

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА АКТИВИЗАЦИИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА

© 2023 г. В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев*, К. В. Шевченко, Н. Ф. Мясоедов

*Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2.*

**e-mail: nagaev@img.ras.ru*

Поступила в редакцию 10.01.2023, после доработки 18.04.2023, принята к публикации 19.04.2023

Изучено влияние различных факторов на эффективность введения дейтерия в 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин и 3-(N-салицил)пропаноил-L-гистидин. В качестве источника дейтерия использовали тяжелую воду. Показано, что содержание атомов дейтерия в веществе можно увеличить, проведя предварительную обработку реакционной смеси газообразным дейтерием. Новый подход открывает дополнительные возможности как при получении высокомеченных препаратов при введении изотопов водорода в органические соединения, так и в теоретическом плане для более глубокого понимания участия в этом процессе активированных частиц дейтерия или трития, сольватированных на носителе и в пуле вещества.

Ключевые слова: дейтерий, синтез, меченые соединения, активация изотопного обмена.

DOI: 10.31857/S0033831123040068, **EDN:** ILGTPL

Существуют различные методы активации изотопного обмена с тритиевой и дейтериевой водой. Если соединения стабильны при высоких рН, подвижность связей С–Н повышают добавлением оснований. В качестве оснований используют различные реагенты, например, метилат натрия [1], диазабициклоундецен [2], триэтиламин [3], бутиллитий [4] и др. Изотопный обмен с тритиевой и дейтериевой водой можно проводить и при кислотном катализе ($^3\text{HNO}/\text{AlCl}_3$, $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{BF}_3$, HCl , трифторуксусная кислота и др.) [5, 6]. Кислоты Льюиса также удобны для повышения эффективности изотопного обмена с тритиевой водой. Смесь $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}/^3\text{H}_2\text{O}$ или $\text{BF}_3/^3\text{H}_3\text{PO}_4$ позволяет получить молярную радиоактивность ароматических соединений, составляющую от 40% до 60% относительно молярной радиоактивности тритиевой воды [7, 8].

Несмотря на множество подходов для активации изотопного обмена, они часто не дают заметного выигрыша при их использовании. Поэтому поиск и разработка новых методов активизации изотопного обмена не сняты с повестки дня.

Системы, которые используются при введении изотопов водорода, являются многокомпонентны-

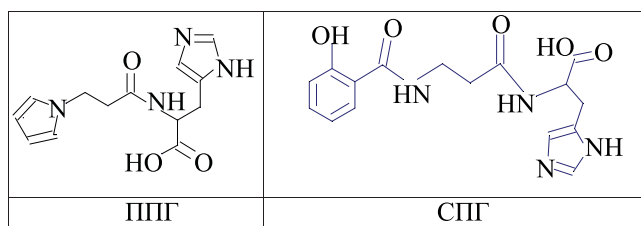
ми [9]. Определение влияния того или иного изменения на эффективность включения метки требует проведения целой серии экспериментов. Поэтому предварительные исследования целесообразно проводить с использованием дейтерия. И только при получении доказательств синергизма при активации изотопного обмена с дейтериевой водой с привлечением процессов, связанных, например, со спилловером изотопов водорода в твердофазных реакциях, можно рассчитывать на успех и при введении трития.

Для проведения этого исследования использовали 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин (ППГ) и 3-(N-салицил)пропаноил-L-гистидин (салицил- β -аланил-L-гистидин, СПГ), обладающие целым рядом важных биологических характеристик. За счет пиррольного фрагмента в ППГ повысилась устойчивость β -аланил-L-гистидина (карнозина) к действию сывороточной карнозиназы, которая присутствует в кровяном русле. В результате образовалось биологически активное соединение, обладающее не только антиоксидантной и нейропротекторной активностью, подобной карнозину, но и рядом свойств, связанных со второй компонентой

нового соединения – пиррола. Этот ароматический пятичленный азотистый гетероцикл используется при синтезе жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов РФ [10–14].

Второе соединение – СПГ, полученное путем реакции конденсации салициловой кислоты и карнозина, сочетает в себе полезные свойства этих двух терапевтических активных молекул. СПГ обладает высокой антиагрегантной, супероксид-перехватывающей, антиоксидантной и цито- и нейропротекторной активностью и способен обеспечивать защиту слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта от побочных повреждающих эффектов, присущих нестероидным противовоспалительным препаратам [11, 15, 16].

Целью данной работы была разработка нового метода активизации изотопного обмена для получения высокоомеченных дейтерием ППГ и СПГ:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, растворители, реагенты – коммерческие препараты. ППГ и СПГ любезно предоставлены С.Л. Стволинским (Научный центр неврологии, Москва). Для анализа реакционных смесей использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Перед получением масс-спектров вещества растворяли в протонных растворителях для удаления подвижных атомов дейтерия из их молекул.

ВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм). Температура колонки 35°C. Длина волны 210 нм. Элюент А – 0.1% уксусная кислота, элюент Б – метанол. Скорость подачи элюента 0.2 мл/мин.

Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл

в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ.

Приготовление реакционной смеси [9]. Раствор 20 мг ППГ или СПГ в 0.2 мл метанола наносили на 400 мг Al_2O_3 . Колбу помещали на роторный испаритель и упаривали метанол при вращении и пониженном давлении при 30°C. Затем смесь лиофилизировали. Сухой остаток механически растирали с 100 мг 5% Pd/Al_2O_3 и вновь лиофилизировали. Порцию смеси помещали в стеклянную ампулу и проводили эксперименты.

Варианты проведения экспериментов (табл. 1, 2). Смесь (5% $Pd/Al_2O_3-Al_2O_3$ –вещество 5 : 20 : 1), содержащую 0.25 мг вещества, переносили в ампулу, добавляли 150 мкл дейтерированной воды, продували аргоном, затем ампулу запаивали. После реакции вещество смывали с катализатора водным метанолом ($MeOH-H_2O$ 1 : 1). Фильтраты упаривали, остаток растворяли в 0.25 мл метанола. Экстракт анализировали методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Ту же смесь помещали в ампулу, вакуумировали, заполняли газообразным дейтерием до давления 400 гПа и выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Затем в ампулу добавляли 150 мкл дейтерированной воды, продували аргоном и запаивали. Выделение и анализ вещества проводили, как описано выше.

100 мкл раствора ППГ или СПГ в метаноле (2.5 мг/мл) вносили в ампулу, испаряли метанол под вакуумом, добавляли 150 мкл дейтерированной воды, ампулу продували аргоном и запаивали. Реакцию вели 10–60 мин. После реакции воду удаляли лиофилизацией, вещество растворяли в метаноле. Анализ вещества проводили, как описано выше. При этом оказалось, что реакцию изотопного обмена в случае ППГ оптимально проводить при 150°C, а в случае СПГ при 190°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Есть данные, что при выдерживании катализатора в атмосфере газообразного дейтерия или трития на поверхности носителя образуются катионы изотопа водорода, которые при взаимодействии с молекулами воды генерируют кислотные центры.

Таблица 1. Изотопный обмен дейтериевой воды с ППГ при 150°C (15 мин)

Параметры реакции	D ₂ O	Катализатор	
		5% Pd/Al ₂ O ₃ ^a	5% Pd/Al ₂ O ₃ ^b
ΣD	4.39	4.53	6.78
Выход	89	96	63

^aБез предварительной обработки D₂ смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ (5 : 20 : 1).

^bПредварительная обработка D₂ (2 ч, давление 400 гПа) 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ.

Возможность такого процесса подтверждена квантово-химическими расчетами [17].

Сила таких кислотных центров (кислот Бренстеда) на поверхности носителя (в данном случае Al₂O₃) может быть решающим фактором, определяющим эффективность взаимодействия молекул соединения с катионами изотопов водорода. Образование положительно заряженных кластеров [Al³⁺O²⁻]⁺ или [Al³⁺(OH)₂]⁺ смоделировано вычислительными методами [18–20]. При этом оказалось, что реакция изотопного обмена с активированным на кислотных центрах Бренстеда водородом имеет низкий активационный барьер, поэтому ее протекание наиболее вероятно.

Таким образом, есть сведения, показывающие, что кислотные центры, содержащие активированные изотопы водорода, должны инициировать дополнительное включение метки в препарат при изотопном обмене с дейтериевой или тритиевой водой.

Изотопный обмен между смесью 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ (5 : 20 : 1) и дейтериевой водой проводили и без активации катализатора газообразным дейтерием, и при использовании комбинации твердофазного и жидкофазного методов нагреванием с дейтериевой водой смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ после выдерживания ее в атмосфере газообразного дейтерия (табл. 1) [21]. Для оценки преимущества при использовании новой методики в ППГ метку вводили изотопным обменом ППГ с дейтериевой водой без катализатора. Как видно из табл. 1, изотопный обмен между ППГ и D₂O при использовании не активированного катализатора практически не отличается от результата без использования катализатора. В то же время предварительно активированная газообразным дейтерием смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ значитель-

Таблица 2. Зависимость изотопного обмена между СПГ и дейтериевой водой и выхода [D]СПГ от времени проведения реакции при 190°C

Параметры реакции	Время, мин						
	10 ^a	10 ^b	10 ^b	20	30	45	60
ΣD	1.72	2.17	6.21	6.74	7.33	7.39	7.48
Выход	65	73	64	51	46	35	25

^aИзотопный обмен между СПГ и дейтериевой водой без катализатора.

^bНе активированная смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–СПГ.

^cРеакция с активированной смесью 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–СПГ.

но повышала эффективность изотопного обмена. При этом установлено, что в атмосфере дейтерия при комнатной температуре включения дейтерия в ППГ не происходит.

Такой результат можно объяснить следующим образом. Во всех трех методиках эксперимента ППГ, хорошо растворимый в воде, переходит в дейтериевую воду. Следовательно, катализатор после добавления дейтериевой воды оказывается отделенным от ППГ и дальнейшего участия в процессе включения дейтерия не принимает. Вследствие этого включение дейтерия за счет изотопного обмена при использовании не активированного катализатора не отличается от включения дейтерия при изотопном обмене между дейтериевой водой и ППГ. Такой же результат можно было бы ожидать и в случае, если кислотные центры, возникающие при предварительном выдерживании 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ в атмосфере дейтерия, образовывались только на поверхности катализатора. Но эксперимент показал, что включение дейтерия значительно увеличивается. Очевидно, это можно объяснить, только если кислотные центры, возникающие при предварительном выдерживании 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ в атмосфере дейтерия, образовывались и в пуле ППГ.

Другими словами, при растворении ППГ в D₂O вещество переходит в раствор и сольватированные на молекулах ППГ активированные частицы дейтерия взаимодействуют с дейтериевой водой, активируя изотопный обмен.

Это явление служит еще одним доказательством того, что эффективность включения дейтерия или трития часто больше зависит от способности вещества, нанесенного на поверхность катализатора, сольватировать активированные частицы изотопа

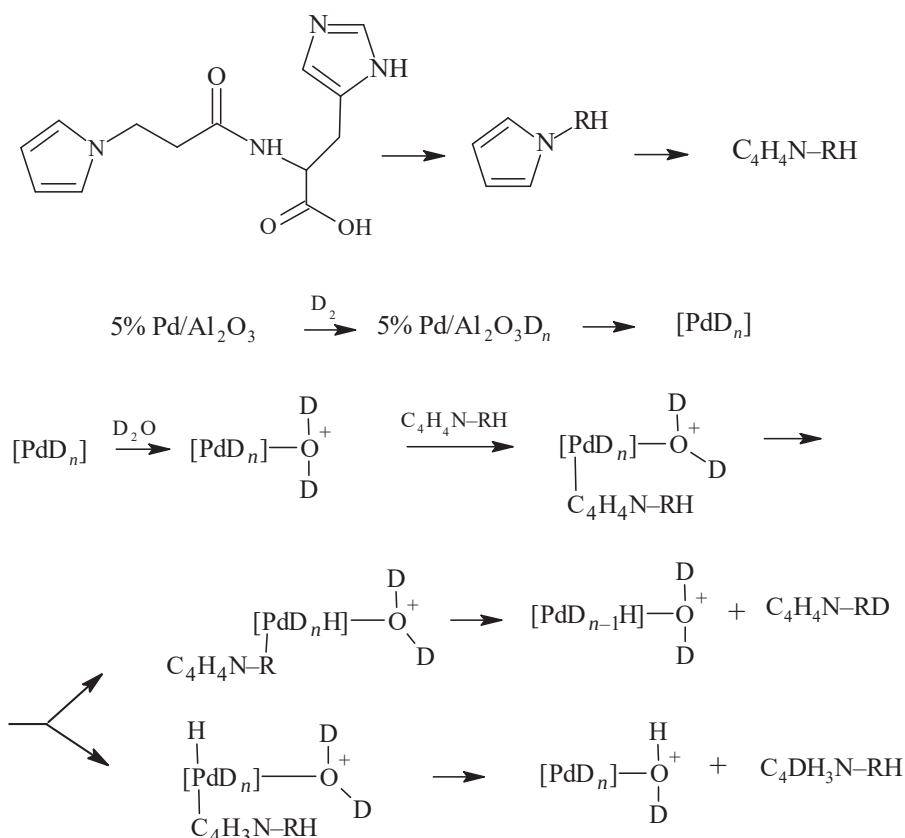


Схема 1. Включение дейтерия изотопным обменом с дейтериевой водой при наличии кислотных центров на катализаторе [21].

водорода, чем от свойств катализатора и интенсивности спилловера водорода.

Имеется целый ряд публикаций, где приводятся варианты изотопного обмена с дейтериевой водой на гетерогенных катализаторах (схема 1) [22, 23]. Но эта схема работает, когда происходит контакт между катализатором и молекулами вещества, как правило, при перемешивании. Поэтому процесс, позволяющий объяснить повышение изотопного обмена при использовании 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–ППГ, предварительно активированного газообразным дейтерием, можно представить в виде схемы 2. Согласно этой схеме, дейтерий поступает в ППГ не только из дейтериевой воды, но и за счет активированных частиц дейтерия, сольватированных молекулами ППГ.

Аналогичные исследования проведены с использованием СПГ. Изотопный обмен с дейтериевой водой при 190°C оказался оптимальным для получения [D]СПГ по методике с предварительной

обработкой 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–СПГ газообразным дейтерием. Так, при использовании дейтериевой воды и неактивированного катализатора при 190°C включается 2–2.3 атома дейтерия и выход составляет 70–75% (табл. 2). Когда же реакцию вели с дейтериевой водой при 190°C с предварительным выдерживанием 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–СПГ (5 : 20 : 1) в атмосфере D₂, эффективность изотопного обмена заметно росла, и в молекулу СПГ в среднем включалось 6–7 атомов дейтерия (табл. 2).

Многочисленные исследования, посвященные спилловеру водорода, показали, что на поверхности катализатора образуются кластеры из активированных частиц изотопов водорода (H⁺, H[•], e⁻) [9, 24–28]. Естественно, сольватированные в пуле вещества активированные частицы изотопов водорода будут не только способствовать включению дополнительного количества метки, но и осуществлять деградацию вещества за счет радикальных реакций. В

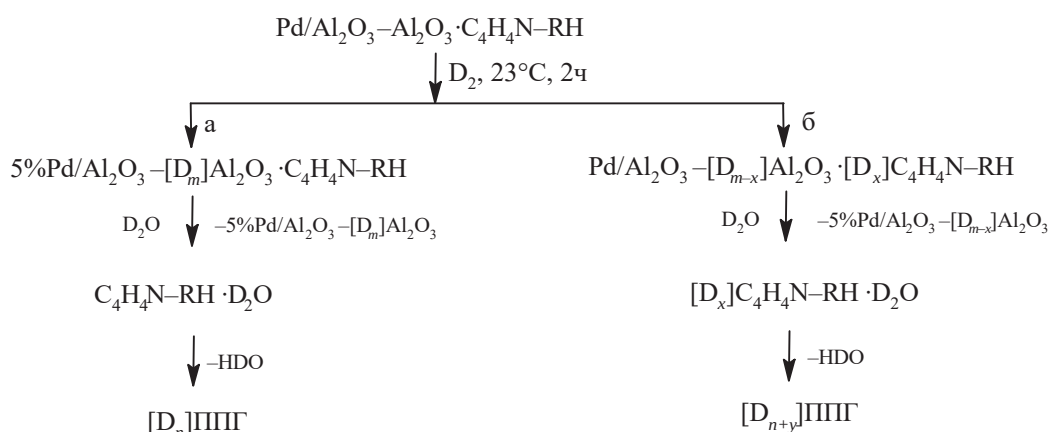


Схема 2. Включение дейтерия в ППГ ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N--RH}$) изотопным обменом с дейтериевой водой (m, n, x, y – количество атомов дейтерия): а – без образования кислотных центров в пуле вещества; б – с образованием кислотных центров в пуле вещества..

связи с этим необходимо оптимизировать не только температуру, но и время реакции (табл. 2).

Из таблицы 2 следует, что в данном случае при 190°C реакцию целесообразно проводить не более 30 мин.

Таким образом, за счет новой методики удалось ввести значительно больше атомов дейтерия в данные соединения. То есть найдено еще одно подтверждение того, что, если активированные частицы изотопов водорода могут эффективно сольватироваться в пуле вещества, то это повышает вероятность получения препаратов с высоким содержанием дейтерия или трития.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. deKeczer S.A., Lane T.S., Voronin T., Masjedizadeh M.R. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2005. Vol. 48, N 14. P. 1013–1023. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1014>
2. Scheigetz J., Berthelette C., Li C., Zamboni R.J. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2004. Vol. 47, N 12. P. 881–889. <https://doi.org/10.1002/jlcr.880>
3. Kolbe A., Schneider B., Voigt B., Adam G. // J. Label. Compd. Radiopharm. 1998. Vol. 41, N 2. P. 131–137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1344\(199802\)41:2<131::AID-JLCR59>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1344(199802)41:2<131::AID-JLCR59>3.0.CO;2-F)
4. Pfeifer V. Tritium and Deuterium Labelling of Bioactive Molecules Catalyzed by Metallic Nanoparticles. Catalysis. Univ. Paris-Saclay, 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02463841>
5. Evchenko S.V., Kamounah F.S., Schaumburg K. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2005. Vol. 48, N 3. P. 209–218. <https://doi.org/10.1002/jlcr.916>
6. Stack D.E., Eastman R. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2016. Vol. 59, N 12. P. 500–505. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3440>
7. Tanga M.J., Bupp J.E., Bradford W.W. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2001. Vol. 44, N 6. P. 405–411. <https://doi.org/10.1002/jlcr.468>
8. Leppala E., Wahala K. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2004. Vol. 47, N 1. P. 25–30. <https://doi.org/10.1002/jlcr.793>
9. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.
10. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Мигулин В.А., Лопачев А.В., Хуторова А.В., Куликова О.И., Мухоморов О.А., Абаимов Д.А. Патент RU 2777391. 03.08.2022 // Б.И. 2022. № 22.
11. Kulikova O.I., Stvolinsky S.L., Migulin V.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Lopacheva O.M., Kulichenkova K.N., Lopachev A.V., Trubitsina I.E., Fedorova T.N. // DARU J. Pharm. Sci. 2020. Vol. 28. P. 119–130. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00323-x>
12. Adams S.P., Tsang M., Wright J.M. // Cochrane Database Syst. Rev. 2015. N 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008226.pub3>

13. Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S., Sharma P. // RSC Adv. 2015. Vol. 5. N 20. P. 15233–15266.
<https://doi.org/10.1039/C4RA15710A>
14. Каратеев А.Е. // Современная ревматология. 2014. Т. 8. N 2. С. 83–89.
<https://doi.org/10.14412/1996-7012-2014-2-83-89>
15. Танаиан М.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мизулин В.А., Шабалина А.А., Трубицына И.Е., Лопачев А.В., Куликова О.И., Абаимов Д.А. Патент RU 2694061. 09.07.2019 // Б.И. 2019. № 19.
16. Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Хуторова А.В., Лопачев А.В., Тимошина Ю.А., Куликова О.И., Танаиан М.М. Патент RU 2780112. 19.09.2022 // Б.И. 2022. № 26.
17. Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А. // ЖФХ. 2002. Т. 76, № 4. С. 727–731
18. Bhering D.L., Ramirez-Solis A., Mota C.J.A. // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107, N 18. P. 4342–4347.
<https://doi.org/10.1021/jp022331z>
19. Kresse G., Furthmuller J. // Comput. Mater. Sci. 1996. Vol. 6, N 1. P. 15–50.
[https://doi.org/10.1016/0927-0256\(96\)00008-0](https://doi.org/10.1016/0927-0256(96)00008-0)
20. Zheng A., Li Sh., Liu Sh.-B., Deng F. // Acc. Chem. Res. 2016. Vol. 49, N 4. P. 655–663.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00007>
21. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Федорова Т.Н., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. Науки о жизни. 2023. Т. 508. С. 23–29.
<https://doi.org/10.31857/S2686738922700020>
22. Kopf S., Bourriquen F., Li W., Neumann H., Junge K., Beller M. // Chem. Rev. 2022. Vol. 122, N 6. P. 6634–6718.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00795>
23. Esaki H., Ito N., Sakai Sh., Maegawa T., Monguchi Y., Sajiki H. // Tetrahedron. 2006. Vol. 62, N 47. P. 10954–10961.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.088>
24. Chiesa M., Giamello E., Murphy D.M., Pacchioni G., Paganini M.C., Soave R., Sojka Z. // J. Phys. Chem. B. 2001. Vol. 105, N 2. P. 497–505.
<https://doi.org/10.1021/jp002794+>
25. Chiesa M., Giamello E., Paganini M.C. // J. Chem. Phys. 2002. Vol. 116, N 10. P. 4266–4274.
<https://doi.org/10.1063/1.1447907>
26. Chiesa M., Paganini M.C., Spoto G., Giamello E., Di Valentin C., Del Vitto A., Pacchioni G. // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109, N 15. P. 7314–7322.
<https://doi.org/10.1021/jp044783c>
27. Chiesa M., Paganini M.C., Giamello E., Murphy D.M., Di Valentin C., Pacchioni G. // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39, N 11. P. 861–867.
<https://doi.org/10.1021/ar068144r>
28. Ricci D., Pacchioni G., Sushko P.V., Shluger A.L. // Surf. Sci. 2003. Vol. 542, N 3. P. 293–306.
[https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(03\)01000-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(03)01000-8)

Development of a New Method for Activation of Isotope Exchange

V. P. Shevchenko, I. Yu. Nagaev*, K. V. Shevchenko, N. F. Myasoedov

*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre «Kurchatov Institute»
(NRC «Kurchatov Institute» – IMG), Moscow, 123182 Russia
e-mail: nagaev@img.ras.ru*

Received January 10, 2023; revised April 18, 2023; accepted April 19, 2023

The influence of various factors on the efficiency of introducing deuterium into 3-(N-pyrrolyl)-propanoyl-L-histidine and 3-(N-salicyl)-propanoyl-L-histidine has been studied. Heavy water was used as a source of deuterium. It is shown that the content of deuterium atoms in the substance can be increased by pretreating the reaction mixture with deuterium gas. The new approach opens up additional possibilities both for obtaining highly purified preparations by introducing hydrogen isotopes into organic compounds, and theoretically for a deeper understanding of the participation in this process of activated deuterium or tritium particles solvated on the carrier and in the pool of the substance.

Keywords: deuterium, synthesis, labeled compounds, activation of isotope exchange.