УДК 547.024, 543.429.22 DOI: 10.15372/KhUR2023514 EDN: JXPMOU

Мобильность триарилметильных радикалов в водно-глицериновых и водно-трегалозных средах

А. Е. РАЙЗВИХ^{1,2}, К. А. ЛОМАНОВИЧ², О. Ю. РОГОЖНИКОВА², Д. В. ТРУХИН², В. М. ТОРМЫШЕВ², Е. Г. БАГРЯНСКАЯ²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск (Россия)

²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск (Россия)

E-mail: lomanovich@nioch.nsc.ru

Аннотация

В последние годы триарилметильные радикалы широко применяются в качестве спиновых зондов и меток, поэтому исследование их свойств представляет большой интерес. С использованием методов стационарного и импульсного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в широком температурном диапазоне изучены магнитно-резонансные свойства меченных изотопом ¹³С триарилметильных радикалов (FT (Finland trityl) и OX063) в растворах "вода – глицерин" и "вода – трегалоза". Измерены их магнитно-резонансные параметры, времена электронной спиновой релаксации и определены времена корреляции вращения при разных температурах. Показано, что в растворе трегалозы радикал ¹³С-FT образует агрегаты, а для радикала ¹³С-OX063 агрегатов не наблюдается.

Ключевые слова: микровязкость, триарилметильный радикал, ЭПР

введение

Триарилметильные радикалы (ТАМ, тритил) широко применяются в качестве спиновых зондов и меток [1, 2]. Они отличаются от других стабильных парамагнитных материалов (например, нитроксильные радикалы), используемых в качестве спиновых зондов и меток, очень малой шириной линии спектра электронного парамагнитрого резонанса (ЭПР) – до 5 мкТл [3], и долгим временем электронной спиновой релаксации в растворах [4]. Благодаря этим свойствам ТАМ используются в качестве спиновых зондов для измерения концентрации кислорода [5, 6], значения рН [7, 8] и концентрации фосфатов [9] *in vitro* и в ЭПР-томографии *in vivo* [10].

Время электронной спиновой релаксации определяет диапазон расстояний, определяемых методом двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР). Обычно такие измерения проводят при низких гелиевых температурах в замороженных растворах "вода – глицирин". В работах [11, 12] было показано, что применение ТАМ в качестве спиновых меток позволяет определять нанометровые расстояния в биополимерах при комнатной температуре. Для того, чтобы диполь-дипольное взаимодействие не усреднялось, измерения проводят в иммобилизованной матрице, а образец либо локализуют на поверхности силикагеля [11, 13], либо в матрице из трегалозы [11, 14].

В работах [15, 16] был синтезирован дейтерированный радикал FT (Finland trityl), меченный изотопом ¹³С по центральному атому углерода, $^{-13}$ C-dFT (рис. 1, *a*). Введение в указанное место изотопа ¹³С приводит к появлению в спектре ЭПР двух линий, соответствующих расщеплению на центральном атоме углерода ¹³С. В отличие от ТАМ с естественным со-



Рис. 1. Структура исследованных триарилметильных радикалов: *a* - ¹³C-FT, б - ¹³C-OX063.

держанием углерода, формы спектров которых несущественно зависят от движения, в ¹³С-ТАМ имеется константа сверхтонкого взаимодействия (СТВ) со значительной анизотропией $(A_{zz} = 5.81 \text{ мTл}, A_{xx} = A_{yy} = 0.607 \text{ мTл})$ и небольшой анизотропией g-тензора ($g_r = g_u = 2.0031$ и g = 2.0027), поэтому спектр ЭПР может быть использован для получения информации о вязкости [15]. Аналогично в работе [17] было предложено применять хлорированный ТАМ (¹³С-РТМТС) для изучения вязкости. Преимущества использования ¹³C-dFT для измерения вязкости в дальнейшем были продемонстрированы в работе [18]. Чувствительность радикала к изменению состава среды позволила оценить микровязкость в биологических жидкостях человека (кровь, ткани) и *in vivo* у мышей. В свою очередь, синтез 99 % обогащенного ¹³С-РТМТС показал схожую чувствительность спектра радикала к его подвижности и различия между значениями времени корреляции в средах разного состава [19]. Применение изотопомера дейтерированного аналога ОХ063 - ¹³С-ОХ071 - для измерения расстояний в белках при помощи ДЭЭР было осуществлено при ортогональном спин-мечении с меткой на основе Cu(II) [20]. Такая метка является биосовместимой и не образует комплексов с альбумином при *in vivo* измерениях вязкости в тканях [16].

Цель настоящей работы — исследование магнитно-резонансных свойств триарилметильных радикалов (13 C-FT и 13 C-OX063), обогащенных 13 C по центральному атому C¹ (см. рис. 1), в вязких растворах "вода – глицерин" и "вода – трегалоза" при температурах 80–320 К методом стационарного и импульсного ЭПР, а также измерение времен электронной спиновой релаксации в Х-диапазоне при низких температурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образцов

Синтез стабильного радикала ¹³С-FT (Finland trityl) выполнен согласно известной методике [21]. Тритил ¹³С-ОХ063 получен по аналогии с немеченным аналогом [22] с использованием ди(н-бутил)карбоната-(карбонил-¹³С) [23] в качестве исходного источника изотопа ¹³С (см. рис. 1). В качестве растворов для исследования спектров ЭПР использовались среды "вода глицерин" (50 : 50 по объему) и "вода – трегалоза" (80:20 по объему), поскольку такие смеси чаще всего применяются для исследования структуры биополимеров в экспериментах по измерению расстояний методом ДЭЭР. Для исключения уширения линий вследствие наличия в растворах атмосферного кислорода производилась низкотемпературная откачка капилляров с образцами с последующим их запаиванием в условиях вакуума (5 · 10⁻² торр).

Приготовление образцов ¹³С-ТАМ для измерений в матрице обезвоженной трегалозы происходило посредством смешивания 200 мг трегалозы, 600 мкл воды, 10 мкл водного раствора тритила (¹³С-FT, ¹³С-ОХ063) с концентрацией 10^{-3} моль/л. Затем смесь высушивалась на протяжении двух дней (10^{-5} торр).

Проведение экспериментов и обработка данных

Стационарные спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ЭПР Х-диапазона Elexsys E-540 (Bruker, Германия). Для контроля температуры в диапазоне 120-320 К использовался температурный контроллер.

Образцы помещались в стеклянные капилляры диаметром 0.5 мм. Запись спектров ЭПР осуществлялась при амплитуде и частоте модуляции внешнего магнитного поля 0.5 Гс и 100 кГц соответственно при мощности СВЧ-излучения, равной 2 мВт. Амплитуда модуляции в случае низких температур равна 2 Гс. Моделирование спектров ЭПР производилось при помощи программного пакета EasySpin [24] в программной среде Matlab, позволяющего проводить симуляцию различных режимов подвижности парамагнитных молекул и определять их магнитно-резонансные параметры (д-тензор, тензор сверхтонкого взаимодействия (СТВ), время корреляции вращения (т.) и др.). Расчет спектров ЭПР осуществлялся в приближении замедленного молекулярного вращения (режим моделирования chili). Моделирование основано на решении стохастического уравнения Лиувилля в базисе вращательных собственных функций. Вращения спинового зонда считалось изотропным. Для моделирования спектров использовались значения *g*-тензора и тензора СТВ ($g_r = 2.0033$, $g_y = 2.0032, \; g_z = 2.0027; \; A_x = A_y = 0.6423, \; A_z = 5.7806),$ ранее измеренные в работах [15, 16, 18]. Определенные нами из наилучшего соответствия расчетных и экспериментальных данных значения д-тензора и тензора СТВ радикалов в замороженных растворах совпадают с опубликованными ранее литературными данными [15].

Регистрация эхо-детектируемых ЭПР-спектров и измерение времен электронной спиновой релаксации осуществлены при помощи импульсного спектрометра, разработанного в НИОХ СО РАН (Новосибирск) [25]. Значения времени электронной спиновой релаксации и спинового эха измерялись посредством импульсных последовательностей $\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -эхо и $\pi-T-\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -эхо, где T и τ – варьируемые задержки в диапазоне от 100 нс до 5 мс. Длительность $\pi/2$ -импульса составляла 20 нс. Добротность резонатора спектрометра (Q) ~80.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стационарные ЭПР-спектры изотопомеров триарилметильных радикалов при различных температурах

На рис. 2 приведены стационарные ЭПРспектры растворов с концентрацией 0.1 ммоль/л ¹³С-FT в матрице "вода – глицерин" (50 : 50) и "вода – трегалоза" (80 : 20) при различных температурах. Видно, что форма спектра ¹³С-FT существенно зависит от температуры.

Форма спектра ЭПР меняется от дублета с изотропной константой СТВ при высоких температурах (320 К) и быстром вращении радикала до полностью иммобилизованного спектра (при 150 К). Можно заметить, что подвижность радикала ¹³С-FT при одной и той же температуре выше для смеси "вода – трегалоза" по сравнению со смесью "вода – глицерин" (при температурах выше 260 К).

Аналогичные измерения были проведены для радикала ¹³С-ОХ063 в среде "вода – глицерин" (50 : 50) (рис. 3). В отличие от ¹³С-FT, благодаря большему количеству гидроксильных групп, радикал ¹³С-ОХ063 характеризуется высокой гидрофильностью и водорастворимостью. Сравнивая спектры ¹³С-FT (см. рис. 2, *a*) и ¹³С-ОХ063 (см. рис. 3), можно видеть существенные различия в их форме. При 280 К в случае ¹³С-ОХ063 уже наблюдается переход между режимами быстрого и медленного движения радикала, в то время как у ¹³С-FT схожая форма спектра наблюдается только при температуре 260 К. Разная подвижность радикалов ¹³С-ОХ063 и ¹³С-FT связана с различием их эффективных радиусов из-за дополнительных заместителей в радикале ¹³С-ОХ063. Кроме того, для ¹³С-ОХ063 дополнительный вклад в изменение времени корреляции вращения может вносить взаимодействие ОН-групп с молекулами воды и глицерина.

Зависимость времени корреляции вращения радикалов от вязкости среды

Сравнение экспериментальных и расчетных спектров ЭПР позволило получить значения времен корреляции вращения τ_c радикалов при разных температурах. На рис. 4, *а* приведена зависимость полученных времен корреляции вращения ТАМ от вязкости (η) водно-глицеринового раствора, измеренной вискозиметром в работе [26].



Рис. 2. Экспериментальные и расчетные спектры ЭПР ¹³С-FT в среде "вода – глицерин" (50 : 50 по объему) (а) и "вода – трегалоза" (80 : 20 по объему) (б) при различных температурах. Обозн. здесь и на рис. 3: температура (К) и время вращательной корреляции (нс), рассчитанные при помощи пакета EasySpin. Параметры моделирования ¹³С-FT: g_{13C-FT} = [2.0033, 2.0032, 2.0028], A_{13C-FT}(мТл) = [0.575, 0.706, 5.711].

На рис. 4, б представлена температурная зависимость радиусов радикалов, рассчитанных с применением уравнения Стокса-Эйнштейна-Дебая. В качестве параметров использовались полученные нами значения τ_c радикалов и известные значения вязкости, измеренные вискозиметром [26].

$\tau_c = 4\pi R^2 \eta / (3kT)$

где η – вязкость среды, R – радиус молекулы, k – константа Больцмана, T – температура.

Видно, что значения радиусов радикалов не зависят от температуры: $R_{_{3}\phi\phi}(^{13}\text{C-FT}) \approx 7.5\pm0.3$ Å; $R_{_{3}\phi\phi}(^{13}\text{C-OX063}) \approx 8.5\pm0.3$ Å (см. рис. 4, б). Полученные значения радиусов согласуются с величинами для $^{12}\text{C-dFT}$ (7.5 Å) и $^{12}\text{C-OX063}$ (8 Å), приведенными в работах [27, 28].

По полученным данным, наблюдается высокая чувствительность формы спектра ЭПР радикалов ¹³С-ОХ063 и ¹³С-FT к вязкости среды. Отметим, что в наших экспериментах вязкость растворителя менялась путем варьирования температуры, в то время как в работах [15, 16] – с помощью варьирования соотношения вода/трегалоза при комнатной температуре.

Сравнение полученных зависимостей времени корреляции с аналогичными результатами для часто используемого нитроксильного радикала TEMPONE [29] демонстрирует в несколько раз большую чувствительность ¹³С-ТАМ к вязкости (см. рис. 4, *a*). Используемые при построении зависимости значения т_с при разных температурах для нитроксильного радикала



Рис. 3. Температурная зависимость стационарных экспериментальных и расчетных спектров ЭПР ¹³С-ОХ063 в среде "вода – глицерин" (50 : 50). Параметры моделирования ¹³С-ОХ063: $g_{^{13}C-OX063} = [2.0033, 2.0032, 2.00275]$, $A_{^{13}C-OX063}$ (мТл) = [0.5714, 0.6147, 5.7092]. Обозн. см. рис. 2.

ТЕМРОNЕ были ранее измерены в работе [29]. Поскольку значения анизотропии СТВ и *g*-тензора для всего ряда нитроксильных радикалов очень близки, можно заключить, что этот вывод будет верен для всего ряда спиновых зондов на основе нитроксильных радикалов. Представляется очевидным, что использование ¹³С-меченных ТАМ в качестве спиновых зондов позволит существенно улучшить точность измерений и интерпретацию спектров при исследованиях микровязкости и локализации спин-меченных соединений в живых организмах.

Спектры ЭПР радикалов ¹³С-FT и ¹³С-ОХ063 в обезвоженной трегалозе

Нами также были получены ЭПР-спектры обоих ТАМ в обезвоженном растворе трегалозы. Экспериментальные спектры кардинально различаются (рис. 5). Для ¹³С-ОХ063 удалось получить типичный спектр ЭПР иммобилизованного радикала. Для ¹³С-FT в спектре наблюдается одна обменно-уширенная линия. Мы связываем это с образованием агрегатов вследствие гидрофобности FT. Как известно, ОХ063 – гидрофильный радикал, в то время как, по литературным данным, FT образует агрегаты при большой концентрации, что было ранее показано для ¹²С-ТАМ [30, 31].

Импульсные измерения ¹³С-FT и ¹³С-ОХ063

Времена электронной спиновой релаксации и эхо-детектируемые ЭПР спектры были изме-

рены для деоксигенированных образцов ¹³С-FT и ¹³С-ОХ063 с концентрациями 0.1 ммоль/л. Полученные формы кривых инверсии восстановления и спада спинового эха аппроксимированы экспонентой и стретч-экспонентой соответственно [32] (табл. 1). В растворе "вода - глицерин" (2 : 1) времена продольной и поперечной релаксации составили T₁ = 2.3/2.6 мс (¹³C-FT/ ¹³С-ОХ063) и $T_2 = 3.7/5.2$ мкс (¹³С-FT/¹³С-ОХ063) при 80 К. Повышение температуры ведет к уменьшению значений времен релаксации (см. табл. 1), что, как известно, обусловлено увеличением мобильности и, соответственно, вклада в релаксацию за счет модуляции анизотропной части СТВ и анизотропии д-фактора [6, 11, 33]. Согласно приведенным данным (см. табл. 1), времена спиновой релаксации для ¹³С-ОХ063 длиннее, чем для ¹³С-FT. Отметим, что для немеченных форм радикалов FT и OX063 ранее наблюдалась аналогичная зависимость [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе приведены результаты исследования методом стационарного и импульсного ЭПР магнитно-резонансных свойств триарилметильных радикалов (¹³C-FT и ¹³C-OX063), обогащенных ¹³C по центральному атому С¹, в вязких водно-глицериновых и водно-трегалозных средах при температурах 80–320 К. Измерены времена электронной спиновой релаксации в Х-диапазоне при низких температурах. Анализ экспериментальных данных позволил получить тем-



Рис. 4. *a* – Зависимость времени корреляции (τ_c) нитроксильного радикала ТЕМРОΝЕ (данные взяты из работы [29]) и триарилметильных радикалов (¹³C-FT и ¹³C-OX063) от вязкости (η) водно-глицеринового раствора, измеренной с помощью вискозиметра в работе [28]; б – зависимость радиуса изотопомеров ¹³C-FT и ¹³C-OX063 от температуры (*T*).



Рис. 5. Спектры ¹³С-FT и ¹³С-OX063 в обезвоженном растворе трегалозы при комнатной температуре. Состав смеси до сушки: 200 мг трегалозы; 600 мкл воды; 10 мкл ТАМ (¹³С-FT или ¹³С-OX063) с концентрацией 1 ммоль/л.

ТАБЛИЦА 1

Времена электронной спиновой релаксации (T_1 и $T_2)$ изотопомеров $^{13}{\rm C-FT}$ и $^{13}{\rm C-OX063}$

Соединение	Температура, К	T ₁ , мс	T ₂ , мкс
¹³ C-FT	80	2.3	3.7
	100	1.0	3.0
¹³ C-OX063	150	0.2	0.9
	80	2.6	5.2
	100	1.0	4.3
	150	0.4	4.1

пературную зависимость времен корреляции вращения обоих радикалов. Обнаружено, что в обезвоженной трегалозе радикал ¹³С-FT образует агрегаты, в то время как для радикала ¹³С-ОХ063 агрегатов не наблюдается. Измеренное время электронной спиновой релаксации радикалов ¹³С-FT и ¹³С-ОХ063 при температуре 80 К несущественно отличается от ¹²С-FT и ¹²С-ОХ063, что делает ¹³С-FT и ¹³С-ОХ063 перспективными для применения в качестве ортогональных меток в исследованиях биомолекул методом двойного электрон-электронного резонанса (Pulse ELectron DOuble Resonance/Double Electron Electron Resonance).

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-14-00219.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Krumkacheva O., Bagryanskaya E. Trityl radicals as spin labels // Electron Paramagnetic Resonance. 2017. Vol. 25. P. 35-60.
- 2 Тормышев В. М., Багрянская Е. Г. Тритильные радикалы: синтез, свойства и применение // Изв. Академии наук. Сер. хим. 2021. № 12. С. 2278-2297.
- 3 Ardenkjær-Larsen J. H., Laursen I., Leunbach I., Ehnholm G., Wistrand L.-G., Petersson J. S., Golman K. EPR and DNP properties of certain novel single electron contrast agents intended for oximetric imaging // J. Magn. Res. 1998. Vol. 133, No. 1. P. 1–12.
- 4 Khramtsov V. V., Zweier J. L. Functional *in vivo* EPR spectroscopy and imaging using nitroxide and trityl radicals / Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds. R. G. Hicks (Ed.). Wiley Online Library, 2010. P. 537–566.
- 5 Liu Y., Villamena F. A., Rockenbauer A., Zweier J. L. Tritylnitroxide biradicals as unique molecular probes for the simultaneous measurement of redox status and oxygenation // Chem. Commun. 2010. Vol. 46, No. 4. P. 628-630.

- 6 Moore W., McPeak J. E., Poncelet M., Driesschaert B., Eaton S. S., Eaton G. R. ¹³C isotope enrichment of the central trityl carbon decreases fluid solution electron spin relaxation times // J. Magn. Res. 2020. Vol. 318. Art. 106797.
- 7 Driesschaert B., Marchand V., Levêque P., Gallez B., Marchand-Brynaert J. A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for measurement of pH by EPR // Chem. Commun. 2012. Vol. 48, No. 34. P. 4049–4051.
- 8 Marchand V., Levêque P., Driesschaert B., Marchand-Brynaert J., Gallez B. *In vivo* EPR extracellular pH-metry in tumors using a triphosphonated trityl radical // Magn. Reson. Med. 2017. Vol. 77, No. 6. P. 2438-2443.
- 9 Bobko A. A., Dhimitruka I., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Fourier transform EPR spectroscopy of trityl radicals for multifunctional assessment of chemical microenvironment // Angewandte Chemie. 2014. Vol. 126, No. 10. P. 2773-2776.
- 10 Baker J. E., Froncisz W., Joseph J., Kalyanaraman B. Spin label oximetry to assess extracellular oxygen during myocardial ischemia // Free Radical Biol. Med. 1997. Vol. 22, No. 1–2. P. 109–115.
- 11 Kuzhelev A. A., Krumkacheva O. A., Shevelev G. Yu., Yulikov M., Fedin M. V, Bagryanskaya E.G. Room-temperature distance measurements using RIDME and the orthogonal spin labels trityl/nitroxide // Phys. Chem. Chem. Phys. 2018. Vol. 20, No. 15. P. 10224-10230.
- 12 Jassoy J. J., Berndhäuser A., Duthie F., Kühn S. P., Hagelueken G., Schiemann O. Versatile trityl spin labels for nanometer distance measurements on biomolecules *in vitro* and within cells // Angewandte Chemie. 2017. Vol. 129, No. 1. P. 183–187.
- 13 Lehrfeld J. Silica gel-catalyzed detritylation of some carbohydrate derivatives // J. Org. Chem. 1967. Vol. 32, No. 8. P. 2544-2546.
- 14 Kuzhelev A. A., Krumkacheva O. A., Timofeev I. O., Tormyshev V. M., Fedin M. V, Bagryanskaya E. G. Electronspin relaxation of triarylmethyl radicals in glassy trehalose // Appl. Magn. Reson. 2018. Vol. 49. P. 1171-1180.
- 15 Poncelet M., Driesschaert B. A ¹³C-labeled triarylmethyl radical as an EPR spin probe highly sensitive to molecular tumbling // Angew. Chem. Int. Ed. 2020. Vol. 132, No. 38. P. 16451-16454.
- 16 Poncelet M., Ngendahimana T., Gluth T. D., Hoblitzell E. H., Eubank T. D., Eaton G. R., Eaton S. S., Driesschaert B. Synthesis and characterization of a biocompatible $^{13}\mathrm{C_1}$ isotopologue of trityl radical OX071 for *in vivo* EPR viscometry // Analyst. 2022. Vol. 147, No. 24. P. 5643–5648.
- 17 Elewa M., Maltar-Strmečki N., Said M. M., El Shihawy H. A., El-Sadek M., Frank J., Drescher S., Drescher M., Mäder K., Hinderberger D. Synthesis and EPR-spectroscopic characterization of the perchlorotriarylmethyl tricarboxylic acid radical (PTMTC) and its ¹³C labelled analogue (¹³C-PTMTC) // Phys. Chem. Chem. Phys. 2017. Vol. 19, No. 9. P. 6688-6697.
- 18 Velayutham M., Poncelet M., Eubank T. D., Driesschaert B., Khramtsov V. V. Biological applications of electron paramagnetic resonance viscometry using a ¹³C-labeled trityl spin probe // Molecules. 2021. Vol. 26, No. 9. Art. 2781.
- 19 Huffman J. L., Poncelet M., Moore W., Eaton S. S., Eaton G. R., Driesschaert B. Perchlorinated triarylmethyl radical 99% enriched ¹³C at the central carbon as EPR spin probe highly sensitive to molecular tumbling // J. Phys. Chem. B. 2021. Vol. 125, No. 27. P. 7380-7387.
- 20 Hasanbasri Z., Poncelet M., Hunter H., Driesschaert B., Saxena S. A new ¹³C trityl-based spin label enables the use of DEER for distance measurements // J. Magn. Reson. 2023. Vol. 347. Art. 107363.
- 21 Kuzhelev A. A., Denysenkov V., Ahmad I. M., Rogozhnikova O. Yu., Trukhin D. V., Bagryanskaya E. G., Tormy-

shev V. M., Sigurdsson S. T., Prisner T. F. Solid-effect dynamic nuclear polarization in viscous liquids at 9.4 T using narrow-line polarizing agents // J. Am. Chem. Soc. 2023. Vol. 145, No. 18. P. 10268–10274.

- 22 Kuzhelev A. A., Trukhin D. V., Krumkacheva O. A., Strizhakov R. K., Rogozhnikova O. Yu., Troitskaya T. I., Fedin M. V., Tormyshev V. M., Bagryanskaya E. G. Roomtemperature electron spin relaxation of triarylmethyl radicals at the X- and Q-bands // J. Phys. Chem. B. 2015. Vol. 119, No. 43. P. 13630-13640.
- 23 Рогожникова О. Ю., Трухин Д. В., Асанбаева Н. Б., Тормышев В. М. Простой и удобный синтез ди(*н*-бутил) карбоната-(*карбонил*-¹³C) // Журн. орган. химии. 2023. Vol. 59, № 6. Р. 790–796.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 Segur J. B., Oberstar H. E. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions // Ind. Eng. Chem. 1951. Vol. 43, No. 9. P. 2117-2120.
- 27 Sanzhaeva U., Poncelet M., Tseytlin O., Tseytlin M., Gencheva M., Eubank T. D., Khramtsov V. V., Driesschaert B. Synthesis, characterization, and application of a highly hydrophilic triarylmethyl radical for biomedical EPR // J. Org. Chem. 2020. Vol. 85, No. 16. P. 10388-10398.
- 28 Owenius R., Eaton G. R., Eaton S. S. Frequency (250 MHz to 9.2 GHz) and viscosity dependence of electron spin relaxation of triarylmethyl radicals at room temperature // J. Magn. Reson. 2005. Vol. 172, No. 1. P. 168-175.
- 29 Sato H., Bottle S. E., Blinco J. P., Micallef A. S., Eaton G. R., Eaton S. S. Electron spin-lattice relaxation of nitroxyl radicals in temperature ranges that span glassy solutions to low-viscosity liquids // J. Magn. Reson. 2008. Vol. 191, No. 1. P. 66-77.
- 30 Ketter S., Gopinath A., Rogozhnikova O., Trukhin D., Tormyshev V. M., Bagryanskaya E. G., Joseph B. *In situ* labeling and distance measurements of membrane proteins in *E. coli* using Finland and OX063 trityl labels // Chem. Eur. J. 2021. Vol. 27, No. 7. P. 2299–2304.
- 31 Poncelet M., Huffman J. L., Khramtsov V. V., Dhimitruka I., Driesschaert B. Synthesis of hydroxyethyl tetrathiatriarylmethyl radicals OX063 and OX071 // RSC Adv. 2019. Vol. 9, No. 60. P. 35073-35076.
- 32 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.
- 33 Chen H., Maryasov A. G., Rogozhnikova O. Yu., Trukhin D. V., Tormyshev V. M., Bowman M. K. Electron spin dynamics and spin-lattice relaxation of trityl radicals in frozen solutions // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. Vol. 18, No. 36. P. 24954-24965.
- 34 Tormyshev V. M., Chubarov A. S., Krumkacheva O. A., Trukhin D. V., Rogozhnikova O. Yu., Spitsyna A. S., Kuzhelev A. A., Koval V. V., Fedin M. V., Godovikova T. S. Methanethiosulfonate derivative of OX063 trityl: A promising and efficient reagent for side-directed spin labeling of proteins // Chem. Eur. J. 2020. Vol. 26, No. 12. P. 2705-2712.