

NITROXYDES 105 : CINÉTIQUE DE RÉDUCTION D'UN RADICAL NITROXYDE PAR L'ACIDE ASCORBIQUE  
EN PRÉSENCE DE  $\beta$ -CYCLODEXTRINE <sup>1a</sup>.

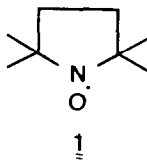
C. EBEL <sup>1b</sup>, K.U. INGOLD <sup>1c</sup>, J. MICHON, A. RASSAT <sup>\*</sup>.

Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité (L.E.D.S.S.)  
associé au CNRS, n° 332, Université Scientifique et Médicale de Grenoble,  
BP n° 68, F 38402, SAINT-MARTIN-d'HERES CEDEX.

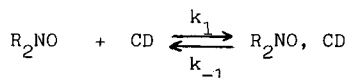
SUMMARY :

The equilibrium constant, K, for association of 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl and  $\beta$ -cyclodextrin has been measured by monitoring by EPR spectroscopy the kinetics of the reduction of nitroxide by the ascorbate anion in the presence of varying concentrations of  $\beta$ -cyclodextrin in phosphate buffered solutions. The values found for K by kinetics are in satisfactory agreement with the values obtained by analysis (spectral simulation) of the high field line of the EPR spectrum under static conditions.

On peut mesurer par Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.) les constantes d'association K entre nitroxyde et cyclodextrine lorsque les spectres des espèces libres et liées sont bien distinctes<sup>2</sup>. Cependant lorsque les spectres sont mal résolus, cette détermination est peu précise. Il nous a paru utile de rechercher une autre méthode de détermination des constantes d'association K en utilisant la cinétique de réduction du tétraméthyl-2,2,5,5-pyrrolidine-oxyle-1 1 par l'acide ascorbique en présence de  $\beta$ -cyclodextrine (CD).

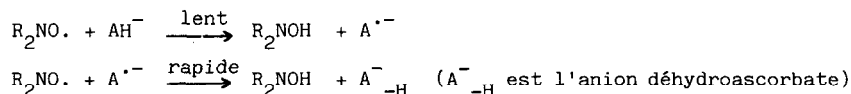


L'équilibre entre nitroxyde et cyclodextrine s'écrit :



CD,  $R_2NO$  et  $R_2NO, CD$  désignent respectivement la  $\beta$ -cyclodextrine, le nitroxyde libre et complexé,  $k_1$ ,  $k_{-1}$  sont les constantes de vitesse de formation et de dissociation du complexe et  $K = k_1/k_{-1}$  la constante d'association correspondante.

Les nitroxydes sont réduits par l'acide ascorbique  $AH_2$  : les produits de la réaction sont l'hydroxylamine  $R_2NOH$  et l'acide déhydroascorbique  $^{3-7}$ . La vitesse dépend du pH car l'agent réducteur est le monoanion ascorbate  $AH^-$ . La réaction est du premier ordre à la fois en nitroxyde et en ascorbate. Un schéma réactionnel possible est le suivant :



Lorsqu'on fait réagir le nitroxyde  $\frac{1}{2}$  ( $10^{-4}M$ ) avec une solution d'acide ascorbique ( $2,5 \cdot 10^{-2}M$ ) dans un tampon phosphate ( $5 \cdot 10^{-2}M$ ,  $pH = 5,55$ ) à  $20^\circ C$ , on observe par R.P.E. une diminution de la hauteur  $h$  pic à pic de la raie à bas champ (par exemple). En portant  $\log h$  en fonction du temps (et pendant plus d'un demi-temps de réaction), on obtient une droite. Comme dans les conditions de l'expérience, la largeur de raie est indépendante de la concentration, ceci est compatible avec une cinétique du pseudo-premier ordre, de constante de vitesse  $k' = 20,4 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  (fig. ). La même réaction effectuée en présence de  $\beta$ -cyclo-dextrine ( $1,42 \cdot 10^{-2}M$ ) montre également une cinétique de pseudo-premier ordre avec une diminution notable de la vitesse totale de réaction,  $k_{obs} = 11,3 \cdot 10^{-4} s^{-1} = 0,55 k'$  (fig. ).

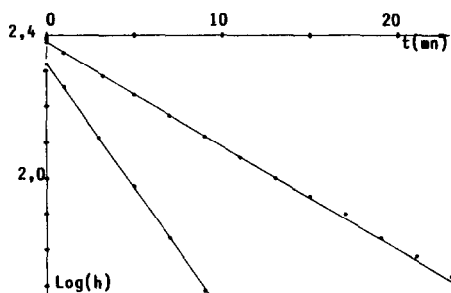
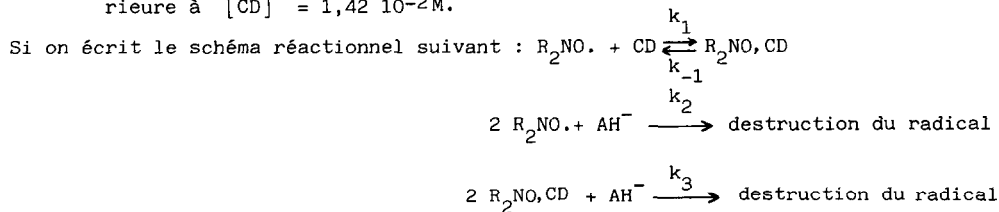


Fig. : Décroissance du signal de R.P.E. du radical  $\frac{1}{2}$  [ $10^{-4}M$ ] au cours de sa réaction avec une solution d'acide ascorbique ( $2,5 \cdot 10^{-2}M$ ) dans un tampon phosphate ( $5 \cdot 10^{-2}M$ ,  $pH = 5,55$ ) à  $20^\circ C$ . La droite supérieure correspond à  $[CD] = 0$ , la droite inférieure à  $[CD] = 1,42 \cdot 10^{-2}M$ .



où  $k_2$  et  $k_3$  sont les constantes de vitesse du premier ordre en nitroxyde libre ou lié et en ascorbate, et si l'équilibre de complexation est rapide, on a :

$$K = \frac{[\text{NOCD}]}{[\text{NO}][\text{CD}]}$$

$$\frac{-d[\text{NO}]_T}{dt} = \frac{-d[\text{NO}]_+}{dt} + \frac{-d[\text{NOCD}]}{dt} = 2k_2[\text{NO}][\text{AH}^-] + 2k_3[\text{NOCD}][\text{AH}^-]$$

où  $[\text{NO}]$ ,  $[\text{NOCD}]$ ,  $[\text{NO}]_T$ ,  $[\text{CD}]$  et  $[\text{AH}^-]$  sont respectivement les concentrations en nitroxyde libre, en nitroxyde complexé, en nitroxyde total, en cyclodextrine et en ascorbate.

Les termes  $2k_2$  et  $2k_3$  apparaissent puisque deux molécules de nitroxyde sont détruites par une molécule d'ascorbate<sup>3</sup>. La combinaison de ces équations donne :

$$\frac{-d[\text{NO}]_T}{[\text{NO}]_T} = \frac{2k_2 K^{-1} + 2k_3[\text{CD}]}{K^{-1} + [\text{CD}]} [\text{AH}^-] dt = k_{\text{obs}} dt \quad \text{d'où} \quad \frac{[\text{AH}^-]}{k_{\text{obs}}} = \frac{K^{-1} + [\text{CD}]}{2k_2 K^{-1} + 2k_3[\text{CD}]}$$

Si la concentration en radical nitroxyde est faible par rapport à celles d'acide ascorbique et de cyclodextrine, les concentrations en CD et en  $\text{AH}^-$  sont égales aux concentrations initiales. Une série de mesures à différentes concentrations de cyclodextrine permet de déterminer la constante d'association : à pH = 5,55, nous avons trouvé  $K = 7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  avec  $k_2 = 4,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $k_3 = 2,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . A pH = 6,85,  $K = 7,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  avec  $k_2 = 4,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $k_3 = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

L'expérience donne donc la constante d'association  $K$  et un ralentissement  $k_3/k_2=0,45$  et  $k_3/k_2=0,57$ . Cette constante d'association peut être déterminée par des méthodes "statiques"<sup>2,8,9</sup>. En présence de  $\beta$ -cyclodextrine le spectre de R.P.E. d'un radical nitroxyde complexé montre un couplage hyperfin entre le noyau d'azote et l'électron plus faible que dans le cas du radical non complexé (attribuable à l'environnement moins polaire de l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine) et un temps de corrélation plus grand (attribuable au ralentissement du mouvement du radical inclus). Dans le cas du radical 1, en présence de  $\beta$ -cyclodextrine, la raie à champ fort du spectre R.P.E. est partiellement résolue. Nous avons donc pu déterminer la constante d'association  $K$  par reconstitution de spectres :  $K = 4,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  à pH = 6,85.

Les valeurs obtenues pour la constante d'association  $K$  par ces deux techniques sont en bon accord : en effet la valeur de  $K$  déterminée pour le di-tert-butyl nitroxyde par des méthodes de simulation spectrale varie entre  $4,94 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  (bande X)<sup>8</sup> et  $1,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  (bande Q)<sup>2</sup>.

Conclusion :

Lorsque les spectres sont bien résolus, la détermination de la constante d'association K par cinétique a donc une précision comparable à celle de reconstitution de spectres ou d'une autre méthode "statique". Lorsque les spectres sont peu résolus, on ne peut attendre une grande précision dans la détermination de K par les méthodes "statiques". Cette méthode cinétique nous semble alors préférable.

REFERENCES ET NOTES

- 1(a) Pour nitroxyde 104 voir : P. REY, A. RASSAT, *Nouv. J. Chim.*, 10, 531 (1983).  
 (b) Adresse actuelle : Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Informatique. Composants d'Entrée-Sortie. Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, BP 85X, F 38041 Grenoble Cedex.  
 (c) Professeur associé à l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1983.
- 2 Voir par exemple (a) J. MARTINIE, J. MICHON, A. RASSAT, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1818 (1975); (b) M. OKAZAKI, K. KUWATA, *J. Phys. Chem.*, 88, 3163 (1984) et Références citées.
- 3 C.M. PALEOS, P. DAIS, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 345 (1977).
- 4 N.M. KOCHERCINSKII, M.G. GOL'DFEL'D, R.M. DAVYDOV, A B. SHAPIRO, *Russ. J. Phys. Chem.*, 46, 1354 (1972).
- 5 E.A. LISSI, M.A. RUBIO, D. ARAYA, G. ZANOCCO, *Int. J. Chem.Kinet.*, 12, 871 (1980).
- 6 N.M. KOCHERGINSKII, N.I. S'YAKSTE, M.A. BERKOVICH, V.M. DEVICHENSKII, *Biophysics*, 26, 449 (1981).
- 7 C.T. CRAESCU, I. BARACU, N. GRECU, L. BUCSA, I. NICULESCU-DUVAZ, *Rev. Roum. Biochim.*, 19, 15 (1982).
- 8 N.M. ATHERTON, S.J. STRACH, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1*, 71, 357 (1975).
- 9 R.M. PATON, E.T. KAISER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 4723 (1970).

(Received in France 15 November 1984)