

УДК 53.083.2:539.196(547.458.2)

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭПР СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ,
ВОЗНИКАЮЩИХ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ АТОМОВ ВОДОРОДА
С ДИСАХАРИДАМИ

Г. В. АБАГЯН и А. С. АПРЕСЯН

Институт физических исследований АН Армянской ССР, Аштарак

Поступило 11 II 1976

Методом ЭПР исследованы свободные радикалы, возникающие при взаимодействии атомов водорода и дейтерия с сахарозой, лактозой, мальтозой, целлобиозой и трегалозой в замороженных сернических растворах при 110°K. Обнаружено несколько типов свободных радикалов. При повышении температуры образцов до 140°K протекают вторичные свободнорадикальные реакции, сопровождающиеся превращением спектров ЭПР.

Рис. 3, табл. 2, библиографические ссылки 18.

Природа свободных радикалов, возникающих при γ - и рентгеновском облучении дисахаридов, методом ЭПР была исследована в ряде работ [1—7]. Однако неселективность воздействия γ -радиации приводит к появлению сложных спектров ЭПР, что затрудняет их интерпретацию. При косвенном воздействии облучения существенную роль в образовании свободнорадикальных состояний играют атомы водорода [5, 6]. Для получения дополнительной информации, необходимой при выяснении механизмов радиационного поражения, мы исследовали взаимодействие с дисахаридами тепловых атомов водорода и дейтерия, обладающих относительной селективностью воздействия [8].

Методика экспериментов

Исследованы сахароза, лактоза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза, а также смеси 50% галактозы с 50% глюкозы и 50% глюкозы с 50% фруктозы—препараты коммерческие, без дополнительной очистки. Реакции этих веществ с атомами водорода (дейтерия) проводили в замороженных сернических растворах по методике, предложенной в [9, 10].

Источником атомов водорода в замороженных растворах является фотохимическая реакция



характеризующаяся большим квантовым выходом ($\sim 10^{20} \text{ g}^{-1}$). Атомы водорода (дейтерия) в присутствии H_2SO_4 (D_2SO_4) устойчивы при 80°K. Диффузия становится возможной после повышения температуры до

110—120°K. В этих условиях идет быстрая реакция атомов водорода (дейтерия) с растворенным веществом.

Водный (бидистиллят) раствор исследуемого вещества ($2 \cdot 10^{-2}$ М) смешивали с раствором FeSO_4 и H_2SO_4 (D_2SO_4), замораживали и освещали ультрафиолетовым светом. Во избежание протекания нежелательных реакций в растворах исследуемое вещество добавляли в заранее охлажденный сернокислотный раствор и смесь сразу же замораживали до 77°K. Получалась прозрачная бесцветная стеклообразная матрица. рН большинства исследуемых растворов 1,5. Проводили также контрольные опыты с рН 3—4, где вероятность кислотного гидролиза исследуемых соединений значительно понижена. При этих рН квантовый выход атомов водорода (дейтерия) уменьшается и спектры ЭПР исследуемых соединений малоинтенсивны. Возможность гидролиза исследуемых дисахаридов при растворении в кислоте контролировали методом Хагедорна-Иенсена [11].

Освещение ультрафиолетовым светом проводили лампой СВДШ-1000 с водяным фильтром, экспозиция 11 мин., охлаждение—жидким азотом в кварцевом сосуде Дьюара. Реакцию наблюдали методом ЭПР. После облучения растворов при 77°K ультрафиолетовым светом возникает интенсивный сигнал ЭПР атомов водорода (расщепление $\Delta H=502$ э), при 110°K он исчезает, параллельно возникает и растет сигнал от исследуемого вещества. Атомы водорода реагируют с растворенным веществом с высокой эффективностью—30% от общего числа образовавшихся атомов водорода вступают в реакцию при 110°K.

Термоотжиг растворов проводили в термостатирующих смесях, выдержка при каждой температуре 10 мин.

Результаты экспериментов

Структура спектров ЭПР продуктов взаимодействия атомов водорода с исследуемыми дисахаридами в условиях данного эксперимента не зависит от рН: для всех препаратов наблюдались одни и те же спектры ЭПР как при рН 1,5, так и при рН 4, в последнем случае однако сигналы были менее интенсивными. Спектры ЭПР продуктов взаимодействия атомов водорода с дисахаридами существенно отличаются от спектров ЭПР продуктов их взаимодействия с глюкозой и смесями 50% глюкозы + 50% галактозы и 50% глюкозы + 50% фруктозы. На основании идентичности спектров ЭПР, полученных при различных рН, а также несходства спектров ЭПР продуктов взаимодействия атомов H с исследуемыми дисахаридами и смесями составляющих их компонентов можно утверждать, что структура исследуемых дисахаридов в условиях наших экспериментов не подвергалась изменению. Это подтверждают также данные, полученные методом Хагедорна-Иенсена.

Спектры ЭПР продуктов взаимодействия атомов водорода и дейтерия с исследуемыми дисахаридами приведены на рис. 1. Они состоят из суммы (в различных соотношениях) сигналов от трех различных ти-

пов свободных радикалов: тип I—это радикалы, которым соответствует спектр ЭПР—дублет дублетов ($\Delta H_1=48\pm 1$ э и $\Delta H_2=16\pm 1$ э), тип II—радикалы с дублетным спектром ЭПР ($\Delta H=22\pm 1$ э) и тип III—одиночная линия ($\Delta H=10\pm 1$ э). Более отчетливо линии, соответствующие трем типам наблюдаемых радикалов, прослеживаются в спектрах ЭПР продуктов взаимодействия атомов дейтерия с трегалозой и их последующего термоотжига (рис. 2). При 153°K спектр состоит из чистого дублета (рис. 2г). После графического вычитания этого дублета из спектра ЭПР при 143°K получаем спектр (рис. 2б), в котором можно легко проследить линии, соответствующие свободным радикалам типа I и III. Спектральные характеристики наблюдаемых радикалов приведены в табл. 1.

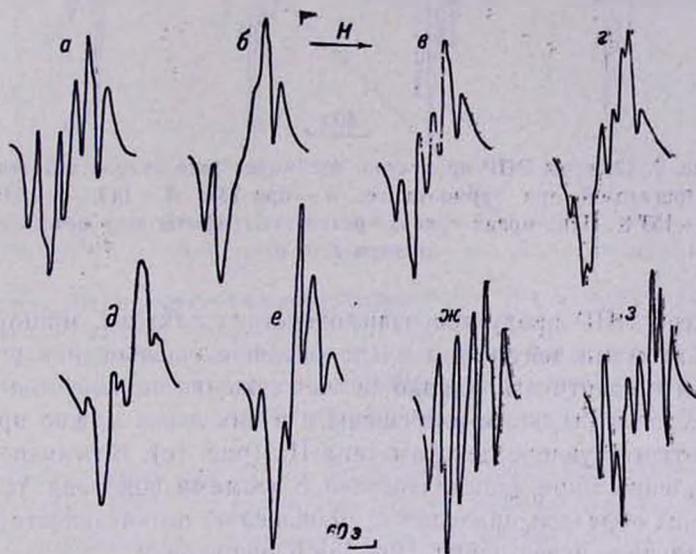


Рис. 1. Спектры ЭПР продуктов взаимодействия дихлоридов с атомами H: а — целлобиоза, б — мальтоза, в — лактоза, г — трегалоза, д — сахароза; и с атомами D: е — сахароза, ж — целлобиоза. з — трегалоза, $t = 110^\circ\text{K}$.

Спектры ЭПР продуктов взаимодействия атомов водорода с исследуемыми дисахаридами при 110°K при термоотжиге трансформируются почти одинаково: положение и интенсивность крайних линий в спектре остаются неизменными, линии же в середине спектра, соответствующие дублетному спектру ЭПР, значительно возрастают, очевидно, за счет уменьшения интенсивности одиночной линии. Наиболее четко это превращение проявляется в спектре мальтозы (рис. 1б и рис. 3). Линейная анаморфоза кривой накопления центров, соответствующих дублетному спектру ЭПР при 143°K , приведена на рис. 3. Это превращение, соответствующее переходу радикалов типа III в II, происходит с сохранением суммарной концентрации радикалов и описывается уравнением реакции первого порядка с константой скорости $\sim 4 \cdot 10^{-4}$ сек⁻¹ при 143°K .

Дальнейшее повышение температуры образцов до 150°К приводит к уменьшению интенсивности спектров без их существенной перестройки, при 155°К суммарная интенсивность спектра резко уменьшается.

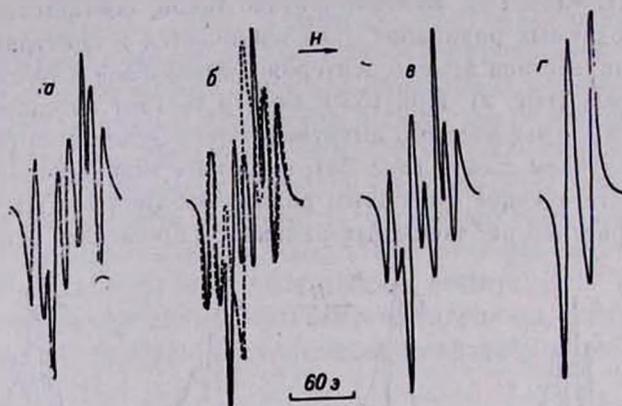


Рис. 2. Спектры ЭПР продуктов взаимодействия атомов дейтерия с трегалозой при термоотжиге: а — при 133, б — 143, в — 148, г — 153°К. Пунктирная кривая — результат графического вычитания спектра г от б.

Спектры ЭПР продуктов взаимодействия лактозы, мальтозы и сахарозы с атомами дейтерия и их дальнейшие превращения при термоотжиге почти идентичны. Однако за счет сужения ширины индивидуальных линий спектры более разрешены и в них легко можно проследить линии, соответствующие центрам типа III (рис. 1е). В отличие от спектров, полученных при взаимодействии с атомами водорода, повышение температуры образцов приводит к уменьшению интенсивности спектров без существенной перестройки. При 156°К они гибнут.

Таблица 1
Спектральные характеристики наблюдаемых радикалов

Тип радикала	СТС	ΔH , э	g^*
I	Дублет дублетов 1:1:1:1	$\Delta H_1 = 48 \pm 4$ $\Delta H_2 = 16 \pm 1$	2,0019
II	Дублет 1:1	22 ± 1	2,0026
III	Синглет	10 ± 1	2,0033

* Определяли с точностью $\Delta g = 0,0006$.

Обсуждение

Идентичность спектров ЭПР исследуемых дисахаридов дает основание заключить, что неспаренный электрон локализован на фрагменте

молекулы, общем для всех исследуемых дисахаридов. Таким фрагментом в исследуемых дисахаридах является глюкопиранозное кольцо в С1 конформации [12].

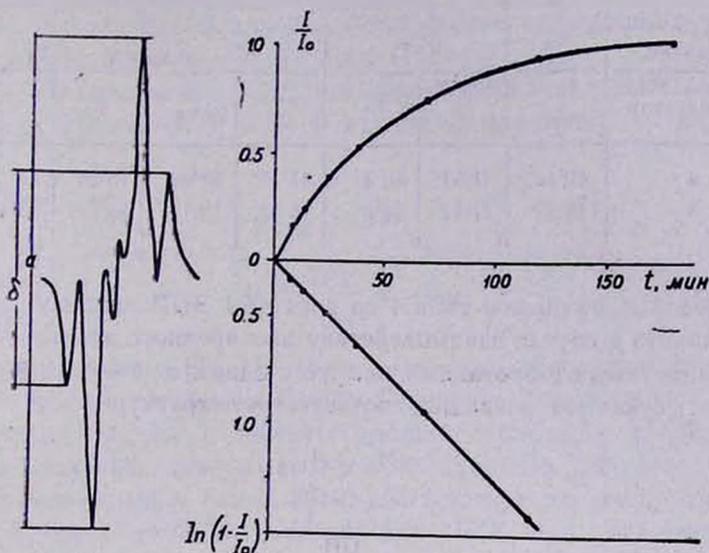


Рис. 3. Спектр ЭПР продуктов взаимодействия атомов Н с мальтозой при 110°К и последующем прогреве образца до 143°К. При 143°К компонента *a* в спектре растёт, *b* остается неизменной. Верхняя кривая—накопление радикалов, соответствующих компоненте *a* (в отн. ед.). Нижняя кривая — линейная анаморфоза кривой накопления.

Для установления структуры радикалов, соответствующих наблюдаемым спектрам ЭПР, на стереохимической модели глюкопиранозного кольца в С1 конформации, построенной на основании данных [13], были детально рассмотрены все возможные конформации радикалов, возникающих в результате разрыва С—Н и С—ОН связей последовательно у всех атомов углерода пиранозного кольца. При построении моделей радикалов принималось во внимание, что локализация неспаренного электрона на $2p_z$ -орбитали атома углерода приводит к тому, что гибридизация поврежденного фрагмента молекулы становится ближе к sp^2 , чем к sp^3 [3, 14], т. е. сам радикал становится более плоским. Предполагая, что конфигурация глюкопиранозного кольца остается неизменной, вычисления угла θ между осью $2p_z$ -орбитали неспаренного электрона и проекцией C_β —Н связи на плоскость, перпендикулярную C_α —С₁ связи, проводили для двух случаев: а) ось $2p_z$ -орбитали неспаренного электрона, локализованного у С(*n*), перпендикулярна плоскости, проходящей через С(*n*—1), С(*n*), С(*n*+1); б) ось $2p_z$ перпендикулярна плоскости, проходящей через С(*n*±2) и С(*n*±1).

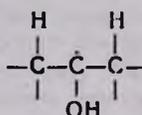
Значения конформационных углов θ , вычисленные из стереохимических моделей (табл. 2), были сопоставлены со значениями этих углов, определенных с помощью полуэмпирических правил анализа спектров ЭПР алкилзамещенных радикалов [15].

Таблица 2

Значения угла θ (в град.) при локализации неспаренного электрона у различных атомов углерода глюкопиранозного кольца в конформации С1

Место локализации	C ₂		C ₃		C ₄		C ₅	
	C ₂	C ₁	C ₃	C ₂	C ₄	C ₃	C ₅	C ₄
Атомы С, у которых определяли угол θ								
Вариант а	47°10'	41°31'	32°42'	41°16'	39°48'	25°54'	24°13'	37°42'
Вариант б	15°32'	21°11'	24°6'	15°32'	10°12'	24°6'	23°41'	10°12'

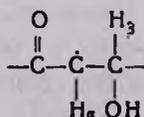
Свободные радикалы типа I со спектром ЭПР шириной в 64 э могут возникать в случае взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными β -протонами или же с одним α - и одним β -протоном. В первом случае это, очевидно, соответствует структуре



которая может реализоваться при отрыве атома водорода у C₂, C₃ или C₄, соответственно. Используя значения θ , определенные из модели согласно формуле $a_{\text{H}\beta} = 58.6 \cdot \rho_{\alpha} \cdot \cos^2 \theta$ [15], можно определить величины расщеплений a_{H} на β -протонах. В случае локализации неспаренного электрона у C₂ и C₃ для общей ширины спектра $a_{\text{H}_{\beta_1}} + a_{\text{H}_{\beta_2}}$ получаем значения 47—52 и 72—78 э, соответствующие вариантам а и б. Когда же неспаренный электрон локализован у C₄ для обоих случаев а и б общая ширина спектра равна 72 э. Вычисленные значения для общей ширины спектра при локализации неспаренного электрона соответственно у C₂, C₃ и C₄ в вышеприведенной структуре не соответствуют экспериментально наблюдаемым (табл. 1).

Взаимодействие с одним α - и одним β -протоном может иметь место при разрыве С—О связи у C₁ или C_{1'}. Вычисление $a_{\text{H}\beta}$ для случаев а и б дает соответственно значения в 20 и 40 э, что также не совпадает с экспериментально определенными значениями.

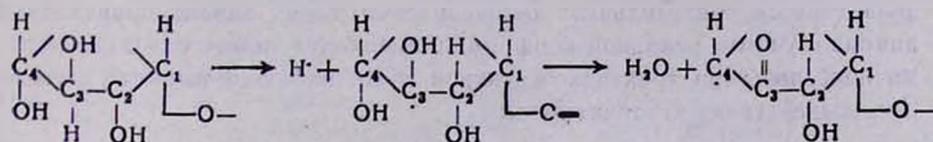
Структура типа



в которой сверхтонкая структура (СТС) спектра ЭПР также обусловлена взаимодействием с одним α - и одним β -протоном, может возникнуть в результате вторичных процессов дегидратации [16, 17]. Для этого случая были рассмотрены структуры с локализацией неспаренного электрона соответственно у C₂, C₃ и C₄ атомов углерода. При локализации не-

спаренного электрона у C_3 и значении угла $\theta = 15^\circ 32'$ (случай б, табл. 2) расщепление на β -протоне получаем равным 48,5 э, что совпадает со значением, определенным из эксперимента (табл. 1). Такие же значения (~ 45 э) получаются в случае локализации неспаренного электрона у C_4 , соответствующие случаям а и б (табл. 2).

Таким образом, можно полагать, что образование радикалов, соответствующих спектру ЭПР типа I, возможно, протекает по следующей схеме:

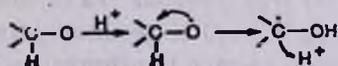


предложенной также в [7]. Наиболее вероятные места локализации неспаренного электрона—атомы C_3 или C_4 пиранозного кольца.

Свободные радикалы, соответствующие дублетному спектру ЭПР типа II, наблюдались нами и ранее в моносахаридах [18]. Однако в отличие от моносахаридов линии ЭПР, соответствующие этому спектру и наблюдающиеся в исходных спектрах при 110°K , при 140°K значительно возрастают, очевидно, в результате протекания вторичных свободно-радикальных реакций. Этот спектр соответствует взаимодействию неспаренного электрона с одним β -протоном: в дисахаридах этот случай может осуществляться при локализации свободной валентности на C_1 или C'_1 . На самом деле, подставляя значение угла $\theta 47^\circ 10'$ (табл. 2) в формулу для a_H , получаем значение $a_H = 21$ э, которое хорошо совпадает с экспериментально наблюдаемым (табл. 1).

Синглетный спектр ЭПР соответствует свободным радикалам, которые ранее нами не наблюдались в спектрах моносахаридов. Вероятнее всего, это радикалы со свободной валентностью на атоме кислорода, возникающие в результате разрыва глюкозидной связи. Однако имеющихся экспериментальных данных недостаточно для того, чтобы предложить механизм радикальных реакций, предшествующих разрыву глюкозидной связи.

На основании имеющихся данных можно предложить следующую схему наблюдаемого взаимного превращения свободных радикалов типа III в II:



согласно которой в кислой среде происходит протонизация карбоксильного кислорода и смещение электронной плотности на атом углерода, что приводит к отщеплению атома H с локализацией неспаренного электрона у атома углерода C_1 . В растворе D_2O при повышении температуры образцов превращений в спектрах ЭПР не наблюдается, очевидно,

вследствие того, что скорость процесса дейтеризации сравнима со скоростью гибели радикалов.

Итак, свободные радикалы, соответствующие дублетному спектру ЭПР, возникают как непосредственно в результате разрыва С—Н связи у C_1 и C'_1 атомов углерода, так и в результате процесса внутримолекулярной миграции свободной валентности.

В заключение следует отметить, что хотя некоторая неопределенность в выборе полуэмпирического коэффициента в формуле для a_{H_2} делает менее убедительным данное рассмотрение, однако проведенный анализ с учетом реальной конформации молекул может оказаться весьма полезным при трактовке спектров ЭПР, наблюдаемых при различных воздействиях на дисахариды.

**ԻՒՍԱԽԱՐԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ՋՐԱՄԵՆԻ ԱՏՈՄՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ԺԱՄԱՆԱԿ ԱՌԱՋԱՑՈՂ ԱՋԱՏ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՊՌ ՄԵԹՈԴՈՎ**

Հ. Վ. ԱԲԱԳՅԱՆ և Ա. Ս. ԱՊՐԵՅԱՆ

ԷՊՌ մեթոդով մինչև 110°K սառեցված ծծմբական թթվի լուծույթում հետազոտված են սախարոզայի, լակտոզայի, մալտոզայի, ցելոբիոզայի և տրեգալոզայի հետ շրածնի և դեյտերիումի ատոմների փոխազդեցությունից առաջացած ազատ ռադիկալները: Հայտնաբերված են ազատ ռադիկալների մի քանի տեսակներ: Ցույց է տրված, որ նմուշների շերմաստիճանը մինչև 140°K բարձրացնելիս տեղի են ունենում էՊՌ սպեկտրների ձևափոխամբ ուղեկցվող երկրորդային ազատռադիկալային ռեակցիաներ:

AN ESR STUDY OF FREE RADICALS RESULTING FROM THE
INTERACTION OF HYDROGEN ATOMS WITH DISACCHARIDES

H. V. ABAGHIAN and A. S. APRESSIAN

The nature of free radicals resulting from the interaction of hydrogen and deuterium atoms with sucrose, lactose, maltose, cellobiose and trehalose in frozen solutions of sulphuric acid at 110°K have been investigated. Several types of free radicals have been detected. During a temperature increase of up to 140°K secondary free-radical reactions take place accompanied by ESR spectra transformation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. D. Williams, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1740 (1959).
2. H. Shields, P. Hamrick, J. Chem. Phys., 37, 202 (1962).
3. H. Ueda, J. Phys. Chem., 67, 2185 (1963).
4. J. N. Herač, K. Adamič, R. Blinc, J. Chem. Phys., 42, 2388 (1965).

5. *Н. М. Эмануэль, В. А. Шарпатов, М. Т. Наджимиддинова, Л. И. Кудряшов, С. М. Яровая, Н. К. Кочетков*, ДАН СССР, 177, 1142 (1967).
6. *P. J. Vaugh, K. Kershaw, G. O. Phillips*, J. Chem. Soc., B, 1970, 1482.
7. *A. Gröslund, G. Löfroth*, Acta Chem. Scand., B29, 475 (1975).
8. *H. C. Heller, S. Schlück, T. Cole*, J. Phys. Chem., 71, 97 (1967).
9. *Б. Н. Шалимов, Н. Н. Бубнов, Н. В. Фок, В. В. Воеводский*, ДАН СССР, 134, 145 (1960).
10. *И. М. Бажин, Н. М. Лихачева, Н. Н. Бубнов, В. В. Воеводский*, Кия. и кат., 6, 1405 (1965).
11. *А. М. Петрунькина*, Практическая биохимия, Изд. «Медгиз», Л., 1961, стр. 202.
12. *Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков, Б. А. Дмитриев, А. И. Усов, О. С. Чижов, В. Н. Шибеев*, Химия углеводов, Изд. «Химия», М., 1967, стр. 37, 42.
13. *T. Taga, M. Senma, K. Osaki*, Acta Crystallogr., B28, 3258 (1972).
14. *C. Alexander, C. E. Franklin*, J. Chem. Phys., 54, 1909 (1971).
15. *П. Ю. Бутягин, А. М. Дубинская, В. А. Радциг*, Усп. хим., 38, 593 (1969).
16. *R. O. C. Norman, R. J. Pritchett*, J. Chem. Soc., B, 1967, 1329.
17. *Г. В. Абагян, А. С. Апресян*, Арм. хым., ж., 29, 144 (1976).
18. *Г. В. Абагян, А. С. Апресян, А. М. Дубинская*, ЖФХ, 50, 28 (1976).