

УДК 547.024, 547.7

DOI: 10.15372/KhUR2024588

EDN: FNSNID

**(1*R*,5*S*,7*S*,8*R*,12*S*,13*S*)-12,13-Дигидрокси-1,8-
бис(гидроксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-
6-оксил – хиральный гидрофильный
диспироциклический радикал
с высокой устойчивостью к восстановлению**

Ю. В. ХОРОШУНОВА¹, Д. А. МОРОЗОВ¹, Т. В. РЫБАЛОВА¹, С. Ю. ТРАХИНИНА^{1,2}, Н. Б. АСАНБАЕВА¹,
Ю. С. СОТНИКОВА¹, И. А. КИРИЛЮК¹

¹Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail: horoshunova@nioch.nsc.ru

²Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

(Поступила 31.05.2024; после доработки 17.07.2024; принята к печати 22.07.2024)

Аннотация

Современные тенденции развития структурной биологии делают актуальными исследования строения биомолекул в условиях, приближенных к естественным, т. е. непосредственно в живой клетке и при температурах, близких к физиологическим. Одна из перспективных технологий, позволяющих приблизиться к этому идеалу, – адресное введение спиновых меток (например, нитроксильных радикалов) с последующим исследованием методами импульсного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). На сегодняшний день наибольшую устойчивость в живых системах демонстрируют пространственно затрудненные нитроксильные радикалы пирролидинового ряда с четырьмя этильными группами при парамагнитном центре, но их релаксационные характеристики не позволяют проводить измерения методами импульсного ЭПР при температурах выше 80 К. Нитроксильные радикалы со спироциклоалкановыми фрагментами в окружении нитроксильной группы пригодны для измерений при более высоких температурах, но они быстро восстанавливаются компонентами живых систем. Пирролидиновые нитроксильные радикалы с двумя спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами сочетают высокую устойчивость к восстановлению с высокими временами спиновой релаксации при температуре 120 К и выше. В этой работе нами впервые получен и охарактеризован гидрофильный хиральный радикал этого ряда – (1*R*,5*S*,7*S*,8*R*,12*S*,13*S*)-12,13-дигидрокси-1,8-бис(гидроксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-6-оксил.

Ключевые слова: 6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан, пирролидиновый нитроксильный радикал, пространственно затрудненный нитроксильный радикал, спиновая релаксация

ВВЕДЕНИЕ

Методы импульсной дипольной спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), такие как двойной электрон-электронный резонанс (DEER или PELDOR) [1–3] и двухквантовая

когерентность (DQC) [4, 5], широко используются для измерения наноразмерных расстояний в биомолекулах, включая достаточно крупные комплексы, имеющие биологическое значение [6–10]. Эти методы основаны на зависимости диполь-дипольного взаимодействия от расстояния меж-

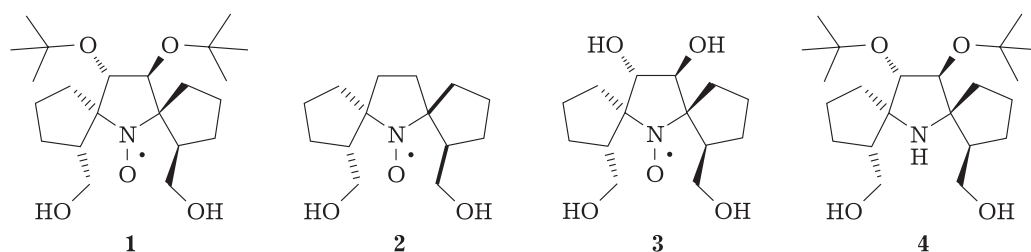


Рис. 1. Структуры соединений 1–4.

ду двумя спиновыми метками. Набор измеренных расстояний позволяет судить о вкладе тех или иных конформаций и их динамике. Хотя большинство экспериментов обычно проводятся при очень низких температурах в замороженных растворах, некоторые недавние достижения открыли возможности для применения метода и при комнатных/физиологических температурах [11–13]. Точность измерения и доступный диапазон расстояний зависят от времени изменения фазы спина электрона (или фазовой памяти) спиновой метки (T_m). Низкое значение T_m наиболее распространенных спиновых меток долгое время было основным препятствием для применения импульсного дипольного ЭПР при комнатных температурах. Ранее было показано, что использование нитроксильных радикалов с двумя спироциклогексановыми фрагментами в окружении нитроксильной группы в сочетании с иммобилизацией в трегалозе позволяет измерять межспиновые расстояния порядка 3.2 нм при комнатной температуре [13]. Однако большинство подобных исследований проводится в модельных системах, где структура и функции белка могут существенно отличаться от таковых в естественном окружении внутри живой клетки [14–16]. Для проведения исследований *in cell* требуются спиновые метки, которые обладают высокой устойчивостью к восстановлению биогенными антиоксидантами и редокс-активными ферментативными системами клеток в диамагнитных гидросиламины. На сегодняшний день наибольшую устойчивость в живых системах демонстрируют пространственно затрудненные нитроксильные радикалы пирролидинового ряда с четырьмя этильными (или более объемными алкильными) группами при парамагнитном центре, но их релаксационные характеристики не позволяют проводить измерения методами импульсного ЭПР при температурах выше 80 К.

Ранее нами были получены пирролидиновые нитроксильные радикалы с двумя спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами 1, 2

(рис. 1), сочетающие высокую устойчивость к восстановлению с высокими временами спиновой релаксации при температуре 120 К и выше [17, 18]. В этой работе нами был синтезирован новый хиральный нитроксильный радикал – (1*R*,5*S*,7*S*,8*R*,12*S*,13*S*)-12,13-дигидрокси-1,8-бис(гидроксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]-тридекан-6-оксил 3 из ранее полученного амина 4, измерены параметры его спектра ЭПР, липофильность, константа скорости восстановления аскорбат-анионом и времена спиновой релаксации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы

ИК-спектры зарегистрированы на Фурье ИК-спектрометре Varian 640-IR (Varian, США) в тонком слое или в KBr при концентрации 1 : 150. Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы с помощью масс-спектрометра высокого разрешения DFS (Thermo Electron, Германия). Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведен на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором на длинах волн 250, 280, 330, 360 нм. Разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C18 (2.1 × 150 мм, 3.5 мкм) при скорости потока 0.25 мл/мин в градиентном режиме элюирования смесью воды (А) и метанола (Б): 10 % Б – 0 мин, 100 % Б – 30 мин. Температура колонки 30 °С; объем вводимой пробы 1 мкл. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 400 (Германия, 400.130 МГц) в 5–10 % растворах в CD_3OD или CDCl_3 при 300 К. В качестве внутреннего стандарта использовался сигнал растворителя. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 400 (100.613 МГц) при температуре 300 К. В качестве внутреннего стандарта использовался сигнал растворителя. Элементный анализ был выполнен на автоматическом CHN-анализаторе

EURO EA (Италия). Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках SiO_2 (Merck, элюент – хлороформ, метанол, этилацетат, гексан, диэтиловый эфир или их смеси). Для очистки полученных веществ использовали метод перекристаллизации или колоночной хроматографии (силикагель для колоночной хроматографии Merck 60, 0.063–0.2 мм). Используемые проявители для ТСХ: реактив Драгендорфа, фосфорномолибденовая кислота, УФ-лампа с длиной волны 254 нм.

Монокристалльный рентгеноструктурный эксперимент для соединения **5** проводили на дифрактометре Bruker KAPPA APEX-II CCD (Германия) с использованием MoK_α -излучения (графитовый монохроматор, φ - и ω -сканирование) при 296 К. Введена поправка на поглощение по программе SADABS [19]. Структура расшифрована прямым методом с использованием программы SHELXT-2014/5 [20] и уточнена в анизотропно-изотропном (для атомов H) приближении по программе SHELXL-2018/3 [21]. Атомы водорода уточнены изотропно в модели “наездника”, за исключением атомов водорода OH-групп и при азоте в пирролидиновом цикле, положения которых определены по пикам разностной электронной плотности и уточнены независимо от неводородных атомов. Полученные кристаллографические данные для соединения **5** (атомные координаты, длины связей и углы) депонированы в Кембриджскую базу структурных данных под номером CCDC 2358364 и могут быть свободно получены по адресу www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Материалы

Оптически чистый [(1R,5S,7S,8R,12S,13S)-12,13-ди-трет-бутокси-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-1,8-диил]диметанол **4** ($[\alpha]_D^{30.9} = -71$ (с 0.09, CHCl_3)) (см. рис. 1) был получен по литературной методике [17].

Метанол (CH_3OH , квалификация “техн.” марки А, Уфа-Хим, Россия), метанол (CH_3OH , квалификация “ос. ч.” для градиентной ВЭЖХ, Химмед, Россия), хлороформ (CHCl_3 , квалификация “х. ч.”, НПП “Гамма”, Россия), этилацетат ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, квалификация “ч.”, НПП “Гамма”, Россия); гексан (C_6H_{14} , квалификация “ч.”, Реахим, Россия), диэтиловый эфир ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, квалификация “ч. д. а.”, НПП “Гамма”, Россия), этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 95 %, Константа-Фарм М, Россия), изопропанол ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, квалификация “х. ч.”, АО Сиб-реахим, Россия)

Исследования методом ЭПР

Определение коэффициента распределения н-октанол/вода. Спектры ЭПР нитроксильных радикалов регистрировали на коммерческом спектрометре X-диапазона Bruker Elexsys E 540 (Bruker, США) при $\sim 20^\circ\text{C}$ в водных растворах (10^{-4} М). Измерения проводились в стеклянных капиллярах емкостью 100 мкл со следующими настройками спектрометра: амплитуда модуляции – 1.5 Гс; мощность СВЧ – 2.0 мВт. Моделирование спектров ЭПР растворов радикалов проводили с помощью программы EasySpin 6.0.0 [22], которая доступна на сайте <http://www.easyspin.org>.

Определение коэффициента липофильности радикала **3** проводили следующим образом: из водного раствора нитроксильного радикала концентрацией 10^{-4} М были приготовлены растворы, содержащие 10, 20 и 50 % октанола. После их центрифугирования регистрировали стационарные ЭПР-спектры водной фазы каждой смеси в X-диапазоне (~ 9.87 ГГц). Определяя значения интегральной интенсивности спектров и зная таковую для 100 % водного раствора, получали искомый коэффициент распределения нитроксильного радикала между н-октанолом и водой.

В случае радикалов **1** и **2** из их 10^{-4} М октанольных растворов готовили смеси, содержащие 10, 25, 50 % воды, и спектры ЭПР регистрировали с органической фазы. Из полученных данных находили коэффициент липофильности, действуя так же, как и в случае радикала **3**.

Кинетические измерения. Для проведения кинетических измерений 50 мкл раствора аскорбата натрия с концентрацией 0.4 М смешивали с 50 мкл 4 mM раствора глутатиона и добавляли 100 мкл 0.2 mM раствора нитроксильного радикала. Аскорбат натрия и нитроксильный радикал были в соотношении 1000 : 1 в итоговом растворе. Все растворы были приготовлены в фосфатном буфере (10 mM, pH 7.4). Значение pH 7.4 достигалось с помощью раствора гидроксида натрия. Регистрировали падение интенсивности сигнала ЭПР, прямо пропорционального концентрации радикала в смеси. График кинетической кривой восстановления радикала в этих условиях (рис. 2) был аппроксимирован экспоненциальной функцией вида:

$$y = A \exp(-k_1 t) + y_0$$

где k_1 – константа скорости псевдопервого порядка, с^{-1} .

Аппроксимацию данной функцией проводили, используя предположение, что реакция

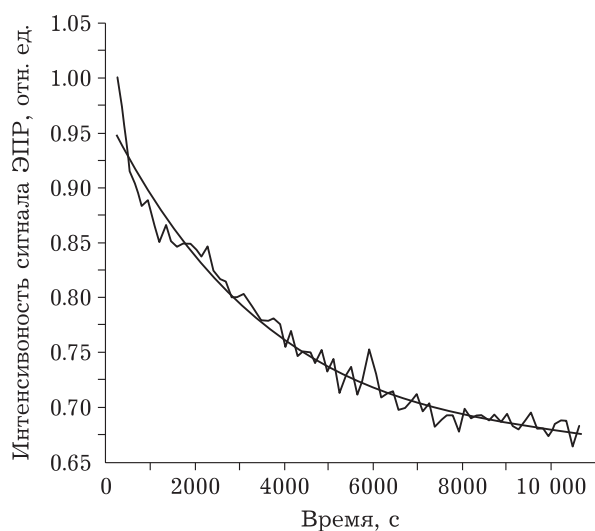


Рис. 2. Кинетическая кривая восстановления радикала **3** аскорбатом натрия (соотношение концентраций аскорбат натрия/радикал **3** = 1000 : 1).

превращения нитроксильного радикала в соответствующий гидроксилламин является реакцией псевдопервого порядка при многократном избытке аскорбата, а также при использовании

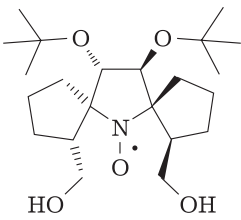
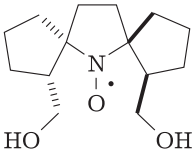
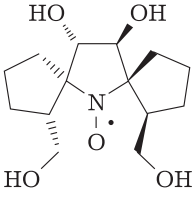
глутатиона, который восстанавливает образующийся аскорбат-радикал обратно в аскорбат-анион [23]. Далее по найденным из аппроксимации значениям k_1 были рассчитаны значения констант скорости реакции второго порядка, k_2 (табл. 1).

Измерение времен релаксации. Измерения времен электронной спиновой релаксации при 80 и 120 К проводили на импульсном ЭПР-спектрометре X-диапазона, оснащенного проточным гелиевым криостатом и системой контроля температуры [24]. Для этого были приготовлены растворы радикалов с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ М в системе вода/глицерин (для получения “стекла”) в соотношении 1 : 1 с последующим переносом в кварцевую ампулу. В результате измерений получали кривые спада интенсивности сигнала спинового эха от времени, из аппроксимации которых находили значения времен релаксации T_1 и T_m .

Время T_m измеряли с использованием двухимпульсной последовательности электронного спинового эха. Время T_1 измеряли с использованием метода восстановления инверсии. Дли-

ТАБЛИЦА 1

Константы скорости восстановления аскорбатом натрия и коэффициенты распределения октанол/вода спироциклических нитроксильных радикалов **1–3**

Нитроксильный радикал	Константа скорости восстановления, k , л/(моль · с)	Коэффициент распределения (октанол/вода)
 1	$(3.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ [18]	1.0 ± 0.3
 2	$(3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ [18]	38 ± 5
 3	$(5.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$	0.5 ± 0.2

тельность π -импульса в обоих экспериментах составляла 40 нс.

Методики синтеза

(1R,5S,7S,8R,12S,13S)-1,8-бис(гидроксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-12,13-диол (5). К аминоспирту **4** (0.53 г; 1.38 ммоль), помещенному на ледяную баню, прибавляли при перемешивании трифторуксусную кислоту (4.5 мл) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 сут до завершения реакции. Контроль полноты протекания процесса осуществляли с помощью ТСХ (силикагель, соотношение хлороформ/метанол = 10 : 1 (по объему); проявитель: реактив Драгендорфа, $R_f = 0.2$). Трифторуксусную кислоту упаривали при пониженном давлении, остаток растворяли в метаноле и снова упаривали при пониженном давлении для удаления следов кислоты. К остатку прибавляли концентрированный раствор NaOH (5 мл, 6 М) и растирали, выпадавший осадок отфильтровывали, сушили на воздухе и перекристаллизовывали из этилового спирта. Бесцветные кристаллы. Выход 53 %. Т. пл. 191–193 °С (EtOH); $[\alpha]_D^{27.5} = +16$ (с 0.8, CH₃OH). ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3433, 3354, 3311 (О–Н, N–Н), 2962 (C–Н), 2916 (C–Н), 2883 (C–Н), 2862 (C–Н), 1151, 1011 (C–О). Элементный анализ, найдено, %: C 61.96, H 9.30, N 5.12; вычислено для C₁₄H₂₅O₄N, %: C 61.97, H 9.29, N 5.16. Масс-спектр высокого разрешения (EI/DFS), найдено: m/z 271.1776 [M]⁺; вычислено для C₁₄H₂₅O₄N: 271.1778. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CD₃OD, δ , м. д.): 1.69–1.94 (м, 10H); 2.08–2.17 (м, 2H); 2.23–2.36 (м, 2H); 3.89 (дд, $J_{d1} = 4.1$ Гц, $J_{d2} = 11.8$ Гц, 2H); 4.07 (дд, $J_{d1} = 2.8$ Гц, $J_{d2} = 11.8$ Гц, 2H); 4.12 (с, 2H). Спектр ЯМР ¹³C (100 МГц, CD₃OD, δ , м. д.): 21.53, 25.68, 32.27, 44.83, 60.67, 75.05, 75.40. Кристаллы (брутто-формула C₁₄H₂₅NO₄) ромбические, пространственная группа P2₁2₁2₁; $a = 8.9772(4)$ Å, $b = 11.1392(3)$ Å, $c = 13.5483(4)$ Å; $V = 1354.81(8)$ Å³, $d_{\text{выч}} = 1.330$ г/см³, $Z = 4$. Измерено 8380 отражений в области $\theta < 27.5^\circ$. Окончательные значения факторов расходимости: $R = 0.0381$, $wR_2 = 0.1$ для 2934 отражений с $I > 2\sigma(I)$ и $R = 0.0405$, $wR_2 = 0.1037$ для всех 3088 независимых отражений, добротность подгонки $S = 1.084$. Абсолютная конфигурация определена согласно конфигурации исходных соединений, параметр Флэка равен 0.6(3).

(1R,5S,7S,8R,12S,13S)-1,8-бис(ацетилоксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-12,13-диолдиацетат (6). Аминоспирт **5** (0.4 г; 1.47 ммоль) растворяли в сухом хлороформе (10 мл), при-

бавляли уксусный ангидрид (3.01 г; 29.52 ммоль), безводный ацетат натрия (0.5 г) и кипятили с обратным холодильником в течение недели до окончания реакции. Контроль за ходом процесса осуществляли с помощью ТСХ (силикагель, соотношение хлороформ/метанол = 10 : 1 (по объему) и гексан/этилацетат = 2 : 1 (по объему); проявитель: реактив Драгендорфа, $R_f = 0.45$). Реакционную массу промывали насыщенным раствором Na₂CO₃ (3 × 15 мл) и сушили безводным Na₂CO₃. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на силикагеле в системе гексан/этилацетат от 2 : 1 до 1 : 2 (по объему). Бесцветное масло. Выход 84 %. $[\alpha]_D^{25.1} = -44$ (с 1.05, CHCl₃). ИК-спектр (тонкий слой), ν , см⁻¹: 3385 (N–H), 2958 (C–H), 2875 (C–H), 1743 (C=O), 1238, 1036 (C–O). Элементный анализ, найдено, %: C 70.36, H 7.73, N 3.19; вычислено для C₂₂H₃₃O₈N, %: C 70.12, H 7.57, N 3.19. Масс-спектр высокого разрешения (EI/DFS), найдено: m/z 439.2202 [M]⁺; вычислено для C₂₂H₃₃O₈N: 439.2201. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ , м. д.): 1.30–1.42 (м, 2H); 1.46–1.59 (м, 4H); 1.60–1.80 (м, 5H); 1.89–1.99 (м, 2H); 2.02–2.11 (м, 2H); 2.06 (с, 6H) и 2.08 (с, 6H); 4.11–4.20 (м, 4H); 5.41 (с, 2H). Спектр ЯМР ¹³C (100 МГц, CDCl₃, δ , м. д.): 20.83, 20.87, 20.89, 26.49, 36.06, 43.83, 64.03, 67.24, 78.17, 170.40, 170.87.

(1R,5S,7S,8R,12S,13S)-12,13-бис(ацетилокси)-1,8-бис[(ацетилокси)метил]-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-6-оксил (7). *m*-Хлорнадбензойную кислоту (mCPBA) (0.30 г; 1.74 ммоль) одной порцией прибавляли при перемешивании к раствору соединения **6** (0.54 г; 1.24 ммоль) в сухом хлороформе (10 мл), замороженному жидким азотом. Давали реакционной массе при перемешивании нагреться до комнатной температуры. Контроль за ходом процесса осуществляли с помощью ТСХ (силикагель, соотношение гексан/этилацетат = 2 : 1; проявитель: УФ-лампа, фосфорномолибденовая кислота, $R_f = 0.4$). Реакционную массу промывали насыщенным раствором Na₂CO₃ (2 × 15 мл), затем дистиллированной водой (2 × 15 мл) и сушили безводным Na₂CO₃. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на силикагеле в системе гексан/этилацетат = 4 : 1. Желтое масло. Выход 64 %. $[\alpha]_D^{25.1} = +174$ (с 0.65, CHCl₃). ИК-спектр (тонкий слой), ν , см⁻¹: 2958 (C–H), 2874 (C–H), 1743 (C=O), 1232, 1036 (C–O). Элементный анализ, найдено, %: C 58.19, H 7.05, N 3.09; вычислено для C₂₂H₃₂O₉N, %: C 58.14, H 7.10, N 3.08. Масс-спектр высокого разрешения (EI/DFS),

найденно: m/z 454.2076 $[M]^+$; вычислено для $C_{22}H_{32}O_9N$: 454.2072.

(1R,5S,7S,8R,12S,13S)-12,13-дигидрокси-1,8-бис(гидроксиметил)-6-азадиспиро[4.1.4.2]-тридекан-6-оксил (3). Нитроксильный радикал **7** (0.25 г; 0.55 ммоль) растворяли в метаноле (4 мл), добавляли 10%-й водный раствор NaOH (6 мл) и выдерживали при комнатной температуре до завершения реакции в течение 2 сут. Контроль полноты протекания процесса осуществляли с помощью ТСХ (силикагель, диэтиловый эфир; проявитель: УФ-лампа). Реакционную массу упаривали при пониженном давлении досуха. К остатку приливали смесь изопропанола и хлороформа в соотношении 1 : 3 (по объему) и растирали. Твердый осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на силикагеле в системе хлороформ/метанол = 3 : 1, R_f = 0.3. Желтое карамелеобразное вещество. Выход 89 %. $[\alpha]_D^{25.1} = +201$ (с 0.65, H_2O). ИК-спектр (KBr), ν , cm^{-1} : 3405 (O–H), 2954 (C–H), 2939 (C–H), 2872 (C–H), 1117, 1032 (C–O). Элементный анализ, найденно, %: C 58.55, H 8.61, N 4.92; вычислено для $C_{14}H_{24}O_5N$, %: C 58.72, H 8.45, N 4.89. Масс-спектр высокого разрешения (EI/DFS), найденно: m/z 286.1651 $[M]^+$; вычислено для $C_{14}H_{24}O_5N$: 286.1649. Чистота подтверждена ВЭЖХ-анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В синтезе радикала **3** были использованы методики, ранее разработанные для получения

радикала **1** (см. рис. 1) [17], и внесенные нами ранее усовершенствования [25]. Как известно, расщепление трет-бутиловых эфиров легко происходит под действием кислот, например трифторуксусной кислоты [26]. Предварительные эксперименты показали, что радикал **1** неустойчив к действию кислот, что может быть связано с типичным для нитроксильных радикалов обратимым диспропорционированием нитроксильной группы с образованием соответствующего гидроксиламина и оксоаммониевой соли [27–29]. Как известно, оксоаммониевые соли быстро окисляют спирты [30], и близкое соседство нитроксильной группы с гидроксильной в соединении **1** (см. рис. 1) не оставляет шансов на обратимость диспропорционирования. Поэтому для получения радикала **3** был использован предшественник радикала **1**, амин **4**. Реакцию проводили по аналогии с литературной методикой [31] (схема 1).

Из-за высокой гидрофильности отделение полученного продукта **5** от трифторуксусной кислоты, а также выделение его в чистом виде оказалось непростой задачей. Добиться кристаллизации аминотетраола **5** удалось растиранием остатка с концентрированным раствором гидроксида натрия после полного удаления трифторуксусной кислоты. Соединение **5**, полученное с выходом 53 %, представляло собой бесцветные кристаллы. В спектрах ЯМР 1H и ^{13}C этого продукта отсутствуют сигналы *трет*-бутильных групп, но сохраняются сигналы атомов трициклического остова. Строение соединения **5** было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа

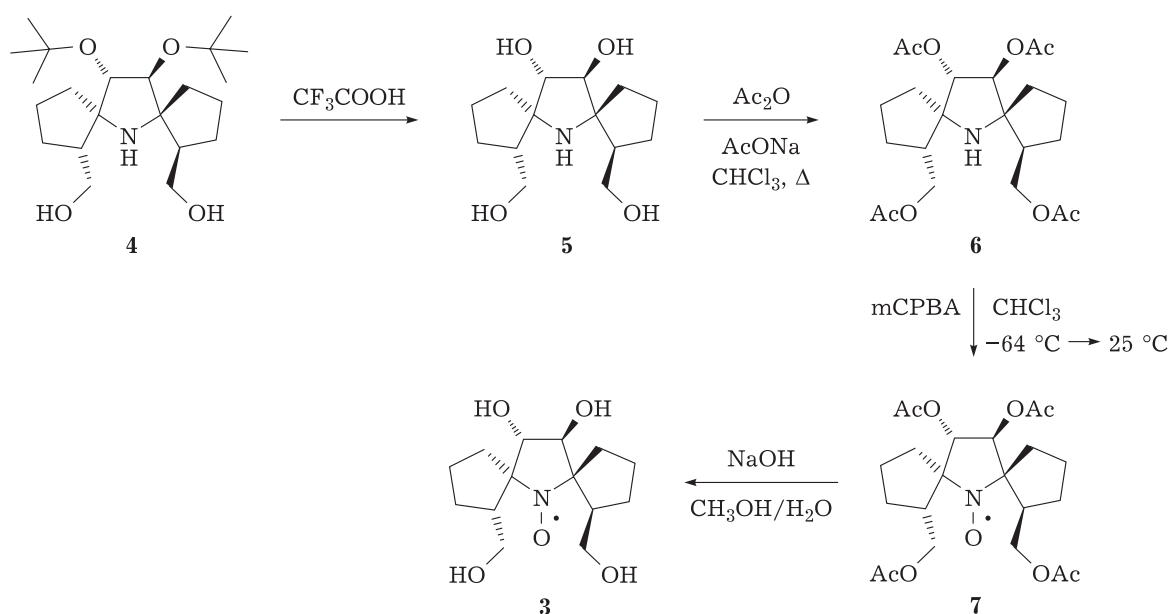


Схема 1.

(рис. 3). Интересно отметить, что в отличие от нитроксильного радикала **1** (см. рис. 1), содержащего *трет*-бутоксигруппы в положениях 3 и 4 пирролидинового кольца в аксиальной конформации [17], соответствующие гидроксигруппы аминокспирта **5** занимают экваториальное положение.

Для получения нитроксильного радикала необходимо провести окисление аминогруппы аминокетона **5**. Процесс окисления вторичных аминов в нитроксильные радикалы сопровождается промежуточным образованием оксоаммониевых солей [28], которые, в свою очередь, могут выступать эффективными окислителями спиртов в карбонильные соединения [30]. Чтобы избежать нежелательных процессов по ОН-группам и увеличить выход целевого радикала, спиртовые группы соединения **5** были защищены путем ацетилирования уксусным ангидридом, аналогично описанной нами ранее методике [18, 25]. Тетраацетат **6**, представляющий собой бесцветное масло, был получен с выходом 84 %. В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C появляются сигналы двух пар ацетильных групп (2.06 и 2.08 м. д. в спектре ^1H ; 170.40 и 170.87 м. д. в спектре ^{13}C). Также в ИК-спектре присутствует полоса колебаний карбонильной группы в области 1743 см^{-1} .

Окисление вторичного амина **6** в нитроксильный радикал проводили под действием mCPBA. Интересно отметить, что в отличие от окисления 3,4-незамещенных спироциклических пирролидинов, близких по структуре амину **6**, образования продуктов, содержащих двойную углеродуглеродную связь в циклопентановом кольце,

как описано нами ранее [18, 25], в данном случае не наблюдалось. Нитроксильный радикал **7** был выделен с выходом 64 % и представлял собой желтое масло, в ИК-спектре которого отсутствуют полосы выше 3000 см^{-1} . Данные элементного анализа и масс-спектра высокого разрешения соответствуют предложенной структуре.

Заключительной стадией синтеза оптически активного водорастворимого нитроксильного радикала было удаление ацетильных групп путем щелочного гидролиза тетраацетата **7**. В результате с выходом 89 % был выделен нитроксильный радикал **3**, представляющий собой желтую карамелеобразную массу. Об отсутствии ацетильных групп в полученном соединении позволяют судить данные ИК-спектроскопии: полос поглощения в области 1740 см^{-1} , характерных для сложноэфирных карбонильных групп, не наблюдается. Состав и чистота продукта **3** подтверждены данными масс-спектрометрии высокого разрешения и ВЭЖХ-анализом.

Для получения магнитно-резонансных параметров радикалов **1–3** были зарегистрированы спектры ЭПР в X-диапазоне (9.87 ГГц) при комнатной температуре для водных растворов (10^{-4} моль/л). Для всех радикалов наблюдается расщепление в спектре ЭПР, обусловленное сверхтонким взаимодействием (СТВ) с атомом азота (константа изотропного СТВ $A_{\text{Niso}} = 1.48 \pm 0.05\text{ мТл}$ (**1**) [17], $1.52 \pm 0.05\text{ мТл}$ (**2**) [18], $1.49 \pm 0.05\text{ мТл}$ (**3**)) (рис. 4).

Для полученного нитроксильного радикала **3** была исследована кинетика восстановления в 10 мМ фосфатном буфере при pH 7.4 (см. экс-

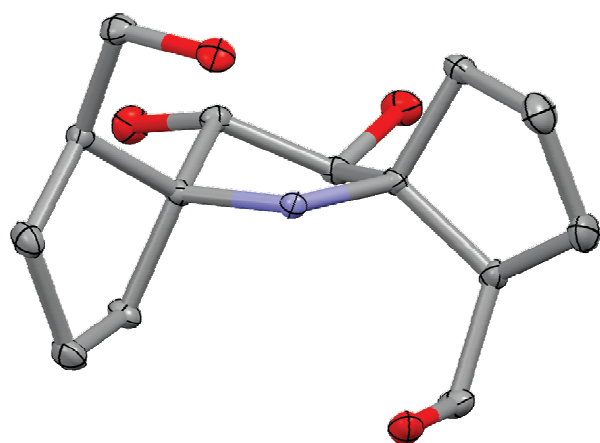


Рис. 3. Молекулярная структура соединения **5** по данным рентгеноструктурного анализа (тепловые эллипсоиды приведены с вероятностью 50 %). Атомы водорода опущены для простоты восприятия.

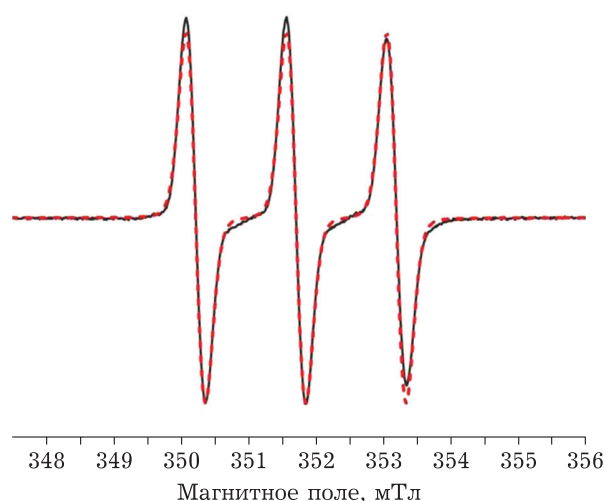


Рис. 4. Спектр ЭПР (X-диапазон) 10^{-4} М водного раствора радикала **3**. Черная сплошная линия относится к экспериментальному спектру, красная пунктирная – к моделированному.

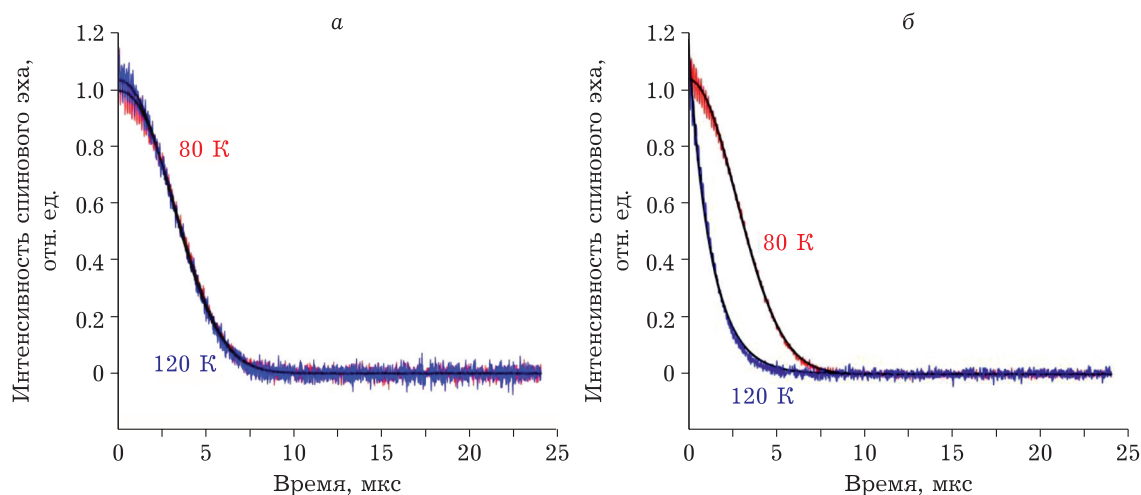


Рис. 5 Экспериментальные кривые спада сигнала спинового эха в результате фазовой релаксации для 0.1 мМ растворов радикалов **3** (а) и **1** (б) в водно-глицериновом растворе (1 : 1) и температурах: 80 К (красные кривые), 120 К (синие кривые). Были использованы микроволновые импульсы длительностью 20 и 40 нс (для $\pi/2$ - и π -импульсов соответственно) и частотой 9.7 ГГц. Черные сплошные линии соответствуют данным аппроксимации по формуле $I = I_0 \exp(-(t/T_2)^n)$, соответствующие значения n указаны в табл. 2

периментальную часть). Полученные константы скорости приведены в табл. 1.

Как следует из данных табл. 1, устойчивость всех трех диспироциклических нитроксильных радикалов более чем на порядок превышает устойчивость 2,2,5,5-тетраметилпирролидин-1-оксила [32] и сравнима с таковыми значениями тетраэтильных нитроксильных меток, пригодных для исследований в живых системах [33–35].

Оценку липофильности синтезированного радикала **3**, а также нитроксильных радикалов **1** и **2**, полученных нами ранее [17, 18], проводили, определяя коэффициенты распределения октанол/вода. Полученные данные представлены в табл. 1.

Времена электронной спиновой релаксации для радикалов **1** и **3** были измерены при двух температурах (80 и 120 К) в водно-глицериновом растворе (1 : 1). Соответствующие результаты представлены на рис. 5 и приведены в табл. 2. Для радикала **3** (рис. 5, а) и при 80 К, и при 120 К отчетливо видно неэкспоненциальное затухание интенсивности спинового эха. Ранее было показано, что подобные кривые затухания спинового эха в водно-глицериновом растворе (1 : 1) описываются формулой: $I = I_0 \exp(-(t/T_2)^n)$, где $n > 1$, и определяются за счет дополнительного механизма ядерной спиновой диффузии [36]. Увеличение температуры от 80 до 120 К не привело к изменению времени T_m для **3** в пределах точности измерения, тогда как для радикала **1**

оно уменьшилось практически в 3 раза: с 3.8 до 1.3 мкс. Вероятно, этот эффект обусловлен проявлением дополнительного механизма спиновой релаксации электронов за счет влияния заместителей в положениях 3 и 4 пирролидинового кольца в радикале **1**, поскольку при 120 К размораживается вращение метильных групп в трет-бутильных фрагментах.

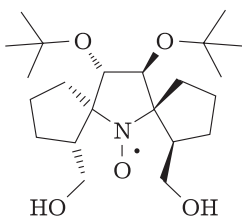
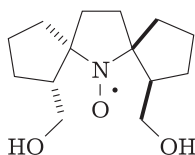
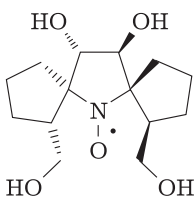
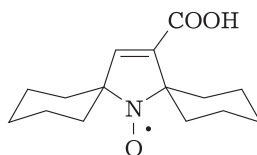
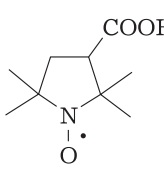
Для сравнения измеренных времен спиновой релаксации в табл. 2 приведены аналогичные значения для диспироциклогексанового радикала **8** [37] и тетраметильного нитроксильного радикала **9** [18]. Как можно видеть, времена спиновой релаксации нитроксильных радикалов **2** и **3** как при 80 К, так и при 120 К сопоставимы с таковыми значениями спироциклического нитроксильного радикала **8**, а при температуре 120 К – гораздо больше соответствующих времен спиновой релаксации тетраметильного радикала **9**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описан метод получения оптически активного диспироциклического нитроксильного радикала, который продемонстрировал очень привлекательные свойства. Уникальной особенностью этого радикала является сочетание высокой устойчивости к восстановлению с улучшенными характеристиками спиновой релаксации, характерными для нитроксильных радикалов с двумя

ТАБЛИЦА 2

Значения измеренных времен релаксации T_1 и T_m и коэффициента n^* при температурах 80 и 120 К для нитроксильных радикалов

Нитроксильный радикал	80 К			120 К			Литература
	T_1 , мс (± 0.1)	T_m , мкс (± 0.1)	n , (± 0.02)	T_1 , мс (± 0.1)	T_m , мкс (± 0.1)	n , (± 0.02)	
 1	1.5	3.8	2.05	0.5	1.3	1.00	Эта работа
 2	0.94	3.0	1.70	0.34	2.8	1.67	[18]
 3	1.2	4.3	2.23	0.4	4.1	2.14	Эта работа
 8	1.1	3.9	—	0.4	3.9	—	[37]
 9	0.51	3.1	1.70	0.22	1.1	1.0	[18]

* См. рис. 5.

спироциклическими фрагментами, примыкающими к нитроксильной группе $N^{\cdot-}O$, а также высокая растворимость в воде, что ранее было нехарактерно для высокоустойчивых пространственно затрудненных нитроксильных радикалов. Полученное диспироциклическое соединение содержит четыре гидроксильные группы. Это открывает возможность синтеза спиновых меток различной топологии. Важно, что связывание с крупными биомолекулами через гидроксиметильный линкер в спироциклопентановом

заместителе может существенно снизить стерическую доступность радикального центра, а это, в свою очередь, приведет к дополнительному росту устойчивости к восстановлению.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-23-00617, <https://rscf.ru/project/23-23-00617/>.

Авторы выражают благодарность Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН за проведение спектральных и аналитических измерений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Милов А. Д., Салихов К. М., Щилов М. Д. Применение метода двойного резонанса в электронном спиновом эхе для изучения пространственного распределения парамагнитных центров в твердых телах // *Физика твердого тела*. 1981. Т. 23, № 4. С. 975–982.
- 2 Larsen R. G., Singel D. J. Double electron-electron resonance spin-echo modulation: spectroscopic measurement of electron spin pair separations in orientationally disordered solids // *J. Chem. Phys.* 1993. Vol. 98, No. 7. P. 5134–5146.
- 3 Pannier M., Veit S., Godt A., Jeschke G., Spiess H. W. Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins // *J. Magn. Reson.* 2000. Vol. 142, No. 2. P. 331–340.
- 4 Borbat P. P., Mchaourab H. S., Freed J. H. Protein structure determination using long-distance constraints from double-quantum coherence ESR: study of T4 lysozyme // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, No. 19. P. 5304–5314.
- 5 Saxena S., Freed J. H. Theory of double quantum two-dimensional electron spin resonance with application to distance measurements // *J. Chem. Phys.* 1997. Vol. 107, No. 5. P. 1317–1340.
- 6 Duss O., Michel E., Yulikov M., Schubert M., Jeschke G., Allain F. H.-T. Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge // *Nature*. 2014. Vol. 509, No. 7502. P. 588–592.
- 7 Jeschke G. DEER distance measurements on proteins // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012. Vol. 63. P. 419–446.
- 8 Borbat P. P., Freed J. H. Pulse dipolar electron spin resonance: distance measurements // *Structural Information from Spin-Labels and Intrinsic Paramagnetic Centres in the Biosciences* / C. R. Timmel, J. R. Harmer (Eds.). Heidelberg: Springer, 2014. P. 1–82. (Structure and Bonding; Vol. 52).
- 9 Schiemann O., Prisner T. F. Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy // *Q. Rev. Biophys.* 2007. Vol. 40, No. 1. P. 1–53.
- 10 Bagryanskaya E. G., Krumkacheva O. A., Fedin M. V., Marque S. R. A. Development and application of spin traps, spin probes, and spin labels // *Methods Enzymol.* 2015. Vol. 563. P. 365–396.
- 11 Yang Z., Liu Y., Borbat P., Zweier J. L., Freed J. H., Hubbell W. L. Pulsed ESR dipolar spectroscopy for distance measurements in immobilized spin labeled proteins in liquid solution // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, No. 24. P. 9950–9952.
- 12 Shevelev G. Yu., Krumkacheva O. A., Lomzov A. A., Kuzhelev A. A., Rogozhnikova O. Yu., Trukhin D. V., Troitskaya T. I., Tormyshev V. M., Fedin M. V., Pyshnyi D. V., Bagryanskaya E. G. Physiological-temperature distance measurement in nucleic acid using triarylmethyl-based spin labels and pulsed dipolar EPR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, No. 28. P. 9874–9877.
- 13 Meyer V., Swanson M. A., Clouston L. J., Boratyński P. J., Stein R. A., Mchaourab H. S., Rajca A., Eaton S. S., Eaton G. R. Room-temperature distance measurements of immobilized spin-labeled protein by DEER/PELDOR // *Biophys. J.* 2015. Vol. 108, No. 5. P. 1213–1219.
- 14 Thankamony A. S. L., Wittmann J. J., Kaushik M., Corzilius B. Dynamic nuclear polarization for sensitivity enhancement in modern solid-state NMR // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2017. Vol. 102–103. P. 120–195.
- 15 Singewald K., Lawless M. J., Saxena S. Increasing nitroxide lifetime in cells to enable in-cell protein structure and dynamics measurements by electron spin resonance spectroscopy // *J. Magn. Reson.* 2019. Vol. 299. P. 21–27.
- 16 Klug C. S., Lerch M. T., Feix J. B. Applications of nitroxide spin labels to structural biology // *Nitroxides: Synthesis, Properties and Applications* / O. Ouari, D. Gimes (Eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2021. P. 392–419.
- 17 Morozov D. A., Kirilyuk I. A., Komarov D. A., Goti A., Bagryanskaya I. Yu., Kuratieva N. V., Grigor'ev I. A. Synthesis of a chiral C_2 -symmetric sterically hindered pyrrolidine nitroxide radical via combined iterative nucleophilic additions and intramolecular 1,3-dipolar cycloadditions to cyclic nitrones // *J. Org. Chem.* 2012. Vol. 77, No. 23. P. 10688–10698.
- 18 Khoroshunova Yu. V., Morozov D. A., Kuznetsov D. A., Rybalova T. V., Glazachev Yu. I., Bagryanskaya E. G., Kirilyuk I. A. Synthesis and properties of (1*R*(*S*),5*R*(*S*),7*R*(*S*),8*R*(*S*))-1,8-bis(hydroxymethyl)-6-azadispiro[4.1.4.2]tridecane-6-oxyl: reduction-resistant spin labels with high spin relaxation times // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, No. 14. Art. 11498.
- 19 Sheldrick G. M. SADABS: program for area detector absorption correction. Institute for Inorganic Chemistry, University of Göttingen, Germany, 1996.
- 20 Sheldrick G. M. SHELXT – integrated space-group and crystal-structure determination // *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* 2015. Vol. 71, No. 1. P. 3–8.
- 21 Sheldrick G. M. Crystal structure refinement with SHELXL // *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 2015. Vol. 71, No. 1. P. 3–8.
- 22 Stoll S., Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR // *J. Magn. Reson.* 2006. Vol. 178, No. 1. P. 42–55.
- 23 Bobko A. A., Kirilyuk I. A., Grigor'ev I. A., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: roles for ascorbate and glutathione // *Free Radical Biol. Med.* 2007. Vol. 42, No. 3. P. 404–412.
- 24 Isaev N. P., Melnikov A. R., Lomanovich K. A., Dugin M. V., Ivanov M. Yu., Polovyanenko D. N., Veber S. L., Bowman M. K., Bagryanskaya E. G. A broadband pulse EPR spectrometer for high-throughput measurements in the X-band // *J. Magn. Reson. Open.* 2023. Vol. 14–15. Art. 100092.
- 25 Khoroshunova Yu. V., Morozov D. A., Taratayko A. I., Gladikh P. D., Glazachev Yu. I., Kirilyuk I. A. Synthesis of 1-azaspiro[4.4]nonan-1-oxyls via intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition // *Beilstein J. Org. Chem.* 2019. Vol. 15. P. 2036–2042.
- 26 Greene T. W., Wuts P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*. 3rd ed. New York: Wiley Sons, 1999. P. 65.
- 27 Володарский Л. Б., Григорьев И. А., Диканов С. А., Резников В. А., Щукин Г. И. Имидазолиновые нитроксильные радикалы. Новосибирск: Наука, 1988. С. 202.
- 28 Volodarsky L. B., Reznikov V. A., Ovcharenko V. I. *Synthetic Chemistry of Stable Nitroxides*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 94 p.
- 29 Tikhonov I. V., Sen' V. D., Borodin L. I., Pliss E. M., Golubev V. A., Rusakov A. I. Effect of the structure of nitroxyl radicals on the kinetics of their acid-catalyzed disproportionation // *J. Phys. Org. Chem.* 2014. Vol. 27, No. 2. P. 114–120.
- 30 Bobbitt J. M., Brückner C., Merbouh N. Oxoammonium- and nitroxide-catalyzed oxidations of alcohols // *Organic Reactions* / S. E. Denmark (Ed.). Vol. 74. New York: Wiley Sons, 2009. P. 103–424.
- 31 Mannucci V., Cordero F. M., Piperno A., Romeo G., Brandi A. Diastereoselective synthesis of a collection of new homonucleoside mimetics containing pyrrolo[1,2-*b*]isoxazo-

- line and pyrrolidine rings // *Tetrahedron: Asymmetry*. 2008. Vol. 19, No. 10. P. 1204–1209.
- 32 Paletta J. T., Pink M., Foley B., Rajca S., Rajca A. Synthesis and reduction kinetics of sterically shielded pyrrolidine nitroxides // *Org. Lett.* 2012. Vol. 14, No. 20. P. 5322–5325.
- 33 Karthikeyan G., Bonucci A., Casano G., Gerbaud G., Abel S., Thomé V., Kodjabachian L., Magalon A., Guigliarelli B., Belle V., Ouari O., Mileo E. A bioresistant nitroxide spin label for in-cell EPR spectroscopy: in vitro and in oocytes protein structural dynamics studies // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018. Vol. 57, No. 5. P. 1366–1370.
- 34 Ketter S., Dajka M., Rogozhnikova O., Dobrynin S. A., Tormyshev V. M., Bagryanskaya E. G., Joseph B. *In situ* distance measurements in a membrane transporter using maleimide functionalized orthogonal spin labels and 5-pulse electron-electron double resonance spectroscopy // *J. Magn. Reson. Open*. 2022. Vol. 10–11. Art. 100041.
- 35 Jagtap A. P., Krstic I., Kunjir N. C., Hänsel R., Prisner T. F., Sigurdsson S. Th. Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: analysis of stability in reducing environment // *Free Radic. Res.* 2015. Vol. 49, No. 1. P. 78–85.
- 36 Rajca A., Kathirvelu V., Roy S. K., Pink M., Rajca S., Sarcas S., Eaton S. S., Eaton G. R. A spirocyclohexyl nitroxide amino acid spin label for pulsed EPR spectroscopy distance measurements // *Chem. Eur. J.* 2010. Vol. 16, No. 19. P. 5778–5782.
- 37 Kirilyuk I. A., Polienko Yu. F., Krumkacheva O. A., Strizhakov R. K., Gatilov Yu. V., Grigor'ev I. A., Bagryanskaya E. G. Synthesis of 2,5-bis(spirocyclohexane)-substituted nitroxides of pyrroline and pyrrolidine series, including thiol-specific spin label: an analogue of MTSSL with long relaxation time // *J. Org. Chem.* 2012. Vol. 77, No. 18. P. 8016–8027.