гс) [45].

В отличие от ди-*трет*-алкилнитроксильных [41–43] и нитронилнитроксильных [45] радикалов для ИНР наблюдается протонирование по атому азота иминной группы  $N(3)$  [40, 46], которая является более основной, чем нитроксильная:



Значительная величина спиновой плотности в ИНР на атоме N(3) обуславливает большие изменения констант СТВ с атомом азота при его протонировании (уравнение (14)). Константа СТВ с присоединенным протоном  $a_{\text{H}}$  в протонированной форме радикала (III) при  $\text{pH} > 1$  не наблюдается вследствие быстрого (в масштабе времени ЭПР) обмена (по реакции (14)). Определение концентрации  $\text{H}^+$ , при которой в спектре ЭПР радикальной формы (III)- $\text{H}^+$  появляется дополнительное дублетное расщепление, обусловленное СТВ с присоединенным протоном, позво-

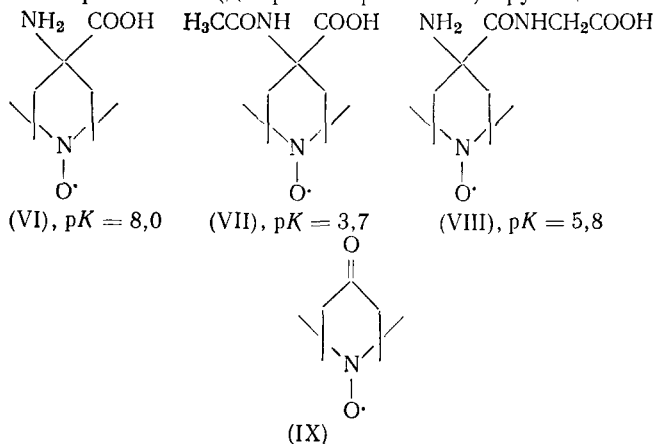
вило оценить время жизни водородной связи  $=\text{N}^{\cdot}\cdots\text{HOH}$  в радикале (III):  $\tau_B \approx 2 \cdot 10^{-10}$  с [46]. Условие быстрого обмена  $\dot{\text{R}} \rightleftharpoons \dot{\text{R}}\text{H}^+$  в радикале (III) позволяет определить нижнюю границу бимолекулярной константы протонирования:  $k_1 \gg 5 \cdot 10^7$  л/моль·с. Согласно другим данным [40], усреднение сигналов форм  $\dot{\text{R}}$  и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$  радикала (III) не полное и обмен оказывает измеримое воздействие на положение и ширину линий сигнала ЭПР; это позволило рассчитать константу скорости протонирования радикала (III):  $k_1 \approx 10^9$  л/моль·с. Получены также значения  $k_1$  для трех других ИНР, они лежат в диапазоне  $3 \cdot 10^6 \div 10^9$  л/моль·с [40].

Иминитроксильные радикалы могут образовывать равновесные комплексы в водных растворах не только с протоном, но и с рядом диамагнитных металлов (Hg(II), Zn(II), Cd(II), Ag(I) и др. [40, 47]). Комплексообразование с участием атома азота N(3) в ИНР и металла приводит как к регистрируемому методом ЭПР изменению констант СТВ  $a_{N(1)}$  и  $a_{N(3)}$ , так и к появлению СТВ с ядром металла (для Hg(II) константа СТВ  $a_{\text{Hg}} \approx 40$  Гс [40]).

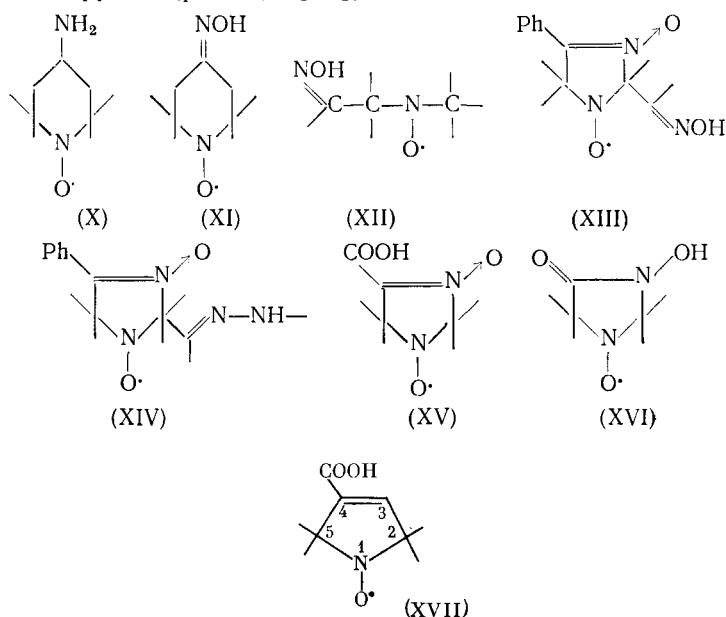
Из изученных в работах [40—43, 45, 46] радикалов только два (IV) и (V) могут быть использованы как pH-зонды в водных растворах в имеющем практический интерес диапазоне pH. Однако интерпретация спектров ЭПР радикалов (IV) и (V) при  $\text{pH} \sim \text{p}K$  весьма сложна, так как эти спектры образуются в результате взаимного наложения сигналов  $\dot{\text{R}}$ - и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$ -форм, в каждом из которых проявляется СТВ с тремя неэквивалентными атомами азота и протонами заместителя X [40].

## 2. Протонирование функциональных групп нитроксильных радикалов

В работе [48] обнаружено влияние pH на спектры ЭПР радикалов пиперидинового типа (VI)—(VIII), содержащих при углероде C(4) способные протонироваться (депротонироваться) функциональные группы.



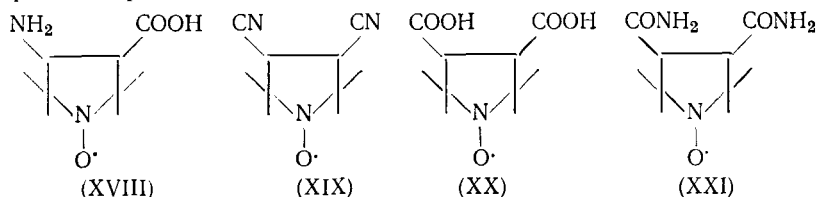
Для этих радикалов при уменьшении рН наблюдалось уменьшение константы СТВ  $a_N$  ( $\Delta a_N = 0,15-0,3$  Гс) и увеличение  $g$ -фактора ( $\Delta g \approx 0,0001$ ). В то же время спектр ЭПР радикала (IX), не имеющего при С(4) способной протонироваться группы, не менялся в диапазоне рН 2—12. Поэтому авторы [48] объяснили наблюдаемые изменения в спектрах ЭПР обратимым протонированием аминогруппы в радикалах (VI) и (VIII) и депротонированием карбоксильной группы в радикале (VII). Медленный обмен между  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -формами радикалов (VI)–(VIII) приводит к асимметрии спектров ЭПР, что наиболее сильно проявляется в уменьшении интенсивности высокопольной компоненты. Для определения  $pK$  радикала методом ЭПР предложено использовать зависимость от рН константы  $a_N$ , а также параметров, характеризующих асимметрию сигнала (отношение интенсивностей центральной и высокопольной компонент и др.). Зависимость  $a_N$  от рН может быть использована для определения  $pK$  и при отсутствии асимметрии сигнала, как в случае быстрого обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$ . О чувствительности к рН спектра ЭПР радикала (X) пиперидинового типа с  $NH_2$ -группой при С(4) сообщалось в работе [49]. Однако авторы [49] не интерпретировали наблюдаемое небольшое увеличение константы СТВ ( $\Delta a_N \approx 0,13$  Гс) в щелочной области рН 8–10,5, которое, по нашему мнению, обусловлено депротонированием  $NH_2$ -группы ( $pK = 9,5$  [50]).



Для другого радикала пиперидинового типа (XI) с группой  $=NOH$  при С(4) также было обнаружено увеличение  $a_N$  в щелочной среде ( $\Delta a_N = 0,16$  Гс) [51]. Наблюдаемое обратимое изменение  $a_N$  в области рН 10–12,8 объясняли обратимым депротонированием группы  $=NOH$ . Это подтверждается близкими значениями  $pK$ , найденными методом ЭПР из зависимости  $a_N$  от рН для трех радикалов различных типов с  $=NOH$ -группой [51]: радикала пиперидинового типа (XI) ( $pK = 11,35$ ;  $\Delta a_N = 0,16$  Гс), ациклического ди-*tert*-алкилнитроксильного радикала (XII) ( $pK = 11,55$ ;  $\Delta a_N = 0,34$  Гс) и радикала типа 3-имидазолин-3-оксида (XIII) ( $pK = 10,7$ ,  $\Delta a_N = 0,22$  Гс). Для радикалов (XIV) и (XV) типа 3-имидазолин-3-оксида с другими функциональными группами были найдены значительно меньшие значения  $pK$ , равные 1,6 и 1,9 для группы  $=N-NH$  в радикале (XIV) ( $\Delta a_N = 0,47$  Гс) и группы  $COOH$  в радикале (XV) ( $\Delta a_N = 0,15$  Гс) соответственно. Обнаружено также различие спектров ЭПР радикалов  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  имидазолидинового типа (XVI) — аналогов гидроксамовой кислоты ( $pK = 7,0$ ;  $\Delta a_N = 0,24$  Гс) — и пирроли-

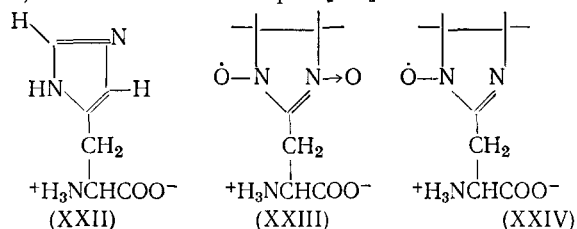


нового типа (XVII) с карбоксильной группой при С(4) ( $pK=3,5$ ;  $\Delta a_N = 0,31$  Гс) [51]. Недавно появилось сообщение [52] о влиянии рН на спектры ЭПР радикалов типа пирролидина (XVIII)–(XXI).



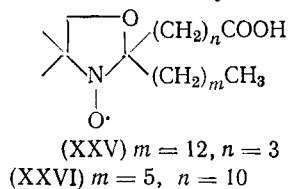
Спектры этих радикалов при рН=2 и рН=12 различались значениями констант СТВ ( $\Delta a_N = 0,3–0,5$  Гс). Однако в [52], в отличие от [48, 51], нет данных о зависимости параметров спектров ЭПР ( $a_N$ ,  $g$ -фактора) от рН, вследствие чего вопрос о значениях  $pK$  протонирующихся групп в радикалах (XVIII)–(XXI) остается открытым. Неясны также перспективы использования данных радикалов как рН-зондов. Отметим также, что различие спектров ЭПР  $\dot{R}$ - и  $RH^+$ -форм может быть обусловлено влиянием протонирования функциональных групп радикалов на его внутримолекулярные или межмолекулярные взаимодействия.

Обнаружены изменения спектров ЭПР ряда радикальных аналогов гистидина (XXII) в зависимости от рН [53].



Протонирование карбоксильной группы радикалов (XXIII) и (XXIV) приводило к изменению констант СТВ с неэквивалентными  $\beta$ -протонами метиленовой группы. Это объясняли наличием ион-дипольного взаимодействия между электрон-дефицитным нитронитроксильным (для радикала (XXIII)) или иминонитроксильным (для радикала (XXIV)) кольцами и анионом карбоксилата. Протонирование карбоксильной группы нарушает такое взаимодействие и приводит к сдвигу равновесия между конформациями, ответственными за неэквивалентность констант СТВ с метиленовыми протонами. Аналогичное ион-дипольное взаимодействие между кольцом имидазола и ионом карбоксилата в гистидине наблюдали методом ЯМР [53].

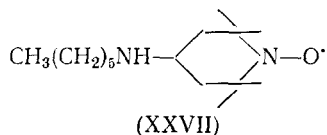
Величина рН влияет на спектры ЭПР спин-меченых жирных кислот (XXV) и (XXVI) в водно-лецитиновой суспензии [54].



Спектры радикалов (XXV) и (XXVI) имели характерный для иммобилизованных радикалов вид, при этом параметр порядка  $S$ , характеризующий степень заторможенности вращения НР [55], зависел от рН среды в диапазоне рН 4–7. Так как никакого влияния рН на спектры ЭПР метилового эфира радикала (XXVI) в тех же условиях не наблюдалось, рН-зависимые изменения спектров радикалов (XXV) и (XXVI) авторы [54] объяснили депротонированием карбоксильной группы. Поскольку карбоксильная группа значительно удалена от радикального фрагмента  $N-O\cdot$  радикалов (XXV) и (XXVI) (в (XXVI) они разделены цепочкой из 10 групп  $CH_2$ ), то наблюдаемые различия спектров ЭПР протонированной и депротонированной форм радикалов, по-видимому,

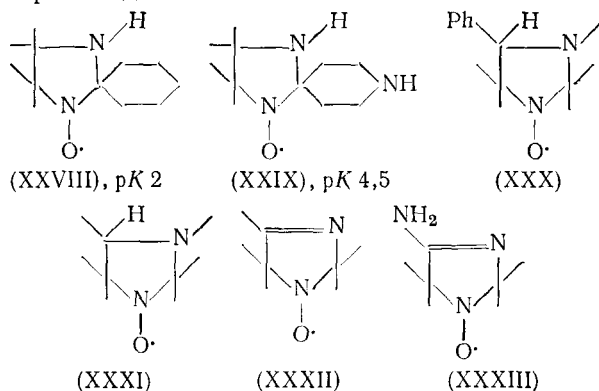
полностью обусловлены взаимодействиями данных форм с липидной фазой; это приводит к различию их вращательных характеристик, проявляющемуся в спектрах ЭПР.

В работе [56] изучено влияние рН на спектр ЭПР НР (XXVII) водной суспензии липидных везикул (липосом).



В такой среде радикал (XXVII) распределен между водной и липидной фазами, при этом в липидной фазе сигнал ЭПР значительно уширен вследствие иммобилизации. Коэффициент распределения радикала (XXVII) между водной и липидной фазами меняется  $\sim 10$  раз в диапазоне рН 3,5–11,5, что объясняют различием коэффициентов распределения для протонированной по третичному атому азота при углероде С(4) формы радикала (XXVII) и его непротонированной формы. Радикалы (XXV) и (XXVII) использовались [57, 58] для изучения трансмембранного транспорта протонов через модельные фосфолипидные мембраны. Различную проницаемость мембран для  $\dot{\text{R}}^-$  и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$ -форм радикала (X) применяли для определения  $\Delta\text{pH}$  на природных мембранах [50, 59, 60]. Поскольку чувствительность спектров ЭПР радикалов (XXV)–(XXVII) к рН наблюдается лишь при наличии в растворе липидной фазы, их использование для прямого измерения рН в общем случае не представляется возможным.

В 1982 г. независимо в работах [19–21] было обнаружено влияние рН на ЭПР-спектры НР имидазолинового и имидазолидинового типов. В [19] наблюдали быстрый протонный обмен между  $\dot{\text{R}}^-$  и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$ -формами радикалов (XXVIII) и (XXIX), отличающимися константами СТВ ( $\Delta a_N \simeq 1,2$  Гс). В работе [21] отмечены различные случаи протонного обмена (быстрый или медленный) для радикалов (XXX)–(XXXIII),  $\dot{\text{R}}^-$  и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$ -формы которых различались как константами СТВ ( $\Delta a_N = 0,8$ – $1,2$  Гс), так и  $g$ -факторами ( $\Delta g = 0,0002$ – $0,0003$ ). Вследствие таких значительных различий радикалы имидазолинового и имидазолидинового типов представляются наиболее перспективными для изучения механизма реакций протонного обмена методом ЭПР, а также для использования в качестве рН-зондов.



### 3. Протонный обмен в нитроксильных радикалах имидазолинового и имидазолидинового типов

#### а) Проявление протонирования атома N3 радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов в спектрах ЭПР

Влияние рН на спектры ЭПР одного из радикалов — производных имидазолидина (XXXI) — показано на рис. 1 [21]. В пределах рН 3,5–6 высокопольная компонента спектра ЭПР в  $X$ -диапазоне (рис. 1, а) рас-

Величины  $pK$ , найденные методом ЭПР, рассчитанные и экспериментальные константы СТВ  $a_N$  и  $g$ -факторы  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -форм некоторых радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов [21, 61, 63]

Радикал	$pK (\pm 0,1)$	$g$ -Фактор * ( $\pm 0,0001$ )		$a_N (\pm 0,05 \text{ Гс})$	
		$\dot{R}H^+$	$\dot{R}$	$\dot{R}H^+$	$\dot{R}$
(XXXI)	4,7	2,0057 2,0046**	2,0054 2,0044**	14,85 6,03**	16,10 7,29**
(XXXII)	1,3	2,0057 2,0047	2,0055 2,0037**	14,95 5,74** 10,22***	15,85 7,22** 11,22***
(XXXIII)	6,1	2,0057 2,0048	2,0054 2,0036	15,05 5,73**	15,80 7,26**
(XXXIV)	—	2,0057 2,0047**	—	14,80 5,78**	—
(XXXV)	0,8	2,0057 2,0046**	2,0054 2,0036**	15,00 5,79**	15,85 7,24**

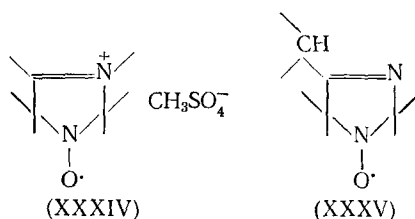
\* Экспериментальные значения  $g$ -факторов, определенные в [21, 61], сдвинуты относительно приведенных в таблице на постоянную величину  $\Delta g = 6 \cdot 10^{-4}$  вследствие систематической приборной ошибки.

\*\* Рассчитанные величины (без учета эффектов сольватации) [61].

\*\*\* Рассчитанные величины (с учетом эффектов сольватации) [64].

щепляется на две разрешенные компоненты, относительные интенсивности которых обратимо изменяются с  $pH$ . Такой вид спектра объясняется суперпозицией двух триплетных спектров ЭПР, отличающихся константами СТВ и  $g$ -факторами. Действительно, использование спектрометров с большей рабочей частотой позволило обнаружить дублетное расщепление спектра ЭПР радикала (XXXI) на двух (в  $Q$ -диапазоне) или на всех трех (2мм-диапазон) компонентах триплета (рис. 1). Доказано [21], что наблюдаемый эффект связан с протонированием атома азота  $N(3)$  в радикале (XXXI) и различием констант СТВ  $a_N$  и  $g$ -факторов для форм  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$ .

Данный вывод подтверждается, во-первых, близостью значений  $pK$  этого радикала, измеренных потенциометрически и методом ЭПР [61]. Для определения  $pK$  методом ЭПР была использована зависимость функции  $f = I_{RH^+} / (I_R + I_{RH^+})$  ( $I_{RH^+}$ ,  $I_R$  — интенсивности ЭПР-сигналов  $\dot{R}H^+$ - и  $\dot{R}$ -форм соответственно) от  $pH$  (рис. 2). Ранее данная функция была использована [62] для описания распределения радикала (I) между водной и липидной фазами.



Во-вторых, значения констант СТВ и  $g$ -фактора радикала (XXXI) в форме  $\dot{R}H^+$  близки соответствующим значениям для имидазолиновой соли (XXXIV) (табл. 1). В-третьих, не было обнаружено влияния  $pH$  на спектры ЭПР радикалов (I) и (XXXIV), у которых отсутствует способный протонироваться атом  $N(3)$ .

В табл. 1 для ряда радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов приведены значения  $pK$ , найденные методом ЭПР, значения констант СТВ и  $g$ -факторов.

Спектр ЭПР радикалов (XXXI) и (XXXIII) с  $pK > 3$  в области  $pH \sim \sim pK$  представляет собой суперпозицию спектров  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -форм ради-

кала, что обусловлено медленным обменом  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  [61]. В этом случае значения  $pK$  радикалов определяли с использованием зависимости  $f$  от  $pH$  (рис. 2). Следует отметить, что определенные таким образом значения  $pK$  радикалов в общем случае могут отличаться от истинных значений вследствие различной ширины высокопольной компоненты спектра  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -форм. Однако для изученных радикалов (табл. 1) эти различия невелики ( $\leq 5\%$ ) и могут привести к ошибке при измерении  $pK$  радикала не более 0,1. В  $X$ -диапазоне для определения  $pK$  радикала наряду с функцией  $f$  может быть использована зависимость от  $pH$  величины  $a_N$  (рис. 2), измеряемой как расстояние между 1-й и 2-й компонентами триплета, при этом  $a_N(pK) = (a_N^{\dot{R}H^+} + a_N^{\dot{R}})/2$  ( $a_N^{\dot{R}H^+}$ ,  $a_N^{\dot{R}}$  — константы СТВ в  $\dot{R}H^+$ - и  $\dot{R}$ -формах соответственно). Для радикалов (XXXII) и (XXXV) в области  $pH \sim pK$  не наблюдалось двух разрешенных сигналов на

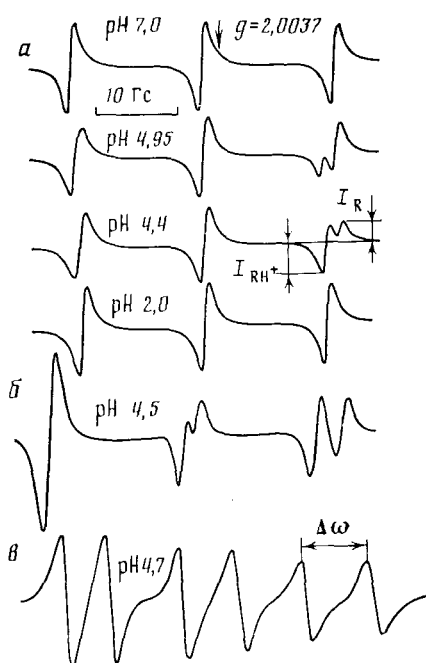


Рис. 1

Рис. 1. Спектры ЭПР водного раствора (концентрация  $5 \cdot 10^{-4}$  М) радикала (XXXI) при различных значениях  $pH$  в  $X$ -диапазоне (а),  $Q$ -диапазоне (б) и 2 мм-диапазоне (в) (температура  $23^\circ$ ) [21]

3-й компоненте спектра ЭПР. Изменение  $pH$  приводило к обратимому изменению параметров триплетного спектра ЭПР этих радикалов — константы СТВ и  $g$ -фактора, что объясняется быстрым протонным обменом  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$ . В этом случае  $pK$  радикала может быть вычислена по совпадению экспериментальной и рассчитанной, согласно уравнению (11), кривой, а также из условия  $a_N(pK) = (a_N^{\dot{R}H^+} + a_N^{\dot{R}})/2$ .

Как видно из табл. 1, при протонировании атома N(3) изменения  $g$ -фак-

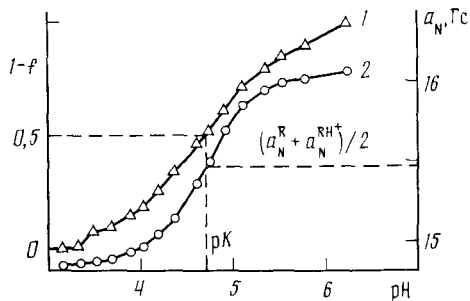


Рис. 2

Рис. 2. Зависимости от  $pH$  функции  $(1-f) = I_R/(I_R + I_{RH^+})$  (1) и константы СТВ  $a_N$  (2) для радикала (XXXI) [61]

тора составляют  $(2-3) \cdot 10^{-4}$ , а константы СТВ 0,8—1,2 Гс. Дополнительное доказательство возможности столь больших изменений параметров спектров ЭПР НР имидазолинового и имидазолидинового типов при протонировании атома N(3) было получено методами квантовой химии [61].

#### б) Квантовохимические расчеты констант СТВ и $g$ -факторов радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов в протонированной и непротонированной формах

В работе [61] проведены квантовохимические расчеты электронной структуры радикалов ограниченным и неограниченным методами Хартри-Фока в приближении INDO [65]. Молекулярные орбитали при расчете  $g$ -фактора ограниченным методом Хартри-Фока рассчитывали по

методу Стоуна [66]. Для радикалов (XXXII)–(XXXV) пользовались имеющимися экспериментальными данными о геометрии аналогичных имидазолиновых радикалов с N-оксидной связью [67]. При расчете электронной структуры радикала (XXXI) ему приписывали геометрию соответствующего оксипирролидина [68].

В табл. 1 сопоставляются теоретически рассчитанные и экспериментальные значения констант СТВ с атомом N(1) ( $a_N$ ) и  $g$ -факторов для названных радикалов [61].

Рассчитанные константы  $a_N$  заметно отличаются от экспериментальных, что связано с приближенностью используемого в расчете метода INDO [65]. Однако закономерности изменения констант СТВ при переходе от незаряженных к заряженным формам воспроизводятся вполне удовлетворительно. В этих радикалах спиновая плотность в основном локализована на  $\pi$ -орбитах N—O $\cdot$  ( $\rho_N^\pi \approx 0,31$ ;  $\rho_O^\pi \approx 0,67$ ). При протонировании атома N(3) под действием поля положительного заряда увеличивается расщепление уровней  $\pi$ -орбит атомов N и O, причем относительная электроотрицательность атомов кислорода уменьшается: это приводит к тому, что разрыхляющая орбита неспаренного электрона в большей степени локализуется на атоме кислорода и в меньшей степени на атоме азота ( $\rho_N^\pi = 0,26$ ,  $\rho_O^\pi = 0,72$ ). При этом сумма ( $\rho_N^\pi + \rho_O^\pi$ ) остается практически постоянной. Поскольку константа  $a_N$  связана с  $\pi$ -электронными спиновыми заселенностями соотношениями вида [65]  $a_N = Q_N^N \cdot \rho_N^\pi + Q_O^N \cdot \rho_O^\pi$ , где  $Q_N^N > 0$ , а  $Q_O^N < 0$ , то указанное перераспределение спиновой плотности при протонировании атома N(3) и приводит к уменьшению константы  $a_N$ .

Недавно [64] были рассчитаны значения  $a_N$  в R- и  $\dot{R}H^+$ -формах радикала (XXXII) с учетом сольватации в рамках сольватонной модели [69]. Как видно из табл. 1, учет сольватации обеспечивает лучшее согласие рассчитанных и экспериментальных значений  $a_N$ , при этом сохраняется различие величин  $a_N$  для двух форм радикала, равное 1 Гс.

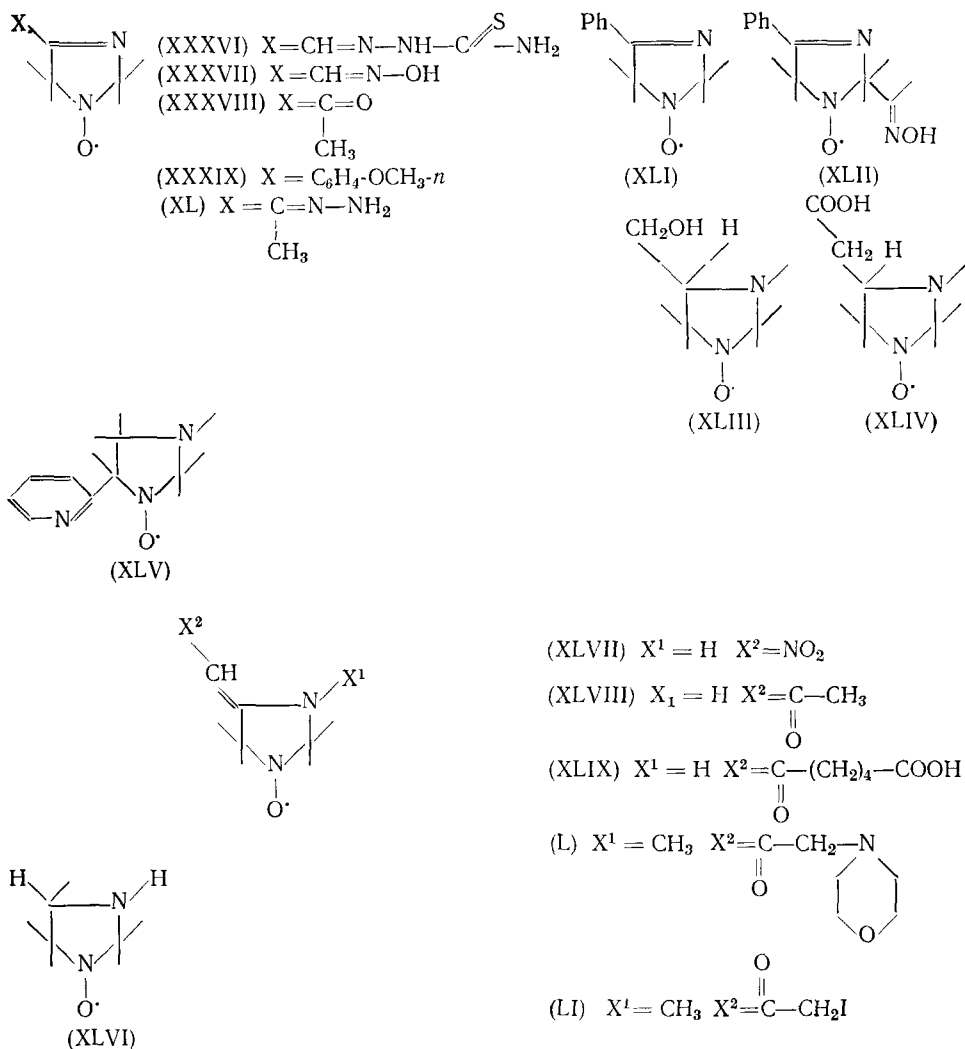
Из табл. 1 следует, что, в соответствии с экспериментом,  $g$ -факторы протонированных радикалов близки между собой и не отличаются от  $g$ -фактора имидазолиновой соли (XXXIV). Непротонированные радикалы также характеризуются близкими  $g$ -факторами (за исключением радикала (XXXI), геометрию которого оценивали предположительно [61]). Переход от непротонированных радикалов к протонированным сопровождается заметным увеличением  $g$ -фактора.

Как показывает анализ расчетных данных, такое увеличение обусловлено главным образом возрастанием компоненты  $g$ -тензора  $\Delta g_{zz} = 0,0034$ , соответствующей направлению связи N—O $\cdot$ . Основной вклад в нее ( $\Delta g_{zz}^0 = 0,0042$ ) вносит переход с молекулярной орбиты приблизительно соответствующей орбите неподеленной пары электрона кислорода  $n$  на орбиту неспаренного электрона  $\pi^+$ , примесь которого к основному состоянию обусловлена в основном спин-орбитальным взаимодействием на атоме кислорода.

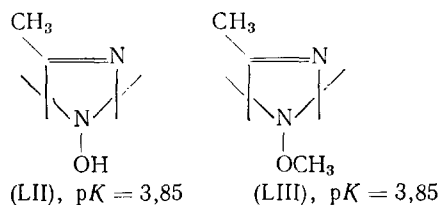
Проведенный анализ подтверждает, что эффекты протонирования атома N(3) могут вызвать изменения констант  $a_N$  и  $g$ -фактора, наблюдаемые на опыте, и тем самым служит еще одним подтверждением правильности отнесения спектров ЭПР в работе [61].

#### в) Константы равновесия протонного обмена в радикалах и их связь с характером частотного обмена в спектрах ЭПР

В работе [51] изучено влияние протонирования атома N(3) на спектры ЭПР большого ряда радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов. В табл. 2 приведены найденные методом ЭПР значения  $RK$ , константы СТВ и  $g$ -фактора для радикалов (XXXVI)–(LI) в протонированной и депротонированной формах, а также указан характер обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$ .



Протонирование атома N(3) в данных радикалах сопровождается значительными изменениями констант СТВ  $a_N$  ( $\Delta a_N = 0,8-1,3$  Гс) и  $g$ -фактора ( $\Delta g = (2-3) \cdot 10^{-4}$ ). Значения  $pK$  имидазолиновых радикалов находятся в области малых  $pH$  ( $pK < 3$ , исключение составляет радикал (XXXIII) с  $pK = 6,1$ ); они меньше  $pK$  имидазолидиновых радикалов ( $pK = 3,0-4,7$  для радикалов (XXX), (XXXI) и (XLIII)–(XLVI)). Меньшие величины  $pK$  радикалов по сравнению с  $pK$  соответствующих диамагнитных молекул имидазолинов и имидазолидинов [19, 51] объясняются электроноакцепторным влиянием нитроксильной группы. Действительно, для радикала (XXXII)  $pK = 1,9$ , что значительно меньше  $pK$  соответствующих диамагнитных аналогов (LII) и (LIII) [61].



Отметим также, что методом ЭПР были найдены значения  $pK = 11,15$  для  $=\text{NOH}$ -группы в радикале (XLII) (ср. с радикалом (XIII)) и  $pK = 2,0$  для  $\text{COOH}$ -группы в радикале (XLIV) (ср. с радикалом (XV)) [51]. Высокое значение  $pK = 7,8$ , найденное методом ЭПР для имидазолидинового радикала (XLVII), связано с его депротонированием в положе-

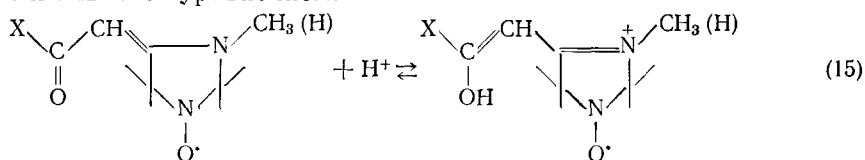
Величины  $pK$ ,  $a_N$  и  $g$ -факторов для форм  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  некоторых радикалов имидазолинового и имидазолидинового типов, а также характер частотного обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  [51, 63]

Радикал $pK (\pm 0,1)$	$g$ -Фактор $(\pm 0,0001)$		$a_N (\pm 0,02 \text{ Гс})$		Характер обмена *
	$\dot{R}H^+$	$\dot{R}$	$\dot{R}H^+$	$\dot{R}$	
(XXX) 3,0	2,0057**	2,0054**	14,85	16,20	м
(XXXVI) -0,2	2,0057	2,0055	14,80	15,66	б
(XXXVII) 0,1	2,0057	2,0055	14,85	15,64	б
(XXXVIII) 0,2	2,0057	2,0055	14,93	15,81	б
(XXXIX) 1,2	2,0057**	2,0054**	15,00	15,85	б
(XL) 2,5	2,0057	2,0055	15,03	15,77	п
(XLI) 0,6	2,0057	2,0055	14,95	15,65	б
(XLII) 1,0	2,0058	2,0057	14,69	15,13	б
(XLIII) 11,15	2,0057	2,0056	15,12	15,35	—
(XLIV) 3,85	2,0057	2,0055	14,89	15,96	м
(XLV) 2,0	2,0058	2,0058	14,60	14,76	—
(XLVI) 4,3	2,0058	2,0055	14,76	15,92	м
(XLVII) 4,5	2,0057	2,0055	14,72	15,89	м
(XLVIII) 4,35	2,0057	2,0055	15,02	16,18	м
(XLIX) 7,8	2,0056	2,0055	15,29	15,75	м
(L) 1,1	2,0057	2,0056	15,03	15,46	б
(LI) 13,25	2,0056	2,0055	15,47	15,98	б
(LII) 1,0	2,0057	2,0056	15,03	15,47	б
(LIII) 13,5	2,0056	2,0055	15,46	15,92	б
(LIV) -0,7	2,0058	2,0055	14,20	15,41	м
(LV) 0,2	2,0058	2,0055	14,40	15,57	м

\* б — быстрый, п — промежуточный, м — медленный (в масштабе времени ЭПР).

\*\* См. примечание \* к табл. 1.

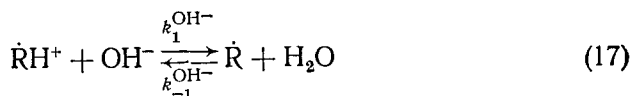
нии 3, депротонирование этого радикала доказано химическим путем [70]. Процесс депротонирования в положении 3 ответствен также за изменение ЭПР-спектров имидазолиновых радикалов (XLVIII) и (XLIX) в щелочной среде (табл. 2) [51]. Для радикалов (XLVIII) и (XLIX) обнаружено еще одно значение  $pK$  (табл. 2) в области малых величин  $pH$ , которое, как и в случае радикалов (L) и (LI) объясняли протонированием енаминкетонной группировки. Известно, что подавляющее большинство енаминкетонов протонируется по атому кислорода [71, 72]. Для радикалов (XLVIII)—(LI) протонирование по атому кислорода описывается уравнением:



где X — заместители. При этом положительный заряд в  $\dot{R}H^+$ -форме в основном локализован на атоме азота N(3), чем и объясняется близость значений  $\Delta a_N$  и  $\Delta g$  при протонировании радикалов (XLVIII)—(LI) и атома N(3) в радикалах имидазолидинового типа (табл. 2).

Обращает на себя внимание связь между характером обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  и величиной  $pK$  радикала: в случае радикалов с  $pK > 3$  (а также радикалов (XLVIII) и (XLIX) с  $pK = 13,25$  и  $13,5$  соответственно) наблюдается быстрый, а в случае радикалов с  $pK = 3-8$  — медленный обмен (табл. 2). Это нашли объяснение в работах [51, 61]. В водных растворах протонный обмен между  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -формами описывается двумя механизмами:





Условие медленного обмена требует, чтобы обратные времена жизни радикала в формах  $\dot{\text{R}}$  и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$  ( $1/\tau_{\text{R}}$  и  $1/\tau_{\text{RH}^+}$  соответственно) были значительно меньше разности частот сигналов ЭПР этих форм  $\Delta\omega$ :

$$1/\tau_{\text{R}}, 1/\tau_{\text{RH}^+} \ll \Delta\omega \quad (18)$$

Для механизма (16), который является основным в кислой среде:

$$1/\tau_{\text{RH}^+} = k_{-1}^{\text{H}^+} = k_1^{\text{H}^+} K_a = k_1^{\text{H}^+} \cdot 10^{-\text{pK}} \quad (19)$$

$$1/\tau_{\text{R}} = k_1^{\text{H}^+} [\text{H}^+] = k_1^{\text{H}^+} \cdot 10^{-\text{pH}}$$

где  $K_a = k_{-1}^{\text{H}^+}/k_1^{\text{H}^+}$  — константа равновесия реакции (16) (по определению  $K_a = 10^{-\text{pK}}$ ). Для механизма (17), который является основным в щелочной среде,

$$1/\tau_{\text{RH}^+} = k_1^{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] = k_1^{\text{OH}^-} \cdot 10^{\text{pH}-14} \quad (20)$$

$$1/\tau_{\text{R}} = k_1^{\text{OH}^-} \cdot 10^{\text{pK}-14}$$

Подставляя равенства (19) и (20) в (18), получим условие медленного обмена:

$$\lg(k_1^{\text{H}^+}/\Delta\omega) < \text{pK}, \text{pH} < 14 - \lg(k_1^{\text{OH}^-}/\Delta\omega) \quad (21)$$

Для диффузионно-контролируемых реакций протонного обмена  $k_1^{\text{H}^+} \approx \approx k_1^{\text{OH}^-} \approx 10^{10}$  л/моль·с [1],  $\Delta\omega \sim 10^7$  с<sup>-1</sup> при протонировании атома N(3) (см. рис. 2). Подставляя значения  $k_1^{\text{H}^+}$ ,  $k_1^{\text{OH}^-}$  и  $\Delta\omega$  в (21), получим условие медленного частотного обмена в спектрах ЭПР для диффузионно-контролируемых реакций протонного обмена [61]:

$$3 < \text{pK} < 11 \quad (22)$$

Это условие хорошо соответствует имеющимся в литературе экспериментальным данным. Действительно, для радикалов (III) [46], (XXVIII) [19], (XXXII), (XXXV)—(XXXIX), (XLI), (XLII) [51] с  $\text{pK} < 3$ , гидроксинитроксильного радикала ( $\text{pK} = 12,96$ ) [32], ряда спиртовых радикалов [28] и радикалов (XLVIII), (XLIX) [51] с  $\text{pK} > 11$  наблюдался быстрый частотный обмен  $\dot{\text{R}} \rightleftharpoons \dot{\text{R}}\text{H}^+$ . Для радикалов (VI)—(VIII) [48], (XXX), (XXXI), (XXXIII) [62], (XLIII), (XLIV), (XLV) (XLVII) [51] с  $3 < \text{pK} < 11$  наблюдался медленный обмен. Наконец в случае радикала (XL) [51] ( $\text{pK} = 2,5$ ) и радикалов  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$  ( $\text{pK} = 11,51$ ) и  $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{OH}$  ( $\text{pK} = 12,03$ ) [28] характер обмена является промежуточным. В то же время быстрый частотный обмен  $\dot{\text{R}} \rightleftharpoons \dot{\text{R}}\text{H}^+$  в спектрах ЭПР (XXIX) ( $\text{pK} = 4,5$ ) [19] и медленный обмен в спектрах ЭПР радикалов (L) ( $\text{pK} = -0,7$ ) и (LI) ( $\text{pK} = 0,2$ ) [51] противоречит условию (22). Чтобы объяснить эти факты, согласно условию (21), необходимо предположить значение  $k_1^{\text{H}^+} \gg 10^{10}$  л/моль·с для радикала (XXIX) (т. е.  $k_1^{\text{H}^+} \approx 10^{11}$  л/моль·с) и  $k_1^{\text{H}^+} \ll 10^{10}$  л/моль·с (на 3—4 порядка или более) для радикалов (L) и (LI). Значительное уменьшение бимолекулярной константы протонирования  $k_1^{\text{H}^+}$  по сравнению с соответствующим значением для диффузионно-контролируемых реакций отмечалось в литературе, например для СН-кислот [1]. Как отмечалось выше, группировка енаминокетонов в радикалах (L) и (LI), по-видимому, протонируется по атому кислорода, согласно уравнению (15). Происходящее при этом перераспределение электронной плотности может приводить к значительному увеличению энергии активации химической реакции и соответственно к уменьшению  $k_1^{\text{H}^+}$ . Возможно также, что уменьшение константы  $k_1^{\text{H}^+}$  для радикалов (L) и (LI) объясняется стерическими затруднениями [51].



# г) Кинетические характеристики реакций

Значительное различие параметров спектров ЭПР форм  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  имидазолиновых и имидазолидиновых радикалов (табл. 1, 2) позволило нам [73, 74] предложить новый подход к изучению кинетики реакций протонного обмена методом ЭПР. В случае промежуточного частотного обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  определению методом ЭПР доступны все параметры, характеризующие кинетику реакции протонного обмена: константы скорости, энергии активации, а также величины кинетического изотопного эффекта [61, 73, 74].

Согласно (22), промежуточный обмен должен наблюдаться для радикалов с  $pK \sim 3$  и  $pK \sim 11$ ; из изученных радикалов (табл. 1, 2) такому условию удовлетворяют радикалы (XXX) с  $pK=3,0$  и (XL) с  $pK=2,5$ . Действительно, при  $pH \sim pK$  высокопольная компонента радикала (XL) уширена за счет обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  [74]. В случае радикала (XXX) при повышении температуры также наблюдаются спектральные изменения, характерные для перехода от медленного обмена к промежуточному [61]. Для радикала (XXXI) с  $pK=4,7$  в соответствии с условием (22) подобных спектральных изменений с повышением температуры не отмечено.

Для определения время жизни  $\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  и соответственно констант скорости протонного обмена  $k_1^{H^+}$  и  $k_{-1}^{H^+}$  было проведено машинное моделирование высокопольной компоненты спектров ЭПР радикалов (XXX) и (XL) [61, 74]. При расчете спектров использовали уравнение (2), описывающее форму линии сигнала ЭПР в случае частотного обмена по двум положениям; неразрешенную суперсверхтонкую структуру учитывали двумя способами: а) путем непосредственного учета СТВ с метильными протонами, вклад которого в неоднородное уширение сигнала ЭПР являлся определяющим [61] и б) представляя форму спектральной линии в виде композиции функции, рассчитанной согласно формуле (2), и гауссовой функции распределения [73, 74] (основанием для этого является незначительное отличие ( $\leq 5\%$ ) ширины гауссовых распределений в  $\dot{R}$ - и  $\dot{R}H^+$ -формах изученных радикалов, см. также [75]).

Бимолекулярные константы протонирования радикала (XL)  $k_1^{H^+}$  в изученном диапазоне температур (274–300 K) значительно больше, чем радикала (XXX) ( $k_1^{H^+} \approx 5 \cdot 10^8$  л/моль·с при 21°), они составляют  $3 \cdot 10^9$ – $10^{10}$  л/моль·с (см. рис. 3); при этом зависимость  $\tau_R$  и  $\tau_{RH^+}$  от температуры может быть описана линейной функцией в координатах Аррениуса и, согласно (19),

$$\begin{aligned} k_1^{H^+} &= 1,6 \cdot 10^{14} \exp(-5800/RT), \text{ л/моль} \cdot \text{с}; \\ k_{-1}^{H^+} &= 1,0 \cdot 10^{14} \exp(-8900/RT), \text{ с}^{-1} \end{aligned} \quad (23)$$

Большая энергия активации протонирования радикала  $\Delta E = (5,8 \pm 0,4)$  ккал/моль может указывать на недиффузионный контроль реакции.

Представляет интерес возможность получения количественной информации об изотопных эффектах в реакциях протонного обмена с использованием pH-чувствительных НР. В работе [74] обнаружено различие спектров ЭПР радикала (XL) в  $H_2O$  и  $D_2O$  (рис. 3). Поэтому в  $D_2O$  температурная зависимость времен жизни радикала в формах  $\dot{R}$  и  $\dot{R}D^+$  также может быть описана линейной функцией в координатах Аррениуса, скорости прямой и обратной реакций обмена можно записать в виде

$$\begin{aligned} k_1^{D^+} &= 9,9 \cdot 10^{13} \exp(-6100/RT), \text{ л/моль} \cdot \text{с}; \\ k_{-1}^{D^+} &= 9,7 \cdot 10^{13} \exp(-10\,000/RT), \text{ с}^{-1} \end{aligned} \quad (24)$$

Сравнение (23) и (24) показывает, что для данной реакции наблюда-

ются как термодинамический (разные константы равновесия), так и кинетический (разные константы скорости) изотопные эффекты. Термодинамический изотопный эффект  $\Delta_r K = pK^{\text{D}_2\text{O}}/pK^{\text{H}_2\text{O}} = 0,4$  (при  $T = 294$  К). Это согласуется с тем фактом, что для большинства ионизирующихся групп значения  $pK$  в случае ионизации путем потери дейтрона в  $\text{D}_2\text{O}$  примерно на 0,4—0,6 единиц больше значений  $pK$  при ионизации тех же групп путем потери протона в  $\text{H}_2\text{O}$  [76]. Величина кинетического изотопного эффекта является обычной для реакций такого типа (при  $T = 294$  К  $k_1^{\text{H}^+}/k_1^{\text{D}^+} = 2,7 \pm 0,2$ ;  $k_{-1}^{\text{H}^+}/k_{-1}^{\text{D}^+} = 6,9 \pm 0,4$ ) и для ее объяснения не требуется обращения к эффектам туннелирования [5, 6]. Такой вывод подтверждается хорошим выполнением аррениусовой зависимости для  $k_1$  (рис. 3). Отметим, что в случае радикала (XXX), в котором взаимодействие атома N(3) с протоном дополнительно затруднено наличием объемной  $\text{CH}_3$ -группы, аррениусова зависимость для  $k_1$  не выполняется [61], при этом константа скорости  $k_1$  на порядок меньше, чем для радикала (XL) (табл. 3). Конечно, определение вклада туннелирования на основании температурной зависимости константы  $k_1$  требует измерения  $k_1$  в более широком диапазоне температур. К сожалению, частоты протонного обмена можно измерять методом ЭПР лишь в том случае, когда они близки к разности зеемановских частот протонированной и непротонированной форм радикала, что ограничивает температурный диапазон измерения  $k_1$  для радикалов (XXX) и (XL) величиной  $\Delta T \sim 40$  К [61, 74]. Укажем на принципиальную возможность расширения диапазона измерения частот протонного обмена методом ЭПР — это использование спектрометров с различными рабочими частотами. Как видно из приведенных на рис. 1 спектров ЭПР радикала (XXXI), разность частот  $\dot{\text{R}}$ - и  $\dot{\text{R}}\text{H}^+$ -форм в X-, Q-, и 2мм-диапазонах существенно различается (примерно в 4 раза).

Таким образом, метод ЭПР позволяет определить все кинетические параметры реакций протонного обмена в нитроксильных радикалах. Однако этот метод существенно ограничен, так как он применим только к реакциям в радикалах с  $pK \sim 3$  и  $pK \sim 11$ . В связи с этим очень полезным для стабильных нитроксильных радикалов представляется методический подход, позволяющий увеличить скорость обмена  $\dot{\text{R}} \rightleftharpoons \dot{\text{R}}\text{H}^+$  без повышения температуры [73, 74].

Ранее [30, 31] этот подход был реализован для случая короткоживущих радикалов добавлением в водный раствор буфера с  $pK_{\text{буф}}$ , близким к  $pK$  радикала, в результате чего основным механизмом обмена становилась реакция (76). В работах [73, 74] изучено влияние концентрации буфера на скорость обмена для ряда pH-чувствительных стабильных НР с  $3 < pK < 11$ , в которых в отсутствие буфера наблюдается медленный обмен. Увеличение концентрации буфера приводило к спектральным изменениям, характерным для перехода от медленного обмена к промежуточному, а затем быстрому (рис. 4). В области промежуточного обмена моделированием спектров ЭПР были рассчитаны времена жизни радикалов  $\tau_{\text{R}}$  и  $\tau_{\text{RH}^+}$  и соответствующие константы скоростей  $k_f$  и  $k_r$  (табл. 3). В табл. 3 приведены константы скоростей прямой и обратной реакций протонного обмена некоторых радикалов с различными партнерами. Наблюда-

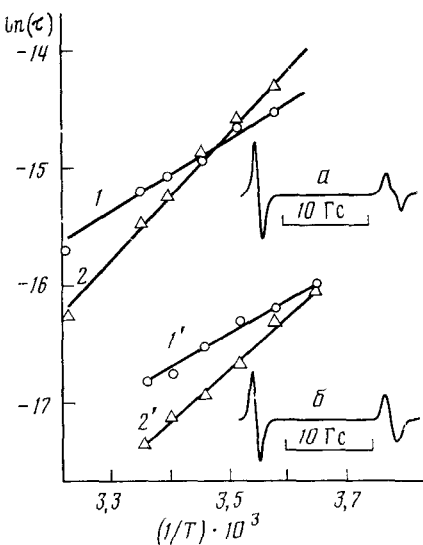


Рис. 3. Спектры ЭПР  $5 \cdot 10^{-5}$  М растворов радикала (XL) (центральная и высокопольная компоненты) при 278 К в  $\text{D}_2\text{O}$  (а) и  $\text{H}_2\text{O}$  (б); температурные зависимости времен жизни  $\tau_{\text{R}}$  (1),  $\tau_{\text{RD}^+}$  (2) в  $\text{D}_2\text{O}$  и  $\tau_{\text{R}}$  (1'),  $\tau_{\text{RH}^+}$  (2') в  $\text{H}_2\text{O}$  [74]

Таблица 3

Константы скорости прямой ( $k_f$ ) и обратной ( $k_r$ ) реакций протонного обмена некоторых радикалов с соединениями  $\text{BH}^+$  при 21° [74]

Радикал	$\text{BH}^+$	$k_f \cdot 10^{-7}$ , л/моль·с	$k_r \cdot 10^{-7}$ , л/моль·с
(XL)	$\text{H}_3\text{O}^+$	$850 \pm 90$	$2,7 \pm 0,3^*$
(XXX)	$\text{H}_3\text{O}^+$	50	$0,05^*$
(XLVI)	$\text{CH}_3\text{COOH}$	$20 \pm 1,5$	$53 \pm 3$
(XXXI)	$\text{CH}_3\text{COOH}$	$9,3 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,6$
(XXXIII)	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$20 \pm 2$	$200 \pm 20$

\* Размерность константы  $\text{с}^{-1}$ .

ется корреляция между бимолекулярной константой протонирования и стерической доступностью атома азота N(3): при обмене с сольватированным протоном в радикалах (XL) и (XXX), обладающих близкими  $pK$ , константа протонирования более чем на порядок меньше для радикала (XXX), имеющего объемную  $\text{CH}_3$ -группу при атоме N(3); замена атома водорода при атоме N(3) в радикале (XLVI) на  $\text{CH}_3$ -группу (радикал (XXXI)) также приводит к существенному уменьшению бимолекулярной константы протонирования в реакции протонного обмена с молекулой уксусной кислоты.

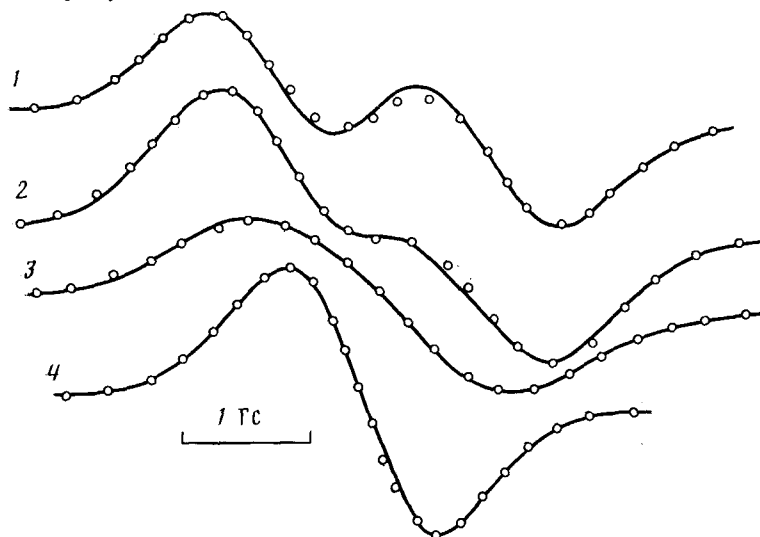


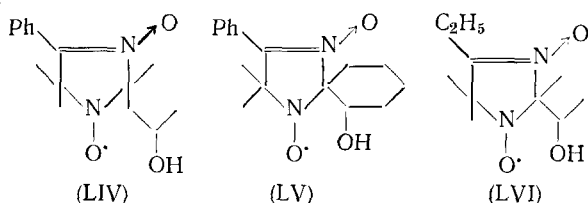
Рис. 4. Высокопольная компонента рассчитанного (точки) и наблюдаемого (сплошные линии) спектров ЭПР  $5 \cdot 10^{-5}$  М раствора радикала (XLVI) в К-ацетатном буфере ( $\text{pH}=4,35$ ) при 294 К и концентрациях буфера 0 (1);  $2,27 \cdot 10^{-2}$  (2);  $5,76 \cdot 10^{-2}$  (3) и 0,28 М (4) [74]

Таким образом, метод ЭПР весьма эффективен при изучении кинетики и термодинамики реакций протонного обмена в растворах. Наличие неспаренного электрона в молекуле радикала не оказывает влияния на скорость химической реакции переноса протона и позволяет наблюдать ее методом ЭПР. Это создает возможность использования реакций протонного обмена в НР в качестве модельных при изучении различных факторов (структуры радикала и свойств растворителя), влияющих на перенос протона. Важно отметить, что органическая химия НР хорошо развита и обеспечивает доступность различных НР [18, 22].

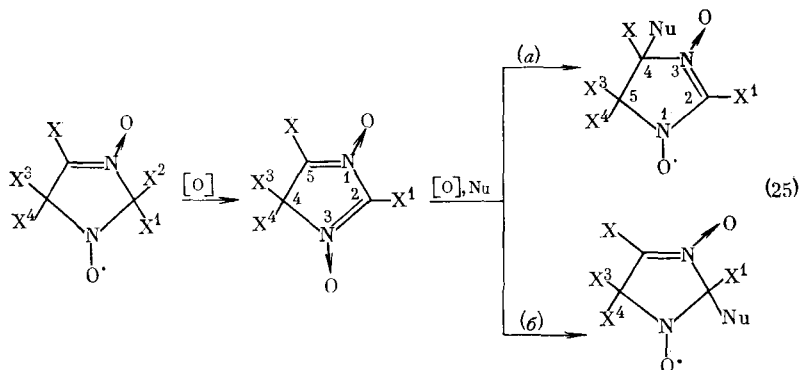
#### 4. Протонный обмен в нитронилнитроксильных и иминонитроксильных радикалах

##### а) Превращения нитроксильных радикалов 3-имидазолин-3-оксида в нитронилнитроксильные радикалы, вследствие изменения рН

При изучении влияния рН на спектры ЭПР стабильных радикалов 3-имидазолин-3-оксида (LIV)—(LVI) с оксисилльной группой в положении 2 гетероцикла было неожиданно обнаружено [77, 78], что при  $\text{pH} > 12$  спектры водных растворов этих радикалов необратимо трансформируются в более сложные мультиплетные спектры, типичные для ННР [46, 79].



Было доказано [77, 78], что в данном случае действительно имеет место превращение НР 3-имидазолин-3-оксида в ННР по общей схеме, включающей промежуточное образование 4Н-имидазолди-N-оксидов (25а):

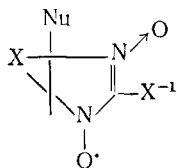


Данная реакция открывает большие возможности синтеза новых ННР; при этом можно менять как заместители  $\text{X}-\text{X}^4$ , так и нуклеофил  $\text{Nu}$  ( $\text{Nu} = \text{OH}^-$ ,  $\text{OCH}_3^-$ ,  $\text{NH}_3$  и др.) в зависимости от реакционной среды.

Согласно (25б), нуклеофильная атака может быть направлена не только в положение 5 4Н-имидазолди-N-оксида с образованием ННР, но и в положение 2 с образованием новых НР 3-имидазолин-3-оксида.

В работах [78, 80] восстановлением трифенилфосфином полученных по реакции (25а) ННР [46] получен ряд новых НР 3-имидазолин-3-оксида с отличным от алкила заместителем ( $\text{Nu}$ ) при С(2) ( $\text{Nu} = \text{OCH}_3$ ,  $\text{NH}_2$ ), а также ИНР.

В табл. 4 приведены параметры спектров ЭПР ряда полученных по схеме (25) ННР и ИНР.

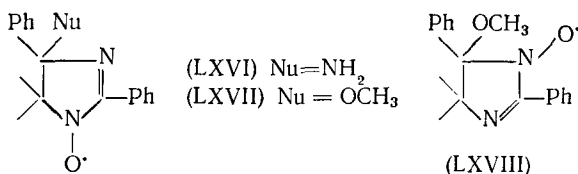


	(LXVII)	(LXVIII)	(LIX)	(LX)	(LXI)	(LXII)	(LXIII)	(LXIV)	(LXV)
Nu	OH	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
X	Ph	Ph	Ph	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Ph	Ph	Ph	Ph	Ph
X <sup>1</sup>	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHO	Ph	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CONH <sub>2</sub>	Ph	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOCH <sub>3</sub>	Ph

Константы СТВ\* для ряда ННР и ИНР в Н<sub>2</sub>O (в Гс) [77, 78]

Радикал	pH > pK + 1,5					pH < pK - 1,5				
	a <sub>N(1)</sub>	a <sub>N(3)</sub>	a <sub>H</sub>	a <sub>N(NH<sub>2</sub>)</sub>	a <sub>H(OCH<sub>3</sub>)</sub>	a <sub>N(1)</sub>	a <sub>N(3)</sub>	a <sub>H</sub>	a <sub>N(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)</sub>	a <sub>H(OCH<sub>3</sub>)</sub>
(LVII)	8,67	8,28	3,13	—	—	8,00	8,00	3,13	—	—
(LVII) **	8,67	11,65	3,13	—	—	8,00	11,34	3,13	—	—
(LVIII)	8,73	8,22	1,93	—	—	8,00	8,00	1,93	—	—
(LVIII) **	8,73	11,57	1,93	—	—	8,00	11,35	1,93	—	—
(LIX)	8,50	8,00	—	—	—	7,93	7,93	—	—	—
(LX)	8,75	8,45	3,17	—	—	8,13	8,13	3,17	—	—
(LXI)	8,00	8,00	1,90	—	—	7,55	7,55	1,90	1,2	—
(LXII)	8,05	8,05	—	0,2	—	7,60	7,60	—	1,2	—
(LXIII)	7,68	7,52	1,80	—	0,60	7,68	7,52	1,80	—	0,60
(LXIV)	7,70	7,50	1,30	—	0,55	7,70	7,50	1,30	—	0,55
(LXV)	7,67	7,67	—	—	—	7,67	7,67	—	—	—
(LXVI)	9,26	4,27	—	0,5	—	8,37	3,9	—	1,6	—
(LXVII)	9,10	4,10	—	—	—	9,10	4,10	—	—	—
(LXVIII)	8,90	4,00	—	—	—	8,90	4,00	—	—	—

\* Точность определения констант ± 0,05 Гс.

\*\* Радикалы (LXVII) \*\* и (LXVIII) \*\* являются обогащенными изотопом <sup>15</sup>N (3) радикалами (LXVII) и (LXVIII) соответственно.

Сравнение констант СТВ в ННР (LVII) и (LVIII) с соответствующими величинами в радикалах, обогащенных изотопом <sup>15</sup>N (3), позволило однозначно отнести «азотные» константы СТВ к ядрам атомов N(1) и N(3) (табл. 4).

#### б) Влияние pH на спектры ЭПР ННР и ИНР

Как видно из табл. 4, параметры спектров ЭПР ряда ННР и ИНР изменялись при варьировании pH, что объясняют протонированием NH<sub>2</sub> или депротонированием OH-группы при углероде C(4) [77, 78]. В то же время спектры ЭПР ННР (LXIII)—(LXV) и ИНР (LXVII) и (LXVIII), в структуре которых при C(4) отсутствуют способные протонироваться группы, не менялись в диапазоне pH 1—13.

Спектры ЭПР ННР (LVII)—(LX) в области pH, близких к pK, представляют собой суперпозицию спектров радикалов и их депротонированных форм; при этом для OH-группы в радикалах (LVII)—(LX) pK ≈ 9,2 [78].

Линии ЭПР-спектров ННР (LXI)—(LXII) по мере увеличения кислотности среды до pH < 3 и далее сначала уширяются, а затем расщепляются на три компоненты с соотношением интенсивностей 1 : 1 : 1 [78]. Наблюдаемые спектральные изменения объясняют быстрым протонным обменом в данных радикалах, а также существенным увеличением константы СТВ с ядром азота NH<sub>2</sub>-группы при ее протонировании. Так как время релаксации спина ядра азота велико в масштабе времени ЭПР, то при описании экспериментального спектра можно считать, что протонный обмен происходит между формами  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  радикала с одинаковой проекцией спина ядра азота  $S_z^N$ . Таким образом, если резонансные частоты форм  $\dot{R}$  и  $\dot{R}H^+$  радикала совпадают и равны  $\omega_0$ , то в спектре ЭПР будут наблюдаться три линии с частотами

$$\bar{\omega}(S_z^N = 0, \pm 1) = (\omega_0 + S_z^N \delta_0)(1 - f) + (\omega_0 + S_z^N \delta_1)f$$

где  $f$  — доля  $\dot{R}H^+$ -формы радикала,  $\delta_0$  — константа СТВ на азоте  $NH_2$ -группы,  $\delta_+$  — константа СТВ на азоте  $NH_3^+$ -группы. Моделированием центральной компоненты спектра ЭПР радикалов (LXI) и (LXII) были определены [78] значения  $f$  при различных рН и найдена величина  $pK = 1,75$  для  $NH_2$ -группы этих радикалов.

Значения  $pK \approx 9,2$  для  $OH$ -группы в радикалах (LVII)—(LX) и  $pK \approx 1,75$  для  $NH_2$ -группы в радикалах (LXI) и (LXII) примерно на семь единиц меньше  $pK$  соответственно алифатических спиртов и аминов [81], что указывает на сильное электроакцепторное влияние нитронилнитроксильной группы. В соответствии с этим при  $pD \geq 12$  в  $D_2O$  наблюдается дейтерообмен в метильной или метиленовой группах радикалов (LVII) и (LVIII) [78].

Необходимо отметить, что характер обмена  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$  в изученных ННР и ИНР [77, 78] описывается условием (22): в радикалах (LXI) и (LXII) с  $pK \approx 1,75$  обмен быстрый, а в радикале (LXVI) с  $pK = 4,5$  и радикалах (LVII)—(LX) с  $pK \approx 9,2$  медленный.

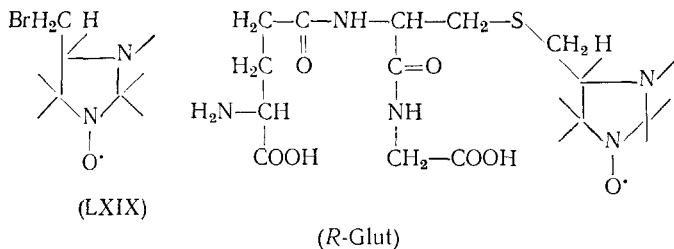
## V. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В КАЧЕСТВЕ рН-ЗОНДОВ

Из предыдущих разделов следует, что в настоящее время имеются рН-чувствительные НР, которые могут быть использованы в качестве рН-зондов в диапазоне рН 0—14. Точность измерения достигает при этом 0,05 единицы рН. Особенно важно это для биологических систем, включая клеточные [82, 83].

### 1. Спин-меченые рН-чувствительные белки и пептиды

Спин-меченые рН-чувствительные производные пептидного гормона ангиотензина были использованы [84, 85] для изучения конформационных переходов и внутримолекулярных взаимодействий в данном октапептиде в зависимости от рН. В работе [84] была изучена зависимость от рН спектров ЭПР радикальных аналогов ангиотензина, содержащих вместо имидазольного кольца гистидина ННР (аналогично радикальным аналогам гистидина (XXIII) и (XXIV)). Наблюдаемые спектральные изменения позволили сделать вывод о наличии ион-дипольного взаимодействия между ионом карбоксила С-конца октапептида и нитронилнитроксильным кольцом. Такое ион-дипольное взаимодействие способствует стабилизации «разрыхленной» структуры гормона при нейтральных рН, и его отсутствие при протонировании карбоксильной группы в кислой среде приводит к более компактной «хаотичной» структуре ангиотензина [84]. Указанный конформационный переход авторы [85] регистрировали по изменению спектров ЭПР спин-меченых аналогов ангиотензина, в которых по N-концу присоединен рН-чувствительный радикал (VI), в зависимости от рН. Был сделан вывод, что конформационному переходу сопутствует протонирование аминокислотной группы N-конца октапептида.

При модификации глутатиона радикалом (LXIX) был получен рН-чувствительный спиновый аналог данного трипептида *R*-Glut [63]:



Параметры спектра ЭПР *R*-Glut в диапазоне рН 1,5÷4,5 изменялись значительно больше ( $\Delta a_N = 1,2$  Гс,  $\Delta g \approx 0,0002$ ), чем в случае радикаль-

ных аналогов ангиотензина ( $\Delta a_N \leq 0,3$  Гс,  $\Delta g \leq 0,0001$ ). Это позволило использовать *R-Glut* в качестве рН-зонда при изучении механизма транспорта протонов через модельные биомембраны [86, 87].

Отметим, что алкилирующий радикал (LXIX) способен ковалентно связываться с различными функциональными группами аминокислотных остатков белков (SH, NH<sub>2</sub>, NH [88]) с образованием макромолекулярных рН-зондов. При решении многих биологических задач возможности применения спиновых макромолекулярных рН-зондов значительно шире, чем низкомолекулярных. Такой макромолекулярный зонд был получен при модификации белка — человеческого сывороточного альбумина — радикалом (LXIX) [61]. Изменения параметров спектра спин-меченого альбумина в диапазоне рН 1,7–4,7 ( $\Delta a_N = 1,15$  Гс,  $\Delta g \approx 0,0002$ ) обусловлены протонированием атома N(3) радикального цикла и не связаны с возможными конформационными превращениями белка.

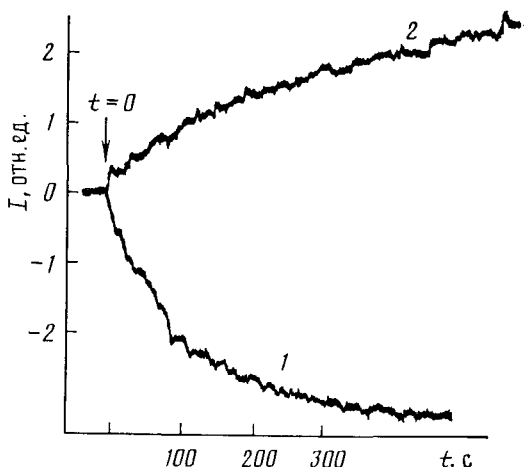
## 2. Перенос протона через модельные фосфолипидные мембраны

Протонный транспорт играет важную роль в регуляции ряда клеточных функций [82, 89]; это стимулирует многочисленные исследования механизмов трансмембранного переноса протона [90–100]. При изучении переноса протона через фосфолипидные везикулы широко используют молекулярные рН-зонды, что в большинстве случаев основано на возможности их введения во внутренний объем везикул (липосом) и регистрации с их помощью рН внутри липосомы ( $pH_{in}$ ) [99, 100]. Изменение характеристик рН-зонда (интенсивность флуоресценции [99], химический сдвиг сигнала ЯМР <sup>31</sup>P [100]) после создания трансмембранного градиента рН позволяет измерять кинетику изменения  $pH_{in}$  и, таким образом, потоки протонов через мембрану.

Спиновый рН-зонд (*R-Glut*) был использован для регистрации кинетики изменения внутрилипосомального рН [63, 86, 87]. Было показано, что *R-Glut* не вытекает из внутреннего объема фосфатидилхолиновых (ФХ) моноламеллярных липосом. При изменении рН в 0,1 М К-цитратном буфере наблюдается сдвиг линий триплетного спектра ЭПР радикала *R-Glut* без изменения формы линий (быстрый обмен  $\dot{R} \rightleftharpoons \dot{R}H^+$ ); при этом наиболее сильно сдвигается высокопольная компонента. Поэтому удобным параметром для изучения кинетики изменения  $pH_{in}$  является интенсивность спектра *R-Glut* на частоте  $\omega(pK)$ , соответствующей центру высокопольной компоненты при  $pH = pK = 3,0$ .

При создании трансмембранного градиента рН изменением концентрации HCl во внешнем объеме ФХ липосом наблюдалось изменение интенсивности спектра ЭПР *R-Glut*  $I(t)$  на частоте  $\omega(pK)$ ; при изменении знака и уменьшении величины градиента HCl происходило изменение знака и уменьшение скорости изменения  $I(t)$  [63] (рис. 5). Анализируя начальный участок кинетической кривой  $I(t)$ , определяли производную  $(dI/dt)_{t=0}$ , значение которой позволяет рассчитать поток протонов  $j_{H^+}$  через единицу поверхности мембраны в начальный момент времени после создания градиента рН. В табл. 5 приведены значения  $j_{H^+}$  при создании одинакового транс-мембранного градиента рН изменением концентрации различных кислот во внешнем объеме ФХ липосом. Постоянство сигнала ЭПР (за время  $\sim 2$  ч) в случае градиента H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в 0,1 М К-цитратном буфере показывает, что электрически нескомпенсированный транспорт протона, K<sup>+</sup>-зависимый транспорт протона и транспорт H<sup>+</sup> в виде недиссоциированной молекулы лимонной кислоты являются медленными процессами и их вклад в наблюдаемые зависимости  $I(t)$  при наличии градиентов концентраций HCl, HClO<sub>4</sub> и HNO<sub>3</sub> можно не учитывать. Поэтому в указанных случаях изменения  $I(t)$  могут определяться анион-, или X<sup>-</sup>-зависимым транспортом H<sup>+</sup> (X<sup>-</sup> = Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) или (и) транспортом протонов в виде недиссоциированной кислоты HX. Как видно из табл. 5, поток протонов, рассчитанный из зависимости  $I(t)$  возрастает при создании градиента H<sup>+</sup> кислотами с большим значением  $pK$  (в ряду HClO<sub>4</sub>, HCl, HNO<sub>3</sub>  $pK$  равны соответственно

Рис. 5. Зависимость амплитуды спектра ЭПР радикала R-Glut на частоте  $\omega$  (pK) от времени после создания трансмембранного градиента HCl [63]: 1 — pH вне липосом  $pH_{out}=1,63$ ;  $pH_{in}=3,13$ , 2 —  $pH_{out}=4,63$ ;  $pH_{in}=3,13$



—8, —7 и —1,62 [81]). Этот факт позволяет сделать вывод о транспорте протонов в кислой среде в виде недиссоциированной кислоты НХ, что подтверждается отсутствием влияния поверхностного заряда мембраны, варьируемого добавлением отрицательно заряженной фосфатидной кислоты или положительно заряженного цетил-3-метил-аммоний бромистого, на величину  $j_{H^+}$ , тогда как добавление холестерина существенно

Таблица 5

Потоки протонов  $j_{H^+}$  через мембрану ФХ липосом в начальный момент времени после создания трансмембранного градиента pH ( $pH_{out}=1,63$ ;  $pH_{in}=3,13$ ) различными кислотами и коэффициенты проницаемости  $P_{НХ}$  мембраны для данных кислот [63, 86, 87]

Кислота	$HClO_4$	$HCl$	$HNO_3$	$H_2SO_4$
$j_{H^+}$ , моль·см/л·с	$2 \cdot 10^{-10}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$\lesssim 10^{-12}$
$P_{НХ}$ , см/с	$2,2 \pm 1$	$2 \pm 1$	$(1,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	$\lesssim 10^{-7}$

уменьшает  $j_{H^+}$ . Следует отметить, что по данным [90] примерно такие же изменения поверхностного заряда ФХ мембраны липосом приводили к существенному изменению суммарного коэффициента проницаемости мембраны для протонов и гидроксил-ионов (в 3–4 раза). Вывод о транспорте протонов через ФХ мембраны липосом в области  $pH \sim 3$  в виде недиссоциированной кислоты и позволил рассчитать коэффициенты проницаемости  $P_{НХ}$  для HCl,  $HClO_4$  и  $HNO_3$  (для  $H_2SO_4$  оценена только верхняя граница) (табл. 5). Полученные методом ЭПР значения  $P_{HCl}$  и  $P_{HNO_3}$  близки к величинам, измеренным в работе [92] на плоских липидных мембранах ( $P_{HCl} \approx 3$  см/с,  $P_{HNO_3} \approx 10^{-3}$  см/с); в случае  $H_2SO_4$  в [92] также не зарегистрирован перенос протона через мембрану.

Предложенный в [63, 86, 87] новый метод изучения кинетики переноса протона через биомембраны может быть распространен на область нейтральных и щелочных pH, так как в настоящее время известны pH-чувствительные в данных диапазонах спиновые зонды.

\* \* \*

Как видно из проведенного обсуждения, использование чувствительных к pH стабильных НР позволяет получать количественную информацию о термодинамических и кинетических характеристиках простейшей химической реакции переноса протона. Большие успехи органической химии стабильных радикалов [18, 101, 102] открывают возможность детального изучения влияния стерических факторов, электронодонор-



ных и электроноакцепторных заместителей, растворителя на характеристики протонного переноса. Уникальные экспериментальные возможности изучения изотопных эффектов создает применение метода ЭПР в этих системах, в том числе в неводных растворителях при отсутствии эффектов сольватации.

Весьма перспективным является использование рН-чувствительных НР в качестве рН-зондов в химических и биологических системах. Возможность введения в состав НР гидрофобных и гидрофильных групп позволяет использовать их для определения рН внутри микрогетерогенных областей. Особый интерес представляет определение рН внутри клеток и некоторых клеточных структур, например лизосом. Измерение скорости транспорта протонов через природные мембраны методом ЭПР может оказаться полезным при решении многих задач биоэнергетики.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белл Р. П. Протон в химии. М.: Мир, 1977.
2. Willi A. V., Hilbert F., Grooks J. E.//Proton Transfer/Ed. Bamford C. H., Tipper C. F. H. Amsterdam: Elsevier, 1977.
3. Сокольский Д. В., Дорфман Я. А., Ракитская Т. Л. Протонно-апротонный катализ. Алма-Ата: Наука, 1975.
4. Доус Д. Э.//Количественные проблемы биохимии. М.: Мир, 1983. С. 52.
5. Bell R. P. The Tunnel Effect in Chemistry. L.: Chapman and Hall, 1980.
6. Меландер Л., Сондерс У. Скорости реакций изотопных молекул. М.: Мир, 1983.
7. Бейтс Р. Определение рН. Теория и практика. Л.: Химия, 1972.
8. Pucasso L. R., Corona S. K., Jacobson H. R., Carter N. W.//Analyt. Biochemistry. 1986. V. 153. P. 251.
9. Clement N. R., Gould M.//Biochemistry. 1981. V. 20. P. 1534.
10. Lee A. C., Forte J. G.//Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 601. P. 152.
11. Ohkuma S., Poole B.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 3327.
12. Vigue P., Frelin C., Lazdunski M.//FEBS Lett. 1984. V. 172. P. 275.
13. Barton J. K., Hollander J. A., Lee T. M. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 72. P. 2470.
14. Pollard H. B., Shindo H., Greutz C. E. et al.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 1170.
15. Kallas T., Dehlquist F. W.//Biochemistry 1981. V. 20. P. 5900.
16. Stewart J. M., Chapman B. E., Kirk K. et al.//Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 885. P. 23.
17. Розанцев Э. Г., Шолле В. Д.//Органическая химия свободных радикалов. М.: Химия, 1979. С. 171.
18. Keana J. F. W.//Spin Labeling in Farmacology/Ed. Holtzman J. L. Orlando: Academic Press, 1984. P. 1.
19. Keana J. F. W., Acarregui M. J., Boyle S. L. M.//J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 827.
20. Храмцов В. В., Вайнер Л. М., Григорьев И. А. и др.//Всесоюз. конф. по нитрокислым радикалам. Черногловка, 1982. С. 45.
21. Khramtsov V. V., Weiner L. M., Grigor'ev I. A., Volodarsky L. B.//Chem. Phys. Lett. 1982. V. 91. P. 69.
22. Володарский Л. Б., Вайнер Л. М.//Хим. фарм.-журн. 1983. Т. 6. С. 658.
23. Эмсли Дж., Финей Дж., Сатклиф Л.//Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. М.: Мир, 1968. С. 459.
24. Fisher H.//Mol. Phys. 1965. V. 9. P. 149.
25. Zeldes H., Livingston R.//J. Chem. Phys. 1966. V. 45. P. 1946.
26. Poupko R., Loewenstein A.//J. Chem. Soc. Ser. A. 1968. P. 949.
27. Eiben K., Fessenden R. W.//J. Phys. Chem. 1971. V. 75. P. 1186.
28. Laroff G. P., Fessenden R. W.//Ibid. 1973. V. 77. P. 1283.
29. Behar D., Fessenden R. W.//Ibid. 1972. V. 76. P. 3945.
30. Fisher H., Hellwege U.-H., Lehnig M.//Ber. Bunseng. Phys. Chem. 1968. B. 72. S. 1166.
31. Paul H., Fisher H.//Helv. Chim. acta. 1971. B. 54. S. 485.
32. Kirino Y., Ohkuma T., Kwan T.//Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. P. 29.
33. Скубневская Г. И., Володарский Л. Б., Дульцева Г. Г., Шукин Г. И.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1987. С. 312.
34. Carrington A., Smith I. C. P.//Mol. Phys. 1964. V. 8. P. 101.
35. Smith I. C. P., Carrington A.//Ibid. 1967. V. 12. P. 439.
36. Yamazaki I., Piette L. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 986.
37. Pritchett R. J.//Mol. Phys. 1967. V. 12. P. 481.
38. Grünbein A., Henglein A.//Ber. Bunseng. Phys. Chem. 1969. B. 73. S. 376.
39. Буаченко А. Л., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. М.: Химия, 1973.
40. Helbert J. N., Kopf P. W., Poindexter E. M., Wagner B. E.//J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1975. V. 94. P. 998.
41. Hogeveen H., German H. R., Proat A. P.//Rec. Trav. Chim. 1967. V. 86. P. 1063.
42. Hoffman B. M., Eames T. B.//J. Amer. Chem. Soc. 1969. V. 91. P. 2169.

43. Malatesta V., Ingold K.//Ibid. 1973. V. 95. P. 6404.
44. Голубев В. А., Розанцев Э. Г., Нейман М. Б.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1965. С. 1927.
45. Osiecki J. H., Ullman E. F.//J. Amer. Chem. Soc. 1968. V. 90. P. 1078.
46. Ullman E. F., Osiecki J. H.//J. Org. Chem. 1970. V. 35. P. 3623.
47. Wagner B. E., Helbert J. N., Bates R. D., Poindexter E. H.//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1973. P. 748.
48. Nakaie C. R., Goisis G., Schreier S., Paiva A. C. M.//Brazilian J. Med. Biol. Res. 1981. V. 14. P. 173.
49. Hsia J. C., Boggs J. M.//Biochim. Biophys. acta. 1972. V. 266. P. 18.
50. Quintauilha A. T., Melhorn R. J.//FEBS Lett. 1978. V. 91. P. 104.
51. Храмов В. В., Вайнер Л. М., Григорьев И. А. и др.//Хим. физика. 1985. Т. 4. С. 637.
52. Mathew A. E., Dodd J. R.//J. Heterocyclic Chem. 1985. V. 22. P. 225.
53. Weinkman R. J., Jorgensen E. C.//J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 7028.
54. Barrat M. D., Laggner P.//Biochim. Biophys. Acta. 1974. V. 363. P. 127.
55. Фрид Дж.//Метод спиновых меток. Теория и применение/Под ред. Берлинера Л. М.: Мир, 1979. С. 95.
56. Cafiso D. S., Hubbell W. L.//Biochemistry. 1978. V. 17. P. 3871.
57. Bragadin M., Viola E. R., Bettoli M. G.//Inorganic Chim. acta. 1983. V. 80. P. 51.
58. Cafiso D. S., Hubbell W. L.//Biophys. J. 1983. V. 44. P. 49.
59. Mehlhorn R. J., Probst I.//Methods Enzymol. 1982. V. 88. P. 334.
60. Melandri B. A., Mehlhorn R. J., Packer L.//Arch. Biochem. Biophys. 1984. V. 235. P. 97.
61. Khramtsov V. V., Weiner L. M., Eremenko S. I. et al.//J. Magn. Reson. 1985. V. 61. P. 397.
62. Shimshick E. J., McConnell H. M.//Biochemistry. 1973. V. 12. P. 2351.
63. Храмов В. В. Автореф. дис. канд. физ.-мат. наук. Новосибирск: ИХКИГ СО АН СССР, 1985.
64. Бельченко О. И., Счастнев П. В.//Всесоюз. конф. по квантовой химии. Черноголовка, 1985. С. 163.
65. Жидомиров Г. М., Счастнев П. В., Чувылкин Н. Д. Квантово-химические расчеты магнитно-резонансных параметров. Новосибирск: Наука, 1978.
66. Stone A. J.//Proc. Roy. Soc. 1963. V. 271. P. 424.
67. Шевырев А. А., Беликова Г. С., Володарский Л. Б., Симонов В. И.//Кристаллография. 1979. Т. 24. С. 787.
68. Ament S., Wetherington J., Moncrief J. et al.//J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. P. 7896.
69. Горб Л. Г., Абронин И. А., Харчевников Н., Жидомиров Г. М.//Журн. физ. химии. 1984. Т. LVIII. С. 9.
70. Григорьев И. А., Друганов А. Г., Володарский Л. Б.//Изв. СО АН СССР. 1976. № 9. С. 131.
71. Kozierski L.//Org. Magn. Res. 1977. V. 9. P. 395.
72. Kramer H. E., Gompper R.//Tetrahedron Lett. 1963. V. 15. P. 969.
73. Храмов В. В., Вайнер Л. М., Григорьев И. А., Володарский Л. Б.//Всесоюз. конф. «Магнитный резонанс в исследовании химических элементарных актов». Новосибирск, 1984. С. 96.
74. Храмов В. В., Вайнер Л. М.//Хим. физика. 1987. Т. 6. С. 499.
75. Лебедев Я. С., Муromцев В. И.//ЭПР и релаксация стабилизированных радикалов. М.: Химия, 1972. С. 45.
76. Glasoe P. K., Long F. A.//J. Phys. Chem. 1960. V. 64. P. 188.
77. Григорьев И. А., Шукин Г. И., Храмов В. В. и др.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1985. С. 2342.
78. Khramtsov V. V., Weiner L. M., Gogolev A. Z. et al.//Magn. Res. Chem. 1986. V. 24. P. 199.
79. Ullman E. F., Osiecki J. H., Boocock D. G. B., Darcy R.//J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 7049.
80. Grigor'ev I. A., Volodarsky L. B., Starichenko V. F. et al.//Tetrahed. Lett. 1985. V. 26. P. 5085.
81. Альберт Т. А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.; Л.: Химия, 1964.
82. Intracellular pH: its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Functions/Ed. Nuccitelli R. et al. N. Y.: Liss, 1982.
83. Тихонов А. Н., Блюменфельд Л. А.//Биофизика, 1985. Т. 30. С. 527.
84. Weinkman R. J., Jorgensen E. C.//J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 7033.
85. Nakaie C. R., Schreier S., Paiva A. C. M.//Bioch. Biophys. Acta. 1983. V. 742. P. 63.
86. Храмов В. В., Вайнер Л. М.//Международная школа по магнитному резонансу. Новосибирск, 1987. С. 84.
87. Khramtsov V. V., Weiner L. M.//Abstracts of XII Internat. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems. Todtmoos, 1986. P. 133.
88. Торчинский Ю. М.//Сульфидные и бисульфидные группы белков. М.: Наука, 1971. С. 32.
89. Boron W. F.//J. Membrane Biol. 1983. V. 72. P. 1.
90. Nichols J. W., Deamer D. W.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 2038.
91. Deamer D. W., Nichols J. W.//Ibid. 1983. V. 80. P. 165.
92. Gutknecht J., Walker A.//Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 641. P. 183.

93. *Gulkecht J.*//J. Membrane Biol. 1984. V. 82. P. 105.
94. *Rossignol M., Thomas P., Grignon C.*//Biochim. Biophys. acta. 1982. V. 684. P. 194.
95. *Krishnamoorthy G., Hinkle P. C.*//Biochemistry. 1984. V. 23. P. 1640.
96. *Elamrani K., Blume A.*//Biochim. Biophys. acta. 1983. V. 727. P. 22.
97. *Nozaki P., Tanford C.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 4324.
98. *Perkins W. R., Cajiso D. S.*//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 2270.
99. *Biegel C. M., Gould J. M.*//Ibid. 1981. V. 20. P. 3474.
100. *Trandinh S., Prigent Y., Lacapere J. J., Cary-Bobo C.*//Biochim. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 99. P. 439.
101. *Volodarsky L. B., Grigor'ev I. A., Sagdeev R. Z.*//Biological Magnetic Resonance/  
/Ed. Berliner L. J. et al. N. Y.: Plenum, 1980. V. 2. P. 169.
102. *Володарский Л. Б., Вайнер Л. М.*//Хим.-фарм. журн. 1983. Т. 5. С. 524.

Институт химической кинетики и  
горения СО АН СССР, Новосибирск