

УДК 29.19.37; 47.03.08

Р. К. Стрижаков, А. А. Кужелев, В. М. Тормышев, Е. Г. Багрянская

*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия*

*Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия*

*Rodion.Strizhakov@tomo.nsc.ru, kuzhelev@nioch.nsc.ru
torm@nioch.nsc.ru, egbagryanskaya@nioch.nsc.ru*

**СПЕКТРОСКОПИЯ ЭПР ТРИТИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ:
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СВЕРХТОНКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
НЕСПАРЕННОГО ЭЛЕКТРОНА С ЯДРАМИ ^{13}C ***

Для ряда тритильных радикалов измерены константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ) неспаренного электрона с ядрами ^{13}C . Результаты систематического анализа констант СТВ показывают пренебрежимо малую их зависимость от растворителя, а также природы и количества заместителей при пара-С атомах ароматических колец, представленных в структуре тритильного радикала.

Ключевые слова: тритильные радикалы, ЭПР, сверхтонкое взаимодействие, спиновые зонды и метки.

Введение

Стабильные триарилметильные радикалы, предложенные недавно [1–4] в качестве альтернативы нитроксильным радикалам, в последние годы стали предметом пристального внимания химиков, биологов и спектроскопистов. По сравнению с нитроксилами ТАМ имеют заметные преимущества по ряду ключевых признаков, а именно аномально большие времена релаксации T_1 и T_2 и характерную для них устойчивость по отношению к окислительно-восстановительным факторам, присутствующим в живых тканях и плазме крови. В сочетании с малой шириной сигнала в спектрах ЭПР эти качества переводят ТАМ в категорию материалов, весьма перспективных для множества приложений, например, в биологии

[5–11], медицине [12–14], аналитической химии [15–17], материаловедении [18], изучении эффекта динамической ядерной поляризации [19; 20].

Особое место в ряду приложений ТАМ занимают исследования структуры биологических макромолекул, в том числе направленные на установление связей между строением и функциональными характеристиками биополимеров. Эти работы базируются на использовании методов сайт-направленного спин-мечения, предоставляющего возможность селективного введения двух спиновых меток в фиксированные положения биологических мишеней. Последующее измерение межспинового расстояния в полученных бирадикалах основано на использовании методов импульсной спектроскопии ЭПР (DEER, DQC, RE). Отметим,

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-14-00922.

Стрижаков Р. К., Кужелев А. А., Тормышев В. М., Багрянская Е. Г. Спектроскопия ЭПР тритильных радикалов: исследование особенностей сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с ядрами ^{13}C // Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Физика. 2016. Т. 11, № 1. С. 100–106.

что спиновые метки на основе ТАМ демонстрируют рекордно большие времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации. Так, при температуре 300 К и проведении ЭПР эксперимента в растворе они могут приближаться к 14 и 26 мкс соответственно [21].

Именно эта особенность ТАМ позволила в серии недавно проведенных исследований поэтапно сместить верхний предел достижимых для надежного измерения межспиновых расстояний до отметки 40–50 Å [22–25]. Отметим, что качество получаемых результатов контролируется множеством факторов, в том числе выбором сигналов, используемых в методиках импульсного ЭПР (DEER, DQC) для микроволновой накачки (pumping) и регистрации спинового эха (observing) соответственно [22; 23].

Последнее означает, что экспериментатор должен располагать надежной информацией о природе множественных сигналов, регистрируемых в спектрах электронного парамагнитного резонанса как бирадикалов, так и исходных спиновых меток на основе ТАМ. В дополнение к вкладам от обменного взаимодействия, типичного лишь для бирадикалов, источником указанной множественности являются СТВ неспаренного электрона с ядрами атомов, обладающих ненулевым магнитным моментом, в том числе с ядрами ^{13}C , представленными в исследуемых объектах на уровне природной распространенности (1,08–1,12 атомных процентов) [24; 25].

Мы провели анализ литературных источников в поисках информации о проявлении вызванного ядрами ^{13}C сверхтонкого взаимодействия в ЭПР-спектрах тритильных ра-

дикалов. Тогда как для тритильных радикалов с простой структурой константы СТВ с ^{13}C известны по меньшей мере с 1960-х гг. [26; 27], для так называемых финляндских тритильных радикалов (см. [1–4] и рис. 1), учитывая их относительную новизну, константы СТВ неизвестны. Настоящая работа устраняет указанный пробел. Нами были измерены константы СТВ с ядрами ^{13}C для ряда тритильных радикалов. Приведены результаты систематического анализа влияния природы заместителей в тритильном радикале и растворителя на константы СТВ.

Экспериментальная часть

Детали синтеза изученных в настоящей работе ТАМ были опубликованы ранее [23]. Структуры изученных объектов отличались заместителями R_1 , R_2 и R_3 (см. рис. 1), природа которых указана в табл. 1.

Запись ЭПР-спектров тритильных радикалов. ЭПР-спектры непрерывной развертки были записаны на ЭПР-спектрометре ЕМХ X-диапазона с варьированием растворителя в зависимости от вида изучаемого ТАМ. Наряду с водными буферными растворами с различными значениями рН нами использовались органические растворители. Условия записи ЭПР спектров: частота 9,7 ГГц; мощность 10,11 мВт; частота модуляции 100 кГц; амплитуда модуляции 0,01–0,03 Гс, в отдельных случаях 2 Гс; время преобразования 163,8–327,7 мс; время записи спектра 671–2684 с; разрешение 8192 точки; количество накоплений варьировалось в интервале 1–16.

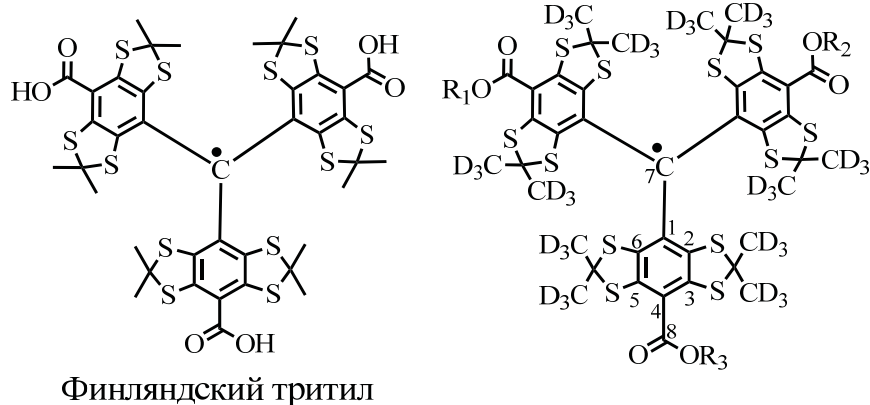


Рис. 1. Структура «финляндского» тритила. Структура дейтеропроизводных «финляндского» тритила с различными заместителями R_1 , R_2 , R_3 и принятой нумерацией атомов углерода

Таблица 1

Расшифровка заместителей в радикалах dCT, dAMT-1-3 и dMET


Название	R ₁	R ₂	R ₃
dCT	H	H	H
dAMT-1	H	H	-CH ₂ OCOCH ₃
dAMT-2	H	-CH ₂ OCOCH ₃	-CH ₂ OCOCH ₃
dAMT-3	-CH ₂ OCOCH ₃	-CH ₂ OCOCH ₃	-CH ₂ OCOCH ₃
dMET	-H ₂ C-H ₂ C-N 		

Таблица 2

Магнитно-резонансные параметры исследуемых тритильных радикалов *

	g-фактор ± 0,00005	a _{C7}	a _{C1}	a _{C2,6}	a _{C4}	a _{C3,5}	a _{C8}	a _{H1}	a _{H2}
			Гс, ± 0,03					мГс, ± 2	
dCT в воде, pH 7,2	2,00260	-	11,2	9,0	3,3	2,4	1,3	-	-
dAMT-1 в метаноле	2,00264	-	11,1	8,9	3,3	2,3	1,3	37	47
dAMT-2 в бензоле	2,00278	23,5	11,0	8,8	3,0	1,8	1,4	55	45
dAMT-3 в бензоле	2,00271	-	11,1	8,8	3,0	2,2	1,4	42	55
dAMT-3 в дихлорметане	2,00271	-	11,1	8,8	3,0	2,2	1,4	42	55
dMET в воде pH 7,1	2,00267	-	11,0	8,8	3,4	2,5	-	91	116

* Значения констант СТВ с ядрами ¹³C измерены напрямую по спектрам ЭПР (кроме a_{C8}), подтверждено моделирование спектров. Значения констант СТВ с ядрами ¹H и g-факторы вычислены с помощью моделирования.

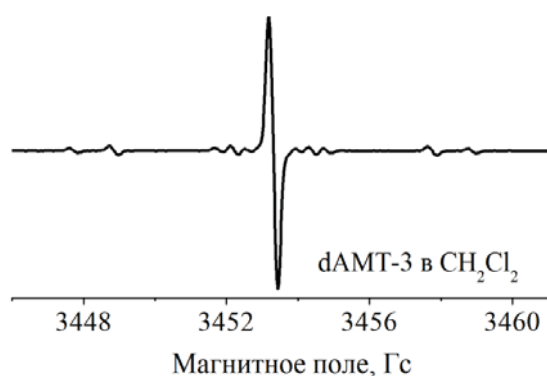


Рис. 2. Общий вид спектра ЭПР тритильного радикала dAMT-3. Спектры остальных радикалов, содержащих сложноэфирные группы при атомах C⁴, имеют аналогичный вид

Процедура «заморозка – откачка». Чтобы предотвратить уширение линий ЭПР в образцах тритильных радикалов, было проведено удаление кислорода из растворов путем многократного повторения циклов «заморозка – откачка – оттаивание». Для каждого образца было проверено, что дальнейшая откачка не отражается на временах релаксации T_1 и T_2 .

Моделирование спектров тритильных радикалов. Симуляция ЭПР-спектров проводилась с использованием пакета программ Matlab и Easyspin [28]. Варьированию подвергались следующие параметры: g-фактор, Гауссовый и Лоренцевский вклады в ширину линии ЭПР для каждой спиновой системы, константы СТВ с ядрами углерода и водорода.

Обсуждение результатов

В качестве объекта исследования мы выбрали серию производных трис(8-карбоксил-2,2,6,6-тетраметилбензо[1,2-d;4,5-d']бис[1,3]дитиол-4-ил)метила, более известного под условным названием «финляндский» тритил (см. рис. 1). Полное дейтерирование по позициям 36 протонов двенадцати экзотических метильных групп приводит к получению дейтероаналога «финляндского» тритила dCT (см. рис. 1, $R_1 = R_2 = R_3 = H$), в ЭПР-спектре которого наблюдается единственный интенсивный сигнал, регистрируемый в виде чрезвычайно узкого синглета шириной 39 мГс.

Малая ширина сигнала в сочетании с отсутствием в структуре изучаемого тритила атомов H, N, F или P, способных вызывать СТВ с неспаренным электроном, приводят к предельному упрощению спектра. Это позволяет с высокой надежностью регистрировать сигналы спутников от ядер ^{13}C , измерять их интенсивность и соответствующие константы СТВ, проводить их отнесение. Распределение интенсивностей спутниковых сигналов выражается последовательностью 3:6:3:6:3 (сигналы перечислены в порядке их удаления от центрального синглета).

Очевидно, что указанное распределение отражает количества атомов углерода, представленных в молекуле тритила в конкретном структурном контексте: 3 атома C^8 : 6 $C^{3,5}$: 3 C^4 : 6 $C^{2,6}$: 3 C^1 (при отнесении сигналов использованы рекомендации работы [29]). В табл. 2 приведены магнитно-резонансные параметры радикалов: g -фактор и константы СТВ с атомами углерода a_C . Нумерация атомов углерода соответствует приведенной на рис. 1.

Переход к сложным эфирам приводит к некоторому усложнению спектра ЭПР: в кислородсодержащих образцах регистрируются синглетные сигналы, уширенные до 100–200 мГс вследствие неразрешенного взаимодействия с протонами эфирных $COOCH_2$ -групп (рис. 2, 3).

Однако удаление кислорода приводит к регистрации хорошо разрешенных спектров, позволяющих выявить сверхтонкую их структуру (рис. 4), вызванную присутствием метиленовых протонов, и измерить соответствующие константы a_H (см. табл. 2).

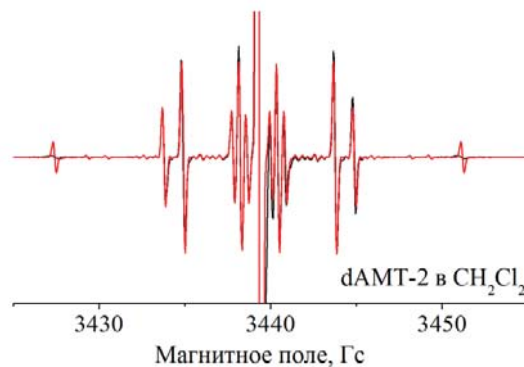


Рис. 3. Увеличенный по оси ординат в 20 раз спектр dAMT-2 (черная линия) и его моделирование (красная линия). Кроме расщеплений на одном атоме ^{13}C можно также увидеть и групповые расщепления с очень слабой интенсивностью, связанной с малой вероятностью реализации СТВ на двух и более ядрах ^{13}C ($< 0,01\%$)

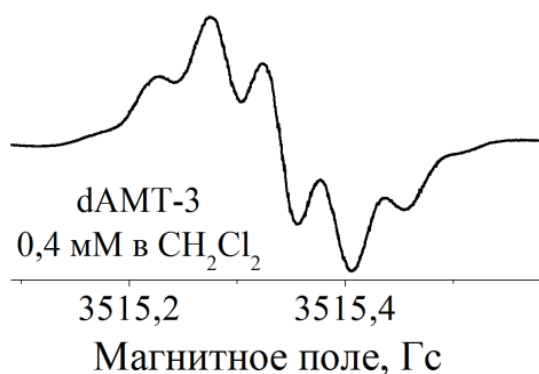


Рис. 4. Сверхтонкая структура центральной линии спектра dAMT-3, связанная со сверхтонким расщеплением на парах протонов ацетоксиметоксильных групп в боковых заместителях

Анализ констант СТВ с ядрами ^{13}C показывает, что последовательный переход от незамещенной формы дейтеропроизводного «финляндского» тритила (трикислота dCT) к моноэфиру dAMT-1, диэфиру dAMT-2 и, наконец, к триэфирам dAMT-3 и dMET, не приводит к сколько-нибудь значимому изменению констант a_C . Аналогично на значения констант СТВ с ядрами углерода не оказывает влияние природа спиртовой части сложного эфира и выбранного растворителя (см. табл. 2). Заметим, что полярность последнего изменялась в широких пределах.

Вместе с тем на примере ряда dAMT-1–3 (моноэфир, диэфир, триэфир) просматрива-

ется зависимость констант a_H от количества введенных эфирных групп. Обращает на себя внимание и эффект магнитной неэквивалентности метиленовых протонов, представленных в COOCH_2 -группах. Представляется разумным связать указанную неэквивалентность с диастереотопной природой метиленовых протонов, которая вызвана хиральным характером ТАМ, подтвержденным недавними исследованиями [30; 31].

Особое место занимают спутниковые сигналы, соответствующие сверхтонкому взаимодействию с ядром ^{13}C центрального атома углерода. В противоположность спутникам от взаимодействия с периферическими атомами углерода эти сигналы уширены до такой степени, что достоверного их наблюдения удалось добиться лишь для диэфира dAMT-2, причем при большом количестве накоплений. Это уширение может быть связано с увеличенным вкладом членов [g:g] и [A:A] в выражении для релаксации T_2 .

Таким образом, на примере представительного ряда ТАМ в настоящей работе показано, что константы СТВ с ядрами ^{13}C практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру по карбоксильным группам последнего. Исследование показало отсутствие заметного влияния растворителя на величины a_H . Обнаружена аномально большая ширина спутниковых линий, соответствующих СТВ с ядром ^{13}C центрального атома углерода тритильного радикала.

Список литературы

1. Anderson S., Golman K., Rise F., Wikström H., Wistrand L. U.S. 1996. Patent 5530140.
2. Ardenkjaer-Larsen J., Leunbach I. PCT Int. Appl. wo/9709633. 1997.
3. Andersson S., Radner F., Rydbeck A., Servin R., Wistrand L.-G. U.S. 1998. Patent 5728370.
4. Thaning M. PCT Int. Appl. wo/9839277 1998.
5. Khan N., Swartz H. Measurements in vivo of parameters pertinent to ROS/RNS using EPR spectroscopy // *Mol. Cell. Biochem.* 2002. Vol. 234. P. 341–357.
6. Kuppusamy P., Wang P., Chzhan M., Zweier J. High resolution electron paramagnetic resonance imaging of biological samples with a single line paramagnetic label // *Magn. Reson. Med.* 1997. Vol. 37. P. 479–483.
7. Liu Y., Villamena F., Song Y., Sun J., Rockenbauer A., Zweier J. Synthesis of ^{14}N - and ^{15}N -labeled Trityl-nitroxide Biradicals with Strong Spin–Spin Interaction and Improved Sensitivity to Redox Status and Oxygen // *J. Org. Chem.* 2010. Vol. 75. No. 22. P. 7796–7802.
8. Halevy R., Tormyshev V., Blank A. Microimaging of Oxygen Concentration near Live Photosynthetic Cells by Electron Spin Resonance // *Biophysical Journal.* 2010. Vol. 99. No. 3. P. 971–978.
9. Liu Y., Villamena F., Sun J., Wang T., Zweier J. Esterified trityl radicals as intracellular oxygen probes // *Free Radical Biol. Med.* 2009. Vol. 46. No. 7. P. 876–883.
10. Liu Y., Villamena F., Sun J., Xu Y., Dhimitruka I., Zweier J. Synthesis and Characterization of Ester-Derivatized Tetrathiatriarylmethyl Radicals as Intracellular Oxygen Probes // *J. Org. Chem.* 2008. Vol. 73. No. 4. P. 4190–4197.
11. Rizzi C., Samouilov A., Kutala V., Parinandi N., Zweier J., Kuppusamy P. Application of a trityl-based radical probe for measuring superoxide // *Free Radical Biol. Med.* 2003. Vol. 35. No. 12. P. 1608–1618.
12. Elas M., Hleihel D., Barth E., Haney C., Ahn K.-H., Pelizzari C., Epel B., Kocherginsky M., Weichselbaum R., Halpern H. Where It's at Really Matters: In Situ In Vivo Vascular Endothelial Growth Factor Spatially Correlates with Electron Paramagnetic Resonance pO_2 Images in Tumors of Living Mice // *Mol. Imaging Biol.* 2011. Vol. 13. No. 6. P. 1107–1013.
13. Elas M., Ahn K.-H., Parasca A., Barth E., Lee D., Haney C., Halpern H. Electron Paramagnetic Resonance Oxygen Images Correlate Spatially and Quantitatively with Oxylite Oxygen Measurements // *Clin. Cancer Res.* 2006. Vol. 12. P. 4209–4217.
14. Elas M., Williams D., Parasca A., Mailer C., Pelizzari C., Lewis M., River J., Karczmar G., Barth E., Halpern H. Quantitative tumor oxymetric images from 4D electron paramagnetic resonance imaging (EPRI): Methodology and comparison with blood oxygen level-dependent (BOLD) MRI // *Magn. Reson. Med.* 2002. Vol. 49. No. 4. P. 682–691.
15. Driesschaert B., Marchand V., Leveque P., Gallez B., Marchand-Brynaert J. A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for

measurement of pH by EPR // *Chem. Comm.* 2012. Vol. 48, P. 4049–4051.

16. Bobko A., Dhimitruka I., Komarov D., Khramtsov V. Dual-Function pH and Oxygen Phosphonated Trityl Probe // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84. No. 14. P. 6054–6060.

17. Dhimitruka I., Bobko A., Hadad C., Zweier J., Khramtsov V. Synthesis and Characterization of Amino Derivatives of Persistent Trityl Radicals as Dual Function pH and Oxygen Paramagnetic Probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130. No. 32. P. 10780–10787.

18. Talmon T., Shtirberg L., Harneit W., Rogozhnikova O., Tormyshev V., Blank A. Molecular diffusion in porous media by PGSE ESR // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. Vol. 12. P. 5998–6007.

19. Leggett J., Hunter R., Granwehr J., Pánek R., Perez-Linde A., Horsewill A., McMaster J., Smith G., Koeckenberger W. A dedicated spectrometer for dissolution DNP NMR spectroscopy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. Vol. 12. P. 5883–5892.

20. Ardenkjaer-Larsen J., Fridlund B., Gram A., Hansson G., Hansson L., Lerche M., Servin R., Thaning M., Golman K. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100. No. 18. P. 10158–10163.

21. Kuzhelev A., Trukhin D., Krumkacheva O., Strizhakov R., Rogozhnikova O., Troitskaya T., Fedin M., Tormyshev V., Bagryanskaya E. Room-Temperature Electron Spin Relaxation of Triarylmethyl Radicals at the X- and Q-Bands // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119. No. 43. P. 13630–13640.

22. Shevelev G., Krumkacheva O., Kuzhelev A., Lomzov A., Rogozhnikova O., Trukhin D., Troitskaya T., Tormyshev V., Fedin M., Pyshnyi D., Bagryanskaya E. 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.

23. Shevelev G., Krumkacheva O., Lomzov A., Kuzhelev A., Trukhin D., Rogozhnikova O., Tormyshev V., Fedin M., Pyshnyi D., Bagryanskaya E. Triarylmethyl Labels: Toward Improving the Accuracy of EPR Nanoscale Distance Measurements in DNAs // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119. No. 43. P. 13641–13648.

24. Yang Z., Liu Y., Borbat P., Zweier J., Freed J., Hubbell W. 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.

25. Trukhin D., Yang Z., Lopez C., Rogozhnikova O., Tormyshev V., Halpern H., Hubbell W. Measuring Long-Range Distances in Proteins at Physiological Temperature Using Saturation Recovery EPR Spectroscopy. // EFMC/ASMC15. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry. Rehovot, Israel. November 15–18. 2015. P. 153.

26. Mohos B., Tudos F., Jokay L. ESR investigation of the triphenylmethyl radical. // *Physics Letters A.* 1967. Vol. 24. No. 6. P. 310–312.

27. Schreiner K., Berndt A., Baer F. Spin density distribution and stereochemistry of triphenylmethyl radical in solution // *Mol. Phys. International.* 1973. Vol. 26. No. 4.

28. 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.

29. Sabacky M., Johnson C., Smith R., Gutowsky H., Martin J. Triarylmethyl Radicals. Synthesis and Electron Spin Resonance Studies of Sesquioxanthryl Dimer and Related Compounds // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. No. 9. P. 2054–2058.

30. Driesschaert B., Robiette R., Le Duff C., Collard L., Robeyns R., Gallez B., Marchand-Brynaert J. Configurationally Stable Tris (tetrathioaryl) methyl Molecular Propellers // *J. Eur. J. Org. Chem.* 2012. No. 33. P. 6517–6525.

31. Driesschaert D., Robiette R., Lucacconi F., B. Gallez B., Marchand-Brynaert J. Chiral properties of tetrathiatriarylmethyl spin probes // *Chem. Comm.* 2011. Vol. 47. P. 4793–4795.

Список сокращений

ТАМ – триарилметильный радикал
DEER – двойной электрон-электронный резонанс (double electron-electron resonance)
DQC – двойная квантовая когеренция (double quantum coherence)
RE – усиление релаксации (relaxation enhancement)
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
СТВ – сверхтонкое взаимодействие

R. K. Strizhakov, A. A. Kuzhelev, V. M. Tormyshev, E. G. Bagryanskaya

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of SB RAS
6 Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

*Novosibirsk State University
2 Pirogov Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

*Rodion.Strizhakov@tomo.nsc.ru, kuzhelev@nioch.nsc.ru
torm@nioch.nsc.ru, egbagryanskaya@nioch.nsc.ru*

**EPR SPECTROSCOPY OF TRITYL RADICALS:
SPECIFICITIES OF HYPERFINE INTERACTION
OF AN UNPAIRED ELECTRON WITH ^{13}C NUCLEI**

The constants of hyperfine coupling between an unpaired electron and natural occurrence ^{13}C have been registered for the representative series of trityl radicals. The analysis of hyperfine a_c constants revealed their small if any dependence both on solvent, and origin and number of substituents attached at *para*-C atoms of TAM aromatic rings.

Keywords: trityl radicals, EPR, hyperfine coupling, spin probes and labels.