

ПУТИ АКТИВАЦИИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА ДОФАМИНА С D₂O

© 2024 г. В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев*, Н. Ф. Мясоедов

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»),
123182 Москва, Россия, пл. Курчатова, 2

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

Получена 15.02.2024, после доработки 16.04.2024, принята к публикации 22.04.2024

Рассмотрены различные способы введения дейтерия в дофамин с помощью изотопного обмена и показано, что наилучший результат достигается при изотопном обмене с дейтериевой водой при 190°C в течение 30 мин с использованием следующих катализаторов: (а) трифторуксусной кислоты; (б) 5% Pd/Al₂O₃, предварительно насыщенного газообразным дейтерием. В первом случае выход дейтерированного дофамина составил 65–70%, среднее содержание дейтерия 2.4–2.5 ат./молекула. Во втором случае выход снижался до 35–40%, но содержание дейтерия возрастало до 3.50–3.60 ат./молекула. Полученный результат подчеркивает эффективность комплексного подхода для введения изотопов водорода в органические молекулы, когда на катализаторе и нанесенном на него веществе образуются активированные частицы изотопа водорода, которые способствуют повышению эффективности изотопного обмена с дейтериевой водой при нагревании.

Ключевые слова: дейтерий, дофамин, изотопный обмен**DOI:** 10.31857/S0033831124030119

Влияние дофамина на функционирование живых организмов многообразно [1–4]. Он влияет на жизнедеятельность нервной системы, сердца, на сосуды, пищеварение и др. Наиболее известными патологиями, связанными с дофамином, являются шизофрения и паркинсонизм. Дофамин играет немаловажную роль в обеспечении когнитивной деятельности и используется мозгом для оценки и мотивации, закрепляя важные для выживания и продолжения рода действия. Существует по меньшей мере пять различных подтипов дофаминовых рецепторов.

Анализ процессов, происходящих в организме, упрощается при использовании изотопномеченных препаратов. Поэтому при отработке методик введения метки стараются их сделать приемлемыми для введения и дейтерия, и трития. При использовании дейтериевых аналогов в биологических исследованиях важно, чтобы в препарате присутствовало два и более атомов дейтерия для более достоверной интерпретации полученных масс-спектрометрических данных. Поэтому используются известные и новые методы стимулирования изотопного обмена. Изотопный обмен активируют, протонируя реакционную смесь, проводя реакцию в присутствии гетерогенных и гомогенных катализаторов, совмещая твердофазные и жидкофазные методы [5]. Здесь надо пояснить, какие методики получили название твердофазных и жидкофазных: твердофазные реакции проводятся без использования растворителя, жидкофазные — идут в растворе.

Естественно, в разных случаях преимущества того или иного метода зависят от природы биологически активного соединения. Например, совмещение твердофазного и жидкофазного методов может вызвать и негативные последствия. Очевидно, что активация изотопного обмена ионами D⁺ из F₃CCOOD, образовавшимися при взаимодействии дейтериевой воды с трифторуксусной кислотой, будет иметь другие характеристики, чем ионами D⁺, образовавшимися при взаимодействии газообразного дейтерия с 5% Pd/Al₂O₃ [6–8]. Катионы дейтерия, генерируемые на катализаторе, образуют на носителе и в веществе кислотные центры Бренстеда, которые, с одной стороны, способствуют увеличению подвижности протонов в молекулах вещества, с другой — сильнее протонируют функциональные группы органического соединения, что может привести к их деградации [5].

Целью данной работы было продолжение изучения условий повышения эффективности изотопного обмена с D₂O, при насыщении смеси дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ активированными частицами дейтерия. Оценку активации изотопного обмена проводили, используя при введении дейтерия кислоту или катализатор.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, растворители, реагенты — коммерческие препараты. Использовали солянокислый

дофамин (Sigma–Aldrich, США, H8502–5g, чистота >97.5%).

Для анализа реакционных смесей использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. ВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром-A02, колонка ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм). Температура колонки 35°C. Длина волны 210 нм. Элюент А – 0.2 М LiClO₄ + 0.005М HClO₄, элюент Б – метанол, линейный градиент от 0 до 50% Б за 10 мин. Скорость подачи элюента 150 мкл/мин. Время удерживания дофамина 3.20 мин.

Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (Thermo Electron, 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. Включение дейтерия в ароматическую часть дофамина определяли по фрагменту с $m/z = 109.1$, в молекулу дофамина – по молекулярному пику с $m/z = 154.1$ (мономолекулярные массы). Выход и содержание дейтерия в дофамине приведены в табл. 1 и 2.

Приготовление смеси солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20)

Солянокислый дофамин (25.0 мг) растворяли в 0.1 мл дейтериевой воды, вносили 500 мг Al₂O₃ и обрабатывали ультразвуком для равномерного распределения раствора в порошке. Замораживали смесь жидким азотом и вакуумировали 5 ч. Образовавшийся осадок измельчали и лиофилизировали 16 ч. Высушенный остаток растирали с 5% Pd/Al₂O₃ (125 мг) и вновь лиофилизировали 16 ч. В результате получали смесь солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20).

Использование смеси солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20)

(а) Смесь солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (15 мг) помещали в ампулу (объем 2 мл) и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере газообразного дейтерия (давление 400 гПа). К насыщенному дейтерием смеси солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ добавляли 0.2 мл дейтериевой воды, ампулу продували аргоном, запаивали и выдерживали 30 мин при 190°C (по расчетам, при такой температуре 80% D₂O присутствует в жидкой фазе). Затем растворитель удаляли лиофилизацией. К смеси добавляли 0.5 мл метанола, катализатор отфильтровывали и промывали метанолом три раза по 0.5 мл. Экстракты упаривали. Сухой остаток растворяли в 0.58 мл воды и анализировали. После определения выхода [D]дофамина раствор в воде выдерживали 1 ч для обмена лабильного дейтерия и снимали масс-спектр.

Таблица 1. Зависимость изотопного обмена дофамина с дейтериевой водой от температуры и времени проведения реакции

Температура, °C (время, мин)	Выход, %	Среднее ΣD
150 (30)	82	0.15
150 (60)	81	0.25
170 (60)	73	0.35
190 (30)	50	1.46
210 (30)	43	1.68

Таблица 2. Зависимость содержания дейтерия и выхода дофамина от состава реакционной среды

Условия реакции	Выход	Среднее ΣD
Смесь дофамин-5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ (D ₂ O)*	40	3.82
Смесь дофамин-5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ (D ₂)	2	1.23
D ₂ O	53	1.48
D ₂ O-TFA (10 : 1)	70	2.52

* – предварительное насыщение D₂ смеси дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20).

(б) Смесь солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (13 мг) выдерживали в атмосфере газообразного дейтерия (давление 400 гПа) в течение 30 мин при 190°C. Затем обрабатывали, как описано выше.

Использование солянокислого дофамина

(а) Готовили раствор солянокислого дофамина (5.0 мг) в дейтериевой воде (1 мл). Раствор (50 мкл) помещали в ампулу и разбавляли 200 мкл дейтериевой воды. Ампулу заполняли аргоном, запаивали и грели в термостате при 150–210°C в течение 30–60 мин. Затем обрабатывали, как описано выше.

(б) Готовили раствор солянокислого дофамина (5.0 мг) в дейтериевой воде (1 мл). Раствор (50 мкл) помещали в ампулу и разбавляли 200 мкл дейтериевой воды, содержащей трифторуксусную кислоту (ТФА). Конечное соотношение дейтериевая вода–ТФА составило 10 : 1. Ампулу заполняли аргоном, запаивали и грели в термостате при 190 или 210°C в течение 30 мин. Затем обрабатывали, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Устойчивость солянокислого дофамина оказалась относительно высокой (табл. 1). Выход был приемлемым даже при температуре выше 200°C. По масс-спектрометрическим данным, включение

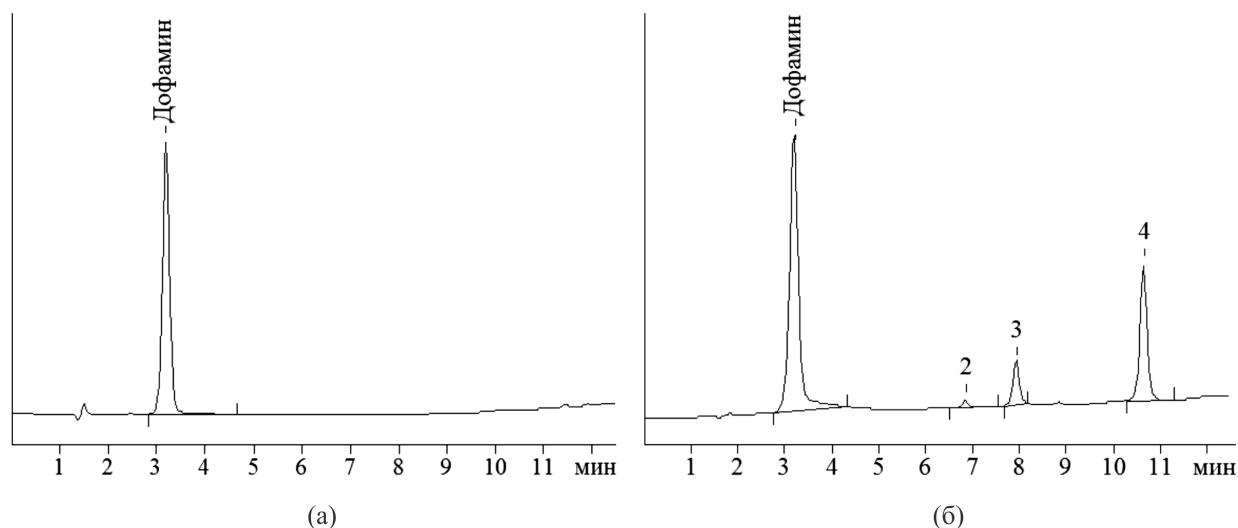


Рис. 1. Анализ на хроматографе Милихром А-02 реакционной смеси после проведения препаративных опытов (первый пик – дофамин): а – активация изотопного обмена TFA; б – активация изотопного обмена 5% Pd/Al₂O₃.

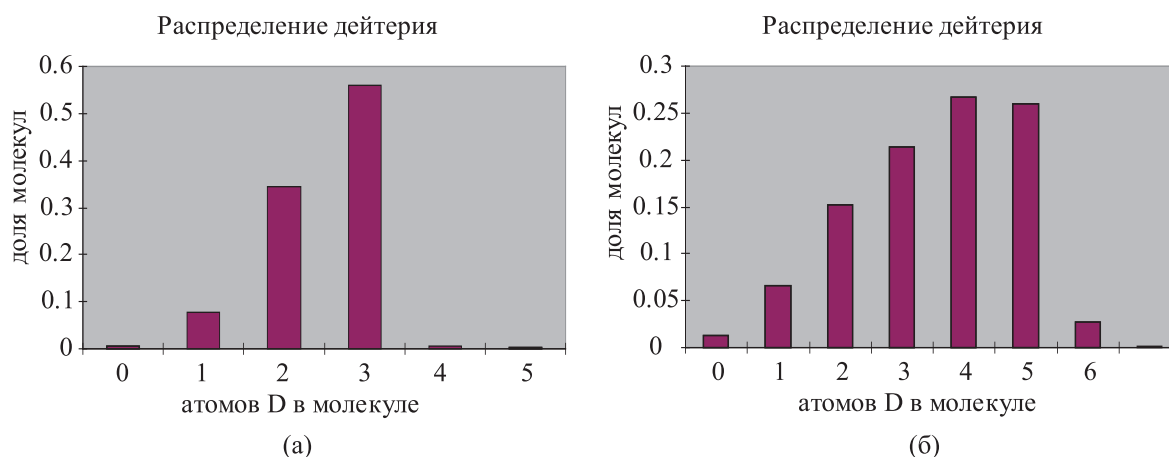


Рис. 2. Изотопомеры в [D]дофамине после проведения препаративных опытов: а – активация изотопного обмена TFA; б – активация изотопного обмена 5% Pd/Al₂O₃.

дейтерия в алифатическую часть дофамина было примерно в два раза ниже, чем в ароматическую.

Необходимо отметить, что при увеличении температуры на 20°C, со 150 до 170°C, включение дейтерия и выход дофамина не сильно отличались. В то же время при увеличении температуры со 170 до 190°C изотопный обмен существенно возрастал. При нагревании еще на 20°C, со 190 до 210°C, рост включения дейтерия замедлялся. По-видимому, это связано с тем, что более подвижные протоны в дофамине находятся в ароматическом кольце. Поэтому, начиная с определенной температуры, включение дейтерия в кольцо заметно возрастало и достигало равновесных значений для данного соединения. Дальнейший рост температуры мало сказывался на изотопном обмене и в большей степени способствовал только деградации дофамина.

При использовании TFA или предварительно насыщенной дейтерием смеси солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20), удалось активировать изотопный обмен (табл. 2). Для достоверной оценки эффективности изотопного обмена при сравнении этих двух методик запаиваемые ампулы с разным составом реакционной среды одновременно грели при 190°C в течение 30 мин. Ампулы охлаждали до комнатной температуры и анализировали.

Как следует из приведенных данных (табл. 2), использование дейтериевой воды имеет преимущества перед использованием газообразного дейтерия. Интересно отметить, что при использовании дейтериевой воды в ароматическое кольцо включалось 40–50% метки, в то время как при использовании газообразного дейтерия около 28–30%.

При использовании дейтериевой воды или смеси дейтериевая вода—трифторуксусная кислота (соотношение 10: 1) выход [D]дофамина был выше, чем при использовании 5% Pd/Al₂O₃. Но включение дейтерия оказывается больше в присутствии активированного катализатора.

Попытки увеличить изотопный обмен при проведении реакций при 210°C были неудачными: включение дейтерия изменялось незначительно при заметном падении выхода [D]дофамина.

Препаративный синтез [D]дофамина вели со смесью дейтериевой воды и TFA (соотношение 10 : 1) при 190°C в течение 30 мин. В ампулу вносили 50 мг дофамина и 1.5 мл смеси D₂O—TFA. Ампулу заполняли аргоном, запаивали и помещали в термостат. Выход [D]дофамина 65–70%, среднее содержание дейтерия 2.42–2.49 атомов.

Препаративный синтез [D]дофамина реакцией со смесью солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃—Al₂O₃ (1 : 5 : 20) вели (после часового выдерживания в атмосфере дейтерия) в 1.5 мл D₂O при 190°C в течение 30 мин. Выход [D]дофамина составлял 35–40% при среднем содержании 3.50–3.60 атомов дейтерия. Более низкий выход [D]дофамина при использовании смеси солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃—Al₂O₃ (1 : 5 : 20), по-видимому, связан с тем, что устойчивость дофамина выше в растворе с TFA, чем в нейтральной среде.

Анализ методом ВЭЖХ показал, что при использовании смеси дейтериевой воды и трифторуксусной кислоты не только выход [D]дофамина выше, но и реакционная смесь содержит меньше побочных продуктов, чем при использовании 5% Pd/Al₂O₃ (рис. 1).

Содержание изотопомеров в дофамине после препаративных опытов с дейтериевой водой приведено на рис. 2.

Как видно из приведенных данных (рис. 2), при использовании обеих методик содержание изотомера дофамина без дейтерия было небольшим, что важно для масс-спектрометрического анализа.

Фрагментация молекулярных пиков показала, что в ароматическое кольцо дофамина при активации изотопного обмена TFA включается около 70–75% дейтерия. При активации изотопного обмена 5% Pd/Al₂O₃ — около 39–43% дейтерия. Видно, что при использовании методики с 5% Pd/Al₂O₃ включение метки происходит более равномерно. При активации TFA метка преимущественно включается в ароматическое кольцо дофамина.

В целом можно разделить работу на несколько этапов.

Реакции с дейтериевой водой позволяют представить изначальную эффективность изотопного обмена данного соединения в зависимости от температуры и времени проведения реакции. Определяли, насколько легко ввести дейтерий в данное

соединение изотопным обменом. Оказалось, что наиболее эффективно метка включается при температуре около 190°C (табл. 1). Дальнейшее исследование проводили с учетом этих данных. Сравнение твердофазного изотопного обмена, когда используется газообразный дейтерий и реакцию проводят без растворителя, с жидкофазным изотопным обменом с использованием растворителя приведено в табл. 2. Смесь солянокислый дофамин-5% Pd/Al₂O₃—Al₂O₃ (1 : 5 : 20) можно было и обработать D₂ при 190 °C, и насытить D₂ при комнатной температуре с последующей реакцией с D₂O при 190°C. При этом оказалось, что даже при температуре, когда выход меченого дофамина составлял всего 2%, включение дейтерия в дофамин при использовании твердофазного изотопного обмена было меньше, чем при изотопном обмене с D₂O. Таким образом, было установлено, что в данном случае новая методика более предпочтительна для введения дейтерия в дофамин.

Данная работа подтвердила связь между повышением эффективности изотопного обмена дофамина с D₂O и предварительной обработкой дофамина активированными частицами дейтерия (D⁺, e⁻), образовавшимися при взаимодействии газообразного дейтерия с катализатором [5]. Здесь еще раз нужно подчеркнуть большую роль, которую играет связка катион дейтерия—электрон [9–13]. По-видимому, это связано с тем, что генерируемые катализатором частицы D⁺, e⁻ более эффективны при образовании кислоты Бренстеда, чем частицы D⁺ из кислот. А кислотные центры Бренстеда понижают активационный барьер при взаимодействии изотопов водорода с C—H группами вещества, что повышает вероятность изотопного обмена. Для того, чтобы убедиться в этом, провели изотопный обмен дофамина с D₂O—TFA (10 : 1). Результат приведен в табл. 2. Включение метки при этом упало на треть.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катунина Е.А. // Consilium Medicum. Приложение к журн. «Неврология и ревматология». 2010. № 2. С. 46–49.
2. Преображенская И.С. // Consilium Medicum. Приложение к журн. «Неврология и ревматология». 2008. № 1. С. 53–58.

3. Wenzel J.M., Rauscher N.A., Cheer J.F., Oleson E.B. // ACS Chem. Neurosci. 2015. Vol. 6. N1. P. 16–26. <https://doi.org/10.1021/cn500255p>
4. Mehta M.A., Riedel W.J. // Curr. Pharm. Des. 2006. Vol. 12. N20. P. 2487–2500. <https://doi.org/10.2174/138161206777698891>
5. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2023. Т. 65. № 4. С. 349–354. <https://doi.org/10.31857/S0033831123040068>
6. Bhering D.L., Ramirez-Solis A., Mota C.J.A. // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107. N18. P. 4342–4347. <https://doi.org/10.1021/jp022331z>
7. Kresse G., Furthmuller J. // Comput. Mater. Sci. 1996. Vol. 6. N1. P. 15–50. [https://doi.org/10.1016/0927-0256\(96\)00008-0](https://doi.org/10.1016/0927-0256(96)00008-0)
8. Zheng A., Li Sh., Liu S.-B., Deng F. // Acc. Chem. Res. 2016. Vol. 49. N4. P. 655–663. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00007>
9. Esaki H., Ito N., Sakai Sh., Maegawa T., Monguchi Y., Sajiki H. // Tetrahedron. 2006. Vol. 62. N47. P. 10954–10961. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.088>
10. Chiesa M., Giamello E., Murphy D.M., Pacchioni G., Paganini M.C., Soave R., Sojka Z. // J. Phys. Chem. B. 2001. Vol. 105. N2. P. 497–505. <https://doi.org/10.1021/jp002794+>
11. Chiesa M., Giamello E., Paganini M.C. // J. Chem. Phys. 2002. Vol. 116. N10. P. 4266–4274. <https://doi.org/10.1063/1.1447907>
12. Chiesa M., Paganini M.C., Spoto G., Giamello E., Di Valentin C., Del Vitto A., Pacchioni G. // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109. N15. P. 7314–7322. <https://doi.org/10.1021/jp044783c>
13. Chiesa M., Paganini M.C., Giamello E., Murphy D.M., Di Valentin C., Pacchioni G. // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39. N11. P. 861–867. <https://doi.org/10.1021/ar068144r>

Pathways for Activating Isotope Exchange of Dopamine with D₂O

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

National Research Centre Kurchatov Institute, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

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

Received February 15, 2024; revised April 16, 2024; accepted April 22, 2024

Various methods of introducing deuterium into dopamine using isotope exchange are considered. The best result is achieved by isotope exchange with deuterated water at 190°C for 30 min using (a) trifluoroacetic acid as a catalyst and (b) 5% Pd/Al₂O₃ catalyst presaturated with deuterium gas. In the first case, the yield of deuterated dopamine was 65–70%, and the average deuterium content was 2.4–2.5 at./molecule. In the second case, the yield decreased to 35–40%, but the deuterium content increased to 3.50–3.60 at./molecule. The obtained result highlights the effectiveness of an integrated approach to introducing hydrogen isotopes into organic molecules, when activated hydrogen isotope species are formed on the catalyst and the substance deposited on it, which contribute to increasing the efficiency of isotope exchange with deuterated water when heated.

Keywords: deuterium, dopamine, isotope exchange