

Твердофазный метод введения тритиевой метки в биологически активные соединения

В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов

*Институт молекулярной генетики Российской академии наук
123182 Москва, пл. Курчатова, 2, факс (095) 196–0221*

Описан твердофазный метод проведения реакций гидрогенолиза, гидрирования и изотопного обмена для введения тритиевой метки в различные органические соединения: липиды, нуклеотиды, аминокислоты, пептиды и т.д. Рассмотрено влияние условий проведения реакций на выход и молярную радиоактивность меченых препаратов. Показано, что полученные данные можно объяснить зависимостью спилловера трития от природы исходного соединения и других факторов. Библиография — 158 ссылок.

Оглавление

I. Введение	471
II. Основные сведения о спиллере водорода	472
III. Твердофазные реакции в синтезе меченных тритием препаратов	474
IV. Особенности твердофазных реакций гидрогенолиза тритием	490
V. Заключение	494

I. Введение

Меченные тритием (радиоактивным изотопом водорода) органические соединения широко применяют в исследованиях по химии и биологии, в медицине и в сельском хозяйстве. Номенклатура таких соединений, выпускаемых различными фирмами, составляет сотни наименований, она постоянно расширяется и обновляется. Среди меченых соединений особенно широко представлены физиологически активные вещества, что, в первую очередь, связано с их использованием в биологии и медицине. Структура синтезируемых меченых препаратов со временем усложняется. Поэтому приходится модернизировать методики введения метки не только при получении каждого из основных классов органических соединений, но часто и при введении метки в различные соединения одного и того же класса.

Пристальное внимание к проблеме синтеза веществ, меченных тритием, объясняется тем, что тритий имеет удобный период полураспада (12.26 г.) и высокую молярную

радиоактивность. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии можно выделять препараты с радиохимической чистотой 96–98% даже в случае применения самых жестких условий введения этой метки, когда выход меченого соединения ограничивается несколькими процентами. При специфическом связывании с рецепторами меченных тритием препаратов практически отсутствуют изотопные эффекты, что позволяет добиться высокой чувствительности метода и точно определять константы связывания. Меченные тритием соединения используют также при фармакокинетических исследованиях для определения органа-мишени, в котором преимущественно накапливается лекарственный препарат, и скорости выведения этого препарата из организма. Необходимы тритиевые соединения и для исследования метаболизма, изучения субстратной специфичности ферментов, а также для поиска новых эффективных ингибиторов ферментов. Если при этом учесть, что препараты, меченные тритием, как минимум в 10 раз дешевле препаратов, меченных ^{14}C , становится понятным большой интерес ко всему, что связано с получением тритиевых изотопмеров биологически активных соединений.

Методы введения тритиевой метки можно разделить на две основные группы: различные варианты изотопного обмена и химические методы (как правило, тритиирование, дегалогенирование, селективное тритиирование и дегалогенирование).

В данном обзоре рассмотрен твердофазный метод введения тритиевой метки. В силу специфики твердофазного (без растворителя) синтеза гидрирование и изотопный обмен рассматривают как частные случаи реакций гидрогенолиза.¹ В соответствии с данным методом органическое вещество помещают на носитель (сорбент), на который предварительно нанесен металл-катализатор, и нагревают эту систему в атмосфере газообразного трития. Твердофазные реакции гидрогенолиза оказались наиболее приемлемыми для введения тритиевой метки в органические соединения. С помощью

В.П.Шевченко. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории изотопно-меченных физиологически активных веществ ИМГ РАН. Телефон: (095)196–0212.

И.Ю.Нагаев. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (095)196–0212.

Н.Ф.Мясоедов. Член-корреспондент РАН, заведующий отделом химии физиологически активных веществ того же института. Телефон: (095)196–0001, e-mail: img@glas.apc.org
Область научных интересов авторов: синтез изотопно-меченных соединений липидной природы, исследование каталитических реакций введения тритиевой метки, химия физиологически активных веществ, использование ферментов в биотехнологии.

Дата поступления 15 октября 2002 г.

этих реакций удалось сравнительно просто получить меченные тритием липиды, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, гликопротеины, нуклеопротеины, липопротеины, гликолипиды, алкалоиды, терпеноиды и многие другие классы биологически активных соединений.

В литературе имеются многочисленные данные о взаимодействии различных соединений, нанесенных на носитель, с активированными частицами водорода, которые образовались на металлах-катализаторах. Обнаружено явление повышенной подвижности активированного водорода на инертных носителях.² Перетекание активированных частиц водорода из одной фазы в другую получило название спилловера водорода. Именно спилловер водорода (третия) и определяет возможность проведения твердофазных реакций гидрогенолиза. Поэтому прежде, чем излагать фактический материал о твердофазных реакциях введения тритиевой метки в органические соединения, мы привели основные данные по изучению спилловера водорода, которые помогут понять главные особенности и механизм твердофазных реакций гидрогенолиза.

II. Основные сведения о спилловере водорода

В большинстве случаев твердофазные реакции проводят в жестких условиях: при температуре выше 200°C (обычно при 300, 500°C и выше). Для большинства биологически активных веществ использование таких высоких температур недопустимо; их изучают при более низких температурах. Закономерности протекания твердофазных реакций, установленные в низко- и высокотемпературных исследованиях, различны. Поэтому имеющиеся в литературе данные о природе активированных частиц водорода и выводы о процессах, связанных со спилловером водорода на носителях (высокотемпературные исследования), в случае введения трития в биологически активные соединения (низкотемпературные исследования) нуждаются в критическом анализе.

Активность металлов-катализаторов в реакциях изотопного обмена уменьшается в ряду $Pt > Pd > Ni$.³ Хемосорбция H_2 обычно осуществляется при 200–300°C.⁴ Продукты диссоциации молекулярного водорода на платине мигрируют на носитель, в котором устанавливается динамическое равновесие между атомарной и протонной формами водорода.^{5,6} Число активных частиц, например для силикагеля, составляет $\sim 10^{12} \text{ г}^{-1}$ (см.^{7–9}). Установлено, что силикагель, на котором находится активированный водород, катализирует гидрирование алкенов. В этих условиях гидрирование происходит в основном на центрах, созданных благодаря спилловеру, с участием водорода из газовой фазы.^{7–11}

В качестве акцепторов водорода могут выступать гидроксильные группы, оксиды, углерод.¹² Так, методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием обнаружен изотопный обмен между дейтерием и водородом ОН-групп цеолита Y (ZeY).¹³ А в работе¹⁴ показано, что ОН-группы носителя в условиях гидрирования обмениваются с тритием. Отмечено,^{15,16} что при взаимодействии спилловер-частиц с фрагментами CH_3O молекул субстрата происходит образование ОН-групп и CH_4 .

Переносчиками активных частиц водорода от инициатора к акцептору могут быть продукты деструкции, которые образуются в реакции.^{17–20}

Для определения коэффициентов диффузии водорода применяют различные методы: температурно-программированной десорбции,²¹ адсорбционные²² и электронномикроскопические,²³ а также ЯМР.^{24,25} Диффузия по поверхности носителя осуществляется на расстояние до 90–200 нм от частиц металла-катализатора (платины).^{24,25}

Математическая модель спилловера рассмотрена в работах^{26–28}. В соответствии с этой моделью предполагается, что

образование активированных частиц происходит на металле-источнике, а носитель транспортирует эти частицы к субстрату и обратно. В работе²⁸ построены одно-, двух- и трехмерные диффузионные кинетические модели гидрогенолиза органического субстрата, нанесенного на носитель, в которых учтены градиент концентрации спилловер-водорода и отравление катализатора в ходе реакции. Показано, что гидрогенизация практически локализована в реакционных зонах вокруг кристаллитов металла-катализатора и, следовательно, имеется некоторое оптимальное для данной реакции соотношение катализатора, носителя и субстрата.

В литературе можно найти данные в пользу как атомарной, так и протонной природы частиц спилловера. В настоящее время большинство авторов придерживаются мнения, что в спилловере участвуют атомы водорода.^{18,29,30} В работе¹⁸ найдено, что скорость исчезновения сигнала ЭПР перилена соответствует скорости поглощения H_2 системой Pt/ZrY. Заметим, что непосредственное наблюдение методом ЭПР атомарного водорода на большинстве носителей возможно лишь при температурах ниже -170°C . При тщательном анализе формы пика и величины химического сдвига в спектрах ЯМР 1H установлено,³⁰ что по поверхности SiO_2 водород мигрирует в виде радикалов $H^\cdot$. Центрами адсорбции таких радикалов могут быть группы SiO или Si.

Методом ЭПР показано, что в присутствии водорода происходит восстановление четырехвалентного церия до трехвалентного на системе $ZeY + Pt(\text{чернь})$.³¹ С использованием *N*-метил-бутил- α -фенилнитрона или 2,4,6-три-метилнитробензола, молекулы которых служат ловушками для водорода, были обнаружены слабосвязанные атомы водорода, участвующие в гидрировании бензола.³²

Значительных различий процессов обмена 2H_2 с ОН-группами носителей-полупроводников с *n*- и *p*-типом проводимости, на которые была нанесена платина, не установлено,³³ что позволило сделать вывод об участии в спилловере незаряженных частиц.

Первой стадией спилловера является гомолитический разрыв связи $H-H$ на металле, независимо от того, участвует в спилловере атомарный водород или протон. Лимитирующей стадией спилловера может быть либо поверхностная диффузия на носителе, либо перенос частиц с катализатора на носитель. Поскольку энергия активации этих элементарных стадий различна, то при варьировании температуры может меняться и лимитирующая стадия спилловера.⁷ Наиболее распространено мнение, что спилловер водорода лимитируется диффузией по поверхности носителя.⁶

Высказаны предположения и о протекании спилловера по протонному механизму.^{11,34,35} С помощью методов температурно-программированного восстановления и ИК-спектроскопии показано, что сначала водород быстро диссоциирует на атомы, а далее образуются ионы H^+ , диффундирующие в объем субстрата и медленно взаимодействующие с атомами кислорода материала подложки.³⁶ Авторы работ^{37–39} связывают увеличение электропроводности TiO_2 в атмосфере водорода с диффузией протонов на диоксид титана. При этом сначала наблюдается рост электропроводности TiO_2 , связанного с платиной, а затем и TiO_2 без платины.

О протонном механизме спилловера свидетельствует и корреляция между скоростью спилловера и протонным сродством промотора,^{11,34} который может сольватировать диффундирующий протон: вода > метанол > этанол > *n*-пропанол > *n*-бутанол. В присутствии этих промоторов скорость спилловера не зависит от площади поверхности нанесенной платины, а в присутствии, например, уксусной кислоты, обладающей низким сродством к протону, такая зависимость наблюдается. В последнем случае скорость реакции может определяться скоростью сольватации протона.

Даже сторонникам атомарной природы спилловера водорода приходится признать,⁴⁰ что однозначные спектроскопические данные, подтверждающие, что активированными частицами водорода являются $H^{\bullet}$, отсутствуют. Иногда экспериментальное подтверждение обоих механизмов находят для одних и тех же каталитических систем в одинаковых условиях реакции.⁴⁰ В зависимости от вида тестирования или выбора спектроскопического метода исследования идентифицируют атомарный водород или протон. Модель, приведенная в работе⁴⁰, описывает спилlover как образование на поверхности носителя доноров электронов. При этом слабо хемосорбированный водород рассматривается как атомарный, а сильно хемосорбированный — как протон. Количественные данные, полученные спектроскопическими методами, не позволяют однозначно определить природу активированных частиц в твердофазных каталитических реакциях.

Тритий также может реагировать с субстратом или в атомарном, или в ионном виде. Однако в литературе не рассматриваются результаты возможных взаимодействий электронов, появившихся при образовании протонов, ни с газообразным водородом, ни с субстратом. В последнем случае процесс можно интерпретировать и как особый случай электрохимических реакций. Электроны свободно передвигаются по кристаллиту металла-катализатора или по подложке (например, по графиту). Однако если субстрат имеет свойства изолятора, электронная проводимость может оказаться ничтожно малой.

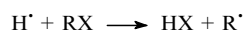
Интересно, что при повышении температуры проводимость в кристаллите металла снижается, так как электроны больше рассеиваются по мере разупорядочения движения атомов, связанного с их термическим возбуждением. Металлоиды характеризуются положительным температурным коэффициентом проводимости.⁴¹ Возможно, именно взаимодействием с электронами обусловлены исчезновение сигнала ЭПР перилена, адсорбированного на системе Pt/ZrY,¹⁸ и восстановление четырехвалентного церия до трехвалентного.³¹ Выше было показано,^{6–10} что гидрирование может осуществляться газообразным водородом, и это, по-видимому, связано с наличием электронов, которые появляются при спилловере протонов.

При исследовании закономерностей взаимодействия различных органических молекул с атомарным тритием, образовавшимся при нагревании газообразного трития до 2000 К на вольфрамовой нити, показано,⁴² что даже при охлаждении мишени жидким азотом степень замещения водорода в молекуле органического соединения не превышает 10%. При этом наблюдаются крайне низкие химический и радиохимический выходы реакции обмена по сравнению с выходами твердофазных реакций. Действительно, атомарный водород уже при комнатной температуре восстанавливает многие оксиды металлов, соединяется с серой, азотом и фосфором, с кислородом образует пероксид водорода, кроме того, он легко рекомбинирует. В реакциях с участием радикалов образуется большое количество побочных продуктов. Таким образом, если введение метки происходит за счет реакции с атомарным тритием, то выходы меченых биологически активных соединений будут очень низкими. При температурах проведения твердофазных реакций атомарный тритий, образующийся при взаимодействии газообразного трития с катализатором, превращается в молекулярный, который большой роли в синтезе меченых препаратов не играет. По-видимому, с этим связана устойчивость органических соединений в таких реакциях.

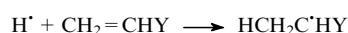
Вероятно, заметного участия атомарного трития в реакциях можно ожидать при более высоких температурах, как правило, не используемых при введении метки твердофаз-

ным методом. Это связано с тем, что только при высоких температурах реакции радикального отрыва и участие атомарного трития в гидрировании и дегалогенировании могут конкурировать с энергетически более выгодным процессом рекомбинации атомарного трития.

Интересно проанализировать сведения о характере взаимодействия радикалов с субстратом в условиях, более подходящих для изучения подобных систем.⁴³ Например оказалось, что радикалам в большей степени свойственны реакции отрыва, чем присоединения.⁴³ Это связано с тем, что при отрыве



реализуется линейный реакционный центр, обеспечивающий минимальный активационный барьер. В процессе присоединения



реакционный центр имеет вид треугольника, и это, несомненно, увеличивает энергию активации данной реакции. Методом ЭПР (правда, при низких температурах) исследован внутримолекулярный перенос атомов водорода, а с помощью привитых к поверхности твердого тела (силикагеля) углеводородных группировок впервые прямыми спектральными методами была изучена кинетика свободнорадикальных процессов внутримолекулярного переноса атомов протия и дейтерия (табл. 1).⁴⁴

Таблица 1. Константы скорости свободнорадикальных процессов внутримолекулярного переноса атомов протия и дейтерия.⁴⁴

Процесс	T, K	$k \cdot 10^{-5}, c^{-1}$
$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\dot{\text{C}}^{\text{H}}\text{H}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2 \\ \text{CH}_2\text{C}^{\text{H}}\text{H}_2 \end{array}$	246	66 ± 7
$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\dot{\text{C}}^{\text{H}}\text{H}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \dot{\text{C}}\text{HCH}_3 \\ \text{CH}_2\text{C}^{\text{H}}\text{H}_2 \end{array}$	295	12 ± 1
$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2 \\ \text{C}^{\text{H}}\text{H}_3 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\dot{\text{C}}^{\text{H}}\text{H}_2 \\ \text{C}^{\text{H}}\text{H}_2 \end{array}$	373	5 ± 0.5
$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{C}^{\text{H}}\text{H}_2\dot{\text{C}}^{\text{H}}\text{H}_2 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\dot{\text{C}}^{\text{H}}\text{H}_2 \\ \text{CH}_2^{\text{H}} \end{array}$	373	20 ± 2

Показано, что радикальный центр может мигрировать, поэтому возможно образование различных продуктов полимеризации, изомеризации и т.д. не только в местах первоначального образования радикалов.

Интересно проанализировать, какие закономерности реализуются при гомолитическом и электрофильном замещении водорода в ароматических соединениях на тритий,⁴⁵ чтобы сравнить их с закономерностями изотопного обмена. При электрофильном замещении, когда электрофильной частицей является H^+ , в молекуле различают *орто*-, *пара*- и *мета*-ориентанты (табл. 2). Медленной стадией является присоединение протона. Например, при обработке ароматических соединений смесью трифторуксусной кислоты с тяжелой водой оказалось, что скорость дейтерообмена меняется синхронно с равновесной степенью протонирования.

Сравним процессы электрофильного алкилирования ароматических соединений с соответствующими радикальными реакциями. При метилировании толуола и этилировании

Таблица 2. Скорости включения дейтерия (отн. ед.) в различные положения ароматического кольца при разных заместителях.

Положение заместителя	Скорость включения для заместителя			
	CH ₃	CH ₃ O	Cl	I
<i>орто</i>	83	23 000	0.035	0.043
<i>мета</i>	1.9	0.25	0.002	0.003
<i>пара</i>	83	55 000	0.160	0.112

бром- и фторбензола под действием $R^+[Al_2Cl_7]^-$ происходит типичное электрофильное замещение (табл. 3). При гомоли- тическом метилировании соотношение продуктов включе- ния иное.

Таблица 3. Включение (%) групп CH₃ и C₂H₅ в *орто*-, *мета*- и *пара*- положения в реакциях алкилирования ароматических соединений.

Процесс	Включение в положение		
	<i>орто</i>	<i>мета</i>	<i>пара</i>
Метилирование			
толуола ^a	50–60	10–14	34–26
фторбензола ^b	57	37	6
бромбензола ^b	67	23	10
Этилирование			
фторбензола ^a	43	14	43
бромбензола ^a	24	22	54

^a Электрофильное замещение. ^b Гомоли- тическое метилирование.

Как будет показано ниже, подобная специфичность наблюдается и при твердофазных реакциях гидрогенолиза тритием. Очевидно, что такую специфичность процессов нельзя объяснить, рассматривая только источник или меха- низм транспортировки активированных частиц к субстрату. Однако поскольку у этих частиц разные свойства (радикал и ион), то, изучая продукты реакции и (или) распределение в них метки, можно сделать выводы в пользу одного из механизмов спилловера водорода.

III. Твердофазные реакции в синтезе меченных тритием препаратов

Твердофазные реакции оказались весьма эффективными для введения тритиевой метки в органические соединения. Если используют селективные методы, то особенно актуальной становится проблема оптимизации условий введения. Высоко- меченные препараты можно получать в таких твердофаз- ных процессах, как селективный изотопный обмен, селектив- ное гидрирование ненасыщенных углерод-углеродных и гете- роатом-углеродных связей, а также селективное восстано- вительное дегалогенирование одного из нескольких атомов галогена или восстановительное дегалогенирование при наличии лабильных ненасыщенных фрагментов в молекулах органического соединения.

Отметим, что параллельно с перечисленными выше основными твердофазными реакциями протекают побочные процессы, которые существенно влияют на радиохимические характеристики меченных препаратов. Например, при обра- ботке веществ, нанесенных на катализатор, газообразным тритием на конечную молярную радиоактивность продуктов сильно влияют изотопные эффекты. Процессы деструкции органических веществ не только затрудняют очистку мече- ных препаратов, но и приводят к изотопному разбавлению трития. Очевидно, что вследствие взаимодействия орга-

нических соединений с образующейся протий-третиевой смесью снижается степень включения трития в молекулы этих соединений. В работе ⁴⁶ предложена модель, с помощью которой можно объяснить влияние различных факторов на степень включения трития в органические соединения.

1. Твердофазный изотопный обмен

Изотопный обмен — наиболее предпочтительный метод введе- ния тритиевой метки, так как не требует синтеза предшествен- ников. Кроме того, при изотопном обмене можно получить меченый препарат, используя минимальное количество (5–10 мг) часто дефицитных и дорогих биологически активных веществ. Этот метод не применяют, только когда исходное вещество полностью разрушается в условиях эксперимента.

Твердофазный каталитический изотопный обмен — сложный процесс, на который влияют многочисленные фак- торы, связанные со свойствами как органических соединений, так и катализаторов. Например, эффективность проведения твердофазного изотопного обмена сильно зависит от темпе- ратуры плавления органического соединения. С учетом этого, все вещества можно разделить на две группы. К первой относятся вещества, которые при выбранной температуре реакции приобретают свойства жидкости (в таком случае молекулы могут перемещаться на носителе и друг относи- тельно друга); ко второй — соединения, которые в ходе реакции существуют в виде кристаллов (в таком случае непо- средственный контакт с активными центрами катализатора невозможен, и степень изотопного обмена зависит главным образом от эффективности спилловера трития). Естественно, закономерности включения метки в соединения первой и второй групп не одинаковы. Соединения липидной природы, как правило, легкоплавкие, а нуклеотиды, нуклеозиды, ами- нокислоты, пептиды и их производные имеют высокую температуру плавления. Поэтому целесообразно рассмот- реть закономерности введения метки этим методом в соеди- нения с разными свойствами, а затем привести данные о радиохимических характеристиках меченых препаратов, полученных в оптимальных для каждого класса соединений условиях.

а. Исследование зависимости степени твердофазного изотопного обмена от природы органических соединений

Рассмотрим результаты экспериментальных исследований влияния природы органических соединений на кинетику вве- дения в них метки и зависимости молярной радиоактивности полученных препаратов от температуры реакции.

В экспериментах по введению метки в кристаллические L-валин и L-аланин показано, что с повышением темпера- туры степень изотопного обмена в них плавно возрастает, а кинетические кривые выходят на плато. ^{47, 48}

Аналогичная картина наблюдается при введении метки в аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин (табл. 4), деазагуанин и 3-индолилуксусную кислоту. ⁵¹

Кинетические закономерности изменения молярной радиоактивности пуриновых соединений и аминокислот схожи: кинетические кривые и кривые температурных зави- симостей степени включения метки выходят на плато.

Совсем по другому выглядят кривые, полученные для легкоплавких соединений липидной природы (рис. 1). Подобные виды зависимостей наблюдают и в случае других катализаторов (Pd/BaSO₄, Rh/C). ⁵² различающихся способ- ностью инициировать изотопный обмен и температурами, при которых достигаются максимальные молярные радио- активности. Появление максимумов на зависимостях можно объяснить следующим образом. В отличие от высокоплав- ких соединений, молекулы, например легкоплавкой жирной

Таблица 4. Относительная молярная радиоактивность аденина, гуанина, ксантина и гипоксантина (5% Pd/CaCO₃, τ = 60 мин) при различных температурах.^{49, 50}

T, °C	ОМР, %			
	аденин	гуанин	ксантин	гипоксантин
20	1.4	1.3	0.8	1.7
120	1.8	1.7	2.4	—
140	16.8	6.5	20.9	13.1
150	34.7	16.7	50.0	—
160	54.7	25.7	67.4	16.7
180	100	71.9	96.5	63.0
200	—	91	100	100
220	—	100	—	98.8

Примечание. Здесь и в других таблицах τ — продолжительность эксперимента; ОМР — относительная молярная радиоактивность; за 100% принята максимальная молярная радиоактивность в данной серии экспериментов.

кислоты, могут создавать определенную структурированную систему вокруг активных центров катализатора:⁵³ на поверхности катализатора имеется слой хемосорбированных молекул, играющих роль лигандов.^{54, 55} Такие системы более устойчивы к отравлению и дезактивации. С учетом сказанного, процессы, происходящие на поверхности катализатора при проведении твердофазной реакции изотопного обмена между газообразным тритием и легкоплавкими соединениями, можно описать следующей схемой. Сначала на поверхности катализатора происходит перераспределение адсорбированных молекул вещества с образованием упорядоченных систем из определенной части субстрата и активных центров катализатора. Основная же часть молекул перемещается свободно и вступает в контакт с такими упорядоченными образованиями. Поэтому скорость и степень обмена при введении метки в подобные вещества выше, чем в высокоплавкие соединения.^{52, 53} С увеличением температуры и продолжительности процесса степень изотопного обмена растет, но одновременно возрастает и скорость побочных процессов. Начиная с определенных температур происходит разрушение структурированного хемосорбированного слоя, что приводит к прекращению реакции изотопного обмена и к разложению в первую очередь наиболее

высокомолекулярной части препарата.⁵³ Этим обусловлено появление максимумов на графиках зависимостей молярной радиоактивности жирных кислот от температуры и времени проведения реакции изотопного обмена.^{52, 56}

Подобную закономерность наблюдали при введении метки в гексадекан, 6-кетопальмитиновую кислоту, метилстеарат, цетиловый спирт (см. рис. 1); положения максимумов и формы температурных зависимостей молярной радиоактивности для разных соединений могут существенно различаться.

Все попытки объяснить появление максимумов другими причинами (например, содержанием в активированном угле большого количества связанного водорода,⁵⁷ возгонкой части исследуемого соединения с поверхности катализатора, уменьшением каталитической активности металла при термической обработке^{58, 59}) не получили экспериментального подтверждения.

При дегазации катализатора и его термической дезактивации степень включения метки, например, в стеариновую кислоту действительно уменьшается, но общий экстремальный характер температурной зависимости не меняется (рис. 2).⁶⁰ Одним из доводов, подтверждающих предложенное объяснение характера этих кривых, могло бы быть исчезновение максимумов при нанесении стеариновой кислоты на сорбент, смешанный со стандартным катализатором только механически. Действительно, в этом случае из-за короткого времени реакции будет сильно затруднена возможность создания структурированной системы молекул стеариновой кислоты вокруг активных центров катализатора, и, следовательно, степень включения трития будет более равномерной для всех молекул органической кислоты. Поэтому следствием такой модификации условий твердофазной реакции должно быть некоторое снижение степени изотопного обмена.

Подобный эксперимент был проведен.⁶⁰ Метанольный раствор стеариновой кислоты смешивали с сорбентами Alusorb или Silasorb в отношении 1:10, растворитель удаляли, а остаток высушивали. Затем носитель с веществом тщательно растирали в ступке с катализатором и проводили реакции с алифатами этой смеси при различных температурах (табл. 5). Как видно из приведенных в таблице данных, при повышении температуры молярные радиоактивности препарата сначала увеличиваются, а затем меняются незначительно.

Таким образом, включение метки существенно зависит от агрегатного состояния субстратов в условиях проведения твердофазных реакций.^{52, 61}

При исследовании зависимости степени включения метки от длины углеродной цепи у гомологов жирных кислот,

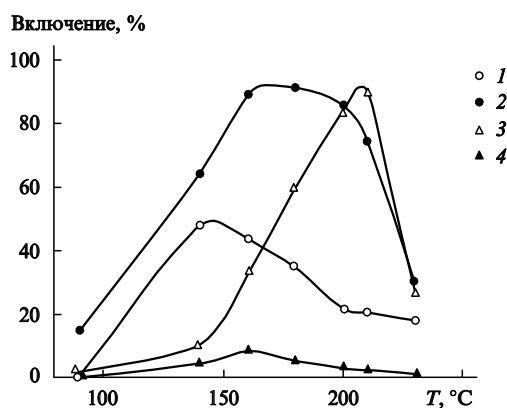


Рис. 1. Зависимость степени включения метки в субстрат от температуры реакции изотопного обмена.⁵² Условия реакции: τ = 15 мин; 5% Pt/C:гексадекан 10:1 (1); 5% Pt/C:6-кетопальмитиновая кислота 10:1 (2); 5% Pt/C:метилстеарат 10:1 (3); 5% Pd/C:цетиловый спирт 6:1 (4).

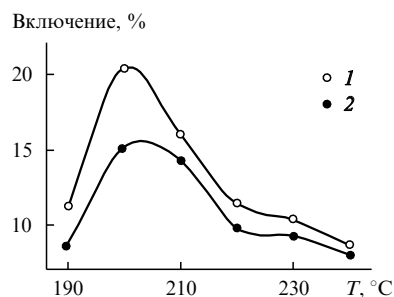


Рис. 2. Зависимость степени включения метки в стеариновую кислоту от температуры реакции изотопного обмена (10% Pd/BaSO₄).

1 — стандартный катализатор; 2 — катализатор, предварительно прокаленный при 240°C и давлении 0.1 Па.

Таблица 5. Относительная молярная радиоактивность меченой стеариновой кислоты при разных температурах изотопного обмена (5% Pd/BaSO₄, отношение катализатор : вещество 20 : 1, $\tau = 15$ мин) на катализаторе без носителя и с использованием дополнительного носителя.⁶⁰

$T, ^\circ\text{C}$	OMP, %		
	без носителя	Alusorb	Silasorb
190	42	46	47
200	71	76	80
210	82	81	82
220	100	79	81
230	48	75	84
240	36	82	83

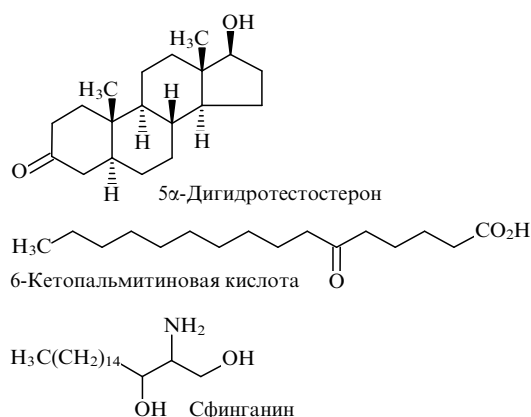
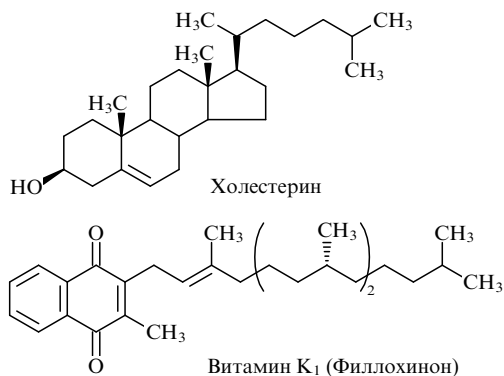
температура плавления которых значительно ниже температуры проведения изотопного обмена, наблюдалось линейное снижение молярной радиоактивности с уменьшением длины цепи. Следовательно, изотопный обмен для подобных веществ — вероятностный процесс. Отмечены еще некоторые закономерности. Например, температура, при которой наблюдалась максимальная степень изотопного замещения ($T_{\max}$), была для каждого гомолога разной. Так, для лауриновой ($T_{\text{пл}} = 44^\circ\text{C}$), миристиновой ($T_{\text{пл}} = 58^\circ\text{C}$), пальмитиновой ($T_{\text{пл}} = 64^\circ\text{C}$) и стеариновой ($T_{\text{пл}} = 70^\circ\text{C}$) кислот $T_{\max}$ составила 190, 200, 205 – 210 и 210°C соответственно.^{52, 62}

По-видимому, для представителей одного гомологического ряда (например, жирных кислот) $T_{\max}$ зависит от температуры фазового перехода (плавления). При определенной температуре диффузия таких молекул настолько возрастает, что эффективность изотопного обмена становится максимальной и не зависит от эффективности спилловера водорода. Проведение реакций при более высоких температурах приводит лишь к активизации побочных процессов.

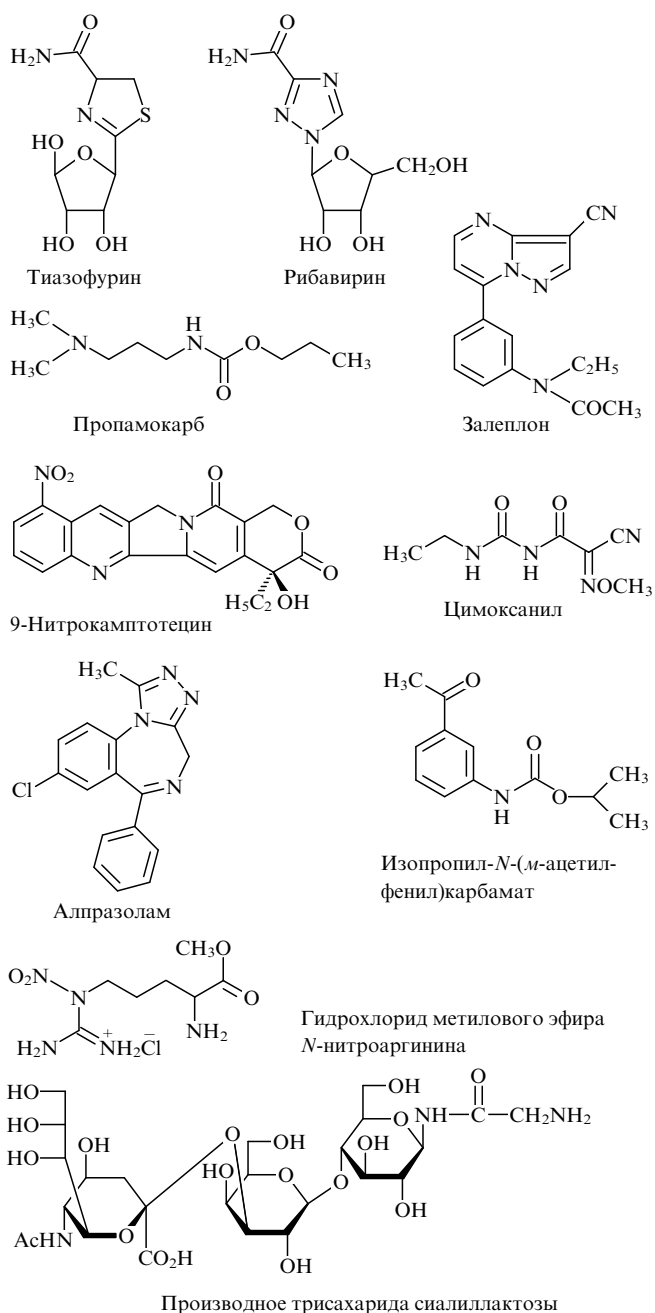
Однако такой однозначной зависимости молярной радиоактивности от количества атомов углерода в высокоплавких натриевых солях уксусной, пропионовой и масляной кислот не наблюдалось.⁶³ Очевидно, что для реакции изотопного обмена доступность массы вещества, находящейся на поверхности носителя в твердом (кристалл) и в жидком состояниях, существенно различна.

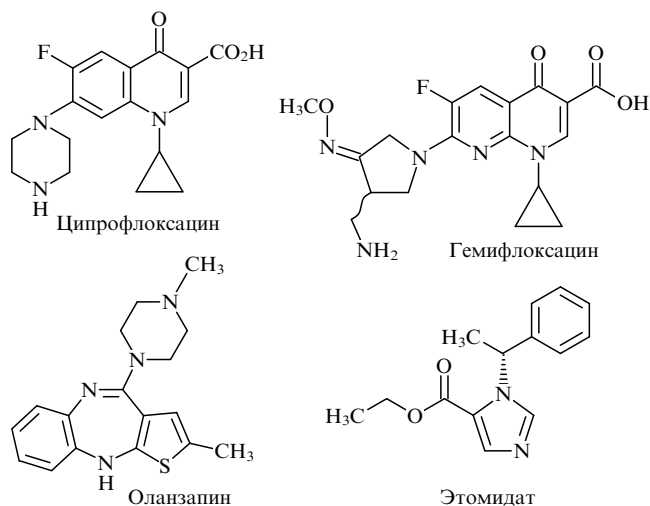
6. Введение тритиевой метки в липофильные соединения и в низкомолекулярные биорегуляторы твердофазным изотопным обменом

Соединения липидной природы сильно различаются по своей термической устойчивости и устойчивости к гидрогенолизу, они могут быть полярными и неполярными, алифатическими и ароматическими. Примеры таких соединений приведены ниже.



В этом разделе, наряду с липофильными, рассмотрены и другие вещества, которые нашли применение в фармакологии. Например:





Как правило, такие соединения полифункциональны и имеют фрагменты, лабильные в условиях твердофазных реакций. Многие из них (для удобства названных «фармпрепаратами») обладают гидрофобными свойствами, как и соединения липидной природы.

Для оптимизации условий введения метки в подобные соединения были исследованы зависимости степени изотопного обмена от температуры (в пределах 60–240°C) от отношения катализатор: вещество, от времени проведения реакции (в интервале 5–60 мин), от природы катализатора (5% Pt/C, 5% Pd/C, 5% Rh/C, 5% Pd/BaSO₄) и т.д.^{52, 56, 61–71} Например оказалось, что лучшие условия для введения метки в термически устойчивую изомасляную кислоту таковы: 5% Pd/C, 30 мин, 170°C (табл. 6).⁶³ В более жестких условиях выход меченого продукта снижался.

Таблица 6. Молярная радиоактивность (МР) меченой натриевой соли изомасляной кислоты при проведении твердофазной реакции изотопного обмена в разных условиях.⁶³

Условия реакции			МР, ПБк·моль ⁻¹
катализатор	τ, мин	T, °C	
5% Pd/BaSO ₄	60	210	5.26
	60	190	3.85
	60	170	2.78
5% Pd/C	60	210	5.04
	60	190	5.44
	60	170	5.26
	30	170	5.30
	20	170	5.22
	15	170	4.85
	5	170	4.11

При исследовании влияния строения близких по своим физико-химическим свойствам соединений на молярную радиоактивность меченых препаратов показано,⁶³ что вероятность включения трития, например в метильные группы изомасляной, пропионовой и масляной кислот, более чем в три раза выше, чем в метиленовые группы (табл. 7). Причины этого рассмотрены ниже.

В оптимальных условиях проведения твердофазных реакций, найденных методом оптимизации, получены различные по строению меченые препараты (табл. 8–10).^{50, 52, 53, 62, 65, 70–74}

Выше отмечено, что природу активированных частиц трития наиболее отчетливо можно проследить при их взаимодействии с ароматическими соединениями. Известно,^{45, 72}

Таблица 7. Молярные радиоактивности меченых органических кислот, полученных твердофазным изотопным обменом (5% Pd/C, T = 200°C).⁶³

Соединение ^a	МР, ПБк·моль ⁻¹	Количество введенной метки	
		на один атом водорода	на одну метильную группу
Уксусная кислота	1.20	0.40	1.20
Пропионовая кислота	3.18	0.64	2.62
Масляная кислота	3.74	0.53	2.62
Изомасляная кислота	5.56	0.79	2.64

^a В экспериментах использовали соединение в виде натриевой соли.

Таблица 8. Молярная радиоактивность алифатических соединений.

Соединение	МР, ПБк·моль ⁻¹ (см. ³)	Ссылки
6-Кетопальмитиновая кислота	27.5–27.8	52
Метилстеарат	38.0–40.0	62
Цетиловый спирт	5.0–5.5	52
Гексадекан	17.0–17.5	62
Холестерин	0.5–1.0	71
5α-Дигидротестостерон	0.52–0.56	53
5α-Дигидротестостерона энантиат	1.30–1.50	53
Сфинганин	7.78	69

^a Молярная радиоактивность препарата при введении одного атома трития составляет 1.08 ПБк·моль⁻¹.

Таблица 9. Молярная радиоактивность ароматических соединений (палладиевый катализатор, τ = 15 мин).

Соединение	T, °C	МР, ПБк·моль ⁻¹	Выход, %	Ссылки
3-(3-Пиридил)-5-фенилизоксазол	60	0.0004	25	64
Алпразолам	175	0.15	4	74
Камптотенин	190	0.96	7	70
Тиазофуриин	155	0.67	55	74
Рибавирин	160	1.11	80	74
Изопропил-N-(m-ацетил-фенил)карбамат	140	1.32	30	73
Гемифлоксацин	180	0.34	5	53
Оланзапин	200	0.63	10	62
Залеплон	180	0.19	2	62

что способность к электрофильному замещению для разных ароматических систем существенно различается. Она зависит от строения соединения и наличия заместителей, что показано, например, при измерении константы скорости изотопного обмена при образовании [8-³H]нуклеотидов аденинового ряда. На основании данных, полученных в работе⁷⁵, можно высказать предположение, что если активированными частицами водорода, которые вступают в реакцию с органическим соединением, являются положительно заряженные ионы трития, то в ряду рибавирин, тиазофуриин, залеплон, алпразолам степень включения метки должна понижаться. Действительно, в работах^{53, 74} показано, что в рибавирин метки включалось в 7–8 раз больше, чем в алпразолам. По-видимому, это связано с тем, что наибольшую вероятность электрофильного замещения можно ожидать в

Таблица 10. Условия введения тритиевой метки в низкомолекулярные биорегуляторы.

Соединение	Условия реакции		МР ^а	Выход, %	Ссылки
	катализатор	<i>T</i> , °C			
4-Этил-2,6,7-триокса-1-фосфабицикло-[2.2.2]октан-1-оксид	5% Pt/C	170	1.15	14	50
Натриевая соль α-метилгликозида <i>N</i> -ацетилнейраминной кислоты	5% Pd/CaCO ₃	200	0.46	25	76
Производное трисахарида сиалил락тозы	5% Pd/CaCO ₃	160	0.32	15	76
Пропамокارب	5% Pd/BaSO ₄	135	0.56	58	73
Цимоксанил	5% Pd/CaCO ₃	90	0.006	30	73

^а Размерность ПБк · моль⁻¹.

триазольном фрагменте рибавирина. Поэтому молярная радиоактивность рибавирина должна быть в данной серии экспериментов максимальной (см. табл. 9). Из-за присутствия атома серы в тиазольном фрагменте тиазофурина сильно дезактивирован, и электрофильное замещение происходит не столь эффективно.

Не все вещества в одинаковой степени выдерживают условия твердофазного изотопного обмена. Если химический выход гексадекана и цетилового спирта после реакции обмена составлял 80%, то меченые соединения, содержащие свободные амины, нейраминную кислоту и т.д., образуются с выходом менее 20%.^{61,69,76} Устойчивость препаратов может сильно различаться даже в случае соединений, близких по структуре (см. табл. 10). Например, выход натриевой соли α-метилгликозида *N*-ацетилнейраминной кислоты при 200°C почти в два раза выше, чем у производного трисахарида сиалил락тозы при 160°C. В работе⁷⁶ показано, что степень включения метки в натриевую соль α-метилгликозида *N*-ацетилнейраминной кислоты с повышением температуры от 160 до 200°C увеличивается в ~4 раза (табл. 11). Если бы производное трисахарида сиалил락тозы не разлагалось при 200°C, то можно было бы получить меченый препарат с молярной радиоактивностью > 1 ПБк · моль⁻¹.

Таблица 11. Относительная молярная радиоактивность меченой натриевой соли α-метилгликозида *N*-ацетилнейраминной кислоты (отношение катализатор : вещество 25 : 1) при разных условиях проведения твердофазного изотопного обмена.

Условия реакции			Выход, %	ОМР, %
катализатор	<i>T</i> , °C	τ, мин		
5% Pd/BaSO ₄	140	40	92	13
	180	5	75	39
5% Pd/CaCO ₃	140	40	95	16
	160	25	91	22
	180	5	74	46
	200	5	25	86
	220	5	8	100

Большой разброс значений выходов меченых препаратов характерен и для ароматических соединений. Соединения, содержащие триазольные, пиразольные, тиазольные фрагменты, более устойчивы при твердофазном методе введения метки, чем изоксазольные производные, однако выходы этих соединений в оптимальных с точки зрения получения высо-

кой молярной радиоактивности условиях составляли от 2 до 80% (см. табл. 9).

Таким образом, если препарат устойчив, то твердофазным методом можно получать меченые соединения с очень высокой молярной радиоактивностью. Для введения метки в лабильные соединения необходимо использовать модифицированные методики. Существуют два способа повышения выхода подобных соединений: 1) органические соединения наносят на дополнительный инертный носитель и механически смешивают с катализатором; 2) катализатор перед реакцией модифицируют.

в. Введение тритиевой метки в компоненты нуклеиновых кислот твердофазным изотопным обменом

Лучшим катализатором для введения тритиевой метки в пуриновые основания оказался 5% Pd/CaCO₃ (табл. 12). Зависимость молярной радиоактивности от температуры реакции для этих соединений характеризуется плавным увеличением до 140°C и резким подъемом в интервале 150–200°C (см. табл. 4).⁴⁹ Возможно, подъем связан с тем, что в изотопном обмене заметную роль начинают играть не катионы, а атомы трития.

Таблица 12. Молярная радиоактивность препаратов, полученных при введении тритиевой метки в пуриновые основания в разных условиях.

Соединение	Условия реакции ^а		МР (см. ^б)	Выход, %	Ссылки
	катализатор	<i>T</i> , °C			
Кинетин	Pd/BaSO ₄	140	5.56	12.5	49
6-Бензиламино-пури	Pd/CaCO ₃	190	5.74	13	77
Гуанин	Pd/CaCO ₃	200–210	0.83	75	75
Ксантин	Pd/CaCO ₃	200–210	0.93	75	75
Гипоксантин	Pd/CaCO ₃	200–210	1.90	67	75
Аденозин	Pd/CaCO ₃	200–210	0.89	93	75
2'-Дезокси-гуанозин	Pd/CaCO ₃	200–210	1.56	17	75

^а Во всех экспериментах τ = 30 мин. ^б Размерность ПБк · моль⁻¹.

В работах^{75,78–80} описано введение метки в разные по своей устойчивости компоненты нуклеиновых кислот (табл. 13). Из приведенных в таблице данных видно, что высокая степень замещения против трития достигается в соединениях относительно простого строения. При введении метки в их полимерные производные, а также в соединения, содержащие лабильные фрагменты, реакции приходилось проводить при относительно невысоких температурах, что существенно сказывалось на молярных радиоактивностях меченых препаратов. Основными побочными продуктами при использовании этого метода были продукты гидрирования, изомеризации и деструкции.

Для повышения молярной радиоактивности лабильных соединений использовали дополнительные носители, что позволило проводить реакции при более высоких температурах (табл. 14).⁵¹ Как видно из данных, приведенных в таблице, с увеличением отношения катализатор : вещество возрастает степень включения трития при одновременном снижении выхода меченого препарата. При использовании дополнительных носителей и смеси 5% Pd/CaCO₃ с индолил-3-уксусной кислотой, нанесенной на Al₂O₃, выход искомого продукта повысился до 12.5%. Данные ЯМР ³H показали, что распределение метки при 200°C равномерное по всем

Таблица 13. Молярная радиоактивность пуриновых, пиримидиновых соединений и их производных, полученных твердофазным изотопным обменом.^{50, 78–80}

Соединение	<i>T</i> , °C	МР ^a	Соединение	<i>T</i> , °C	МР ^a
Аденин	170	2.01	2',3'-Дидезокси-тимидин	120	2.44
Тимин	170	4.30	3'-Азидотимидин-фосфонат	120	2.33
Урацил	170	1.82	Ацикловир-фосфонат	120	2.07
Бензиладенин	190	6.67	2',5'-АрАрАр	200	2.15
Деазагуанин	220	0.44	3',5'-АрА	110	0.34
7-Тиа-8-оксо-гуанозин	170	0.01	3',5'-АрАрА	110	1.85
Теофиллин	160	0.92	3',5'-рАрАрАр	110	1.00
Фурфуриладенин	160	5.93	Поли-А (7-8S)	180	0.38 ^b
Гуанозин	210	2.56	Поли-У (12S)	180	0.44 ^b
2'-Дезокси-гуанозин	200	1.30	РНК 15S	180	0.45 ^b
3'-Азидотимидин	120	1.11			
Ацикловир	210	4.63			

^a Размерность ПБк · моль⁻¹.^b Удельная активность ТБк · г⁻¹.**Таблица 14.** Относительная молярная радиоактивность меченой индол-3-илуксусной кислоты при введении метки в различных условиях.⁵¹

Условия реакции				ОМР, %	Выход, %
I ^a	II ^b	III ^c	<i>T</i> , °C		
<i>Катализатор 5% Pd/CaCO₃</i>					
5:1	—	—	150	17.1	1.9
10:1	—	—	150	40.0	0.7
20:1	—	—	150	53.3	0.4
50:1	—	—	150	66.7	0.2
5:1	Al ₂ O ₃	10:1	200	100	12.5
<i>Катализатор 5% Pd/BaSO₄</i>					
5:1	CaCO ₃	10:1	200	84.4	3.2
5:1	CaCO ₃	50:1	200	—	—
5:1	Al ₂ O ₃	10:1	200	84.0	10.2
5:1	Al ₂ O ₃	50:1	200	44.0	6.0
<i>Катализатор 5% Pd/Al₂O₃</i>					
5:1	Al ₂ O ₃	10:1	200	55.6	5.3
5:1	Al ₂ O ₃	50:1	200	56.0	1.9

^a Отношение катализатор : вещество, мг · мкмоль⁻¹.^b Дополнительный носитель.^c Отношение дополнительный носитель : вещество, мг · мг⁻¹.**Таблица 15.** Молярная радиоактивность и доля трития (в %) в препаратах, полученных при включении метки в пуриновые основания.

Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹	Доля трития
Аденозин	4.44	48
Гуанозин	2.56	30
Ацикловир	4.78	14
АМФ	0.46	12
АТФ	0.46	13
НАД	4.10	1.3
Коэнзим А	0.07	89

Примечание. Здесь и в других таблицах АМФ — аденозин-5'-монофосфат, АТФ — аденозин-5'-трифосфат, НАД — никотинамиддинуклеотид.

стабильным положением трития в индол-3-илуксусной кислоте, что свидетельствует о существенном вкладе атомарного трития в процесс введения метки.

Доля трития в пуриновых основаниях зависит от природы исходного вещества.⁷⁹ Как видно из данных, приведенных в табл. 15, появление фосфатной группы снижает долю трития в пуриновой части молекулы. Возможные причины этого обсуждены ниже.

г. Введение тритиевой метки в аминокислоты и пептиды твердофазным изотопным обменом

Многие аминокислоты более термически устойчивы, чем нуклеиновые кислоты. В литературе имеются данные по твердофазному введению тритиевой метки в некоторые аминокислоты (табл. 16).⁸¹ Так, при 220 °C распределение метки в валине при атомах углерода (α : β : γ) описывается соотношением 1 : 1 : 6 (τ = 20 мин, 5% Pd/C : вещество 10 : 1). Распределение метки (%) в [2,3-³H]аланине в тех же условиях следующее.⁸¹

Соединение	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3
CH _n ³ H _{3-n} C ³ NNH ₂ CO ₂ H	3	15	22	5
CH _n ³ H _{3-n} CHNNH ₂ CO ₂ H	5	17	23	7

При высоких температурах степень изотопного обмена при всех атомах углерода аминокислот оказывается одного порядка.

Иные данные получены при более низких температурах.⁸² Изучено распределение трития в молекуле (*R*)-4-гидрокси-[G-³H]-L-пролина, который синтезирован при нагревании (150 °C) в течение 60 мин смеси 5% Rh/Al₂O₃ с активированным углем Norit, пропитанным водным раствором аминокислоты и затем лиофилизированным (отношение катализатор : Norit : (*R*)-4-гидрокси[G-³H]-L-пролин 10 : 50 : 1). Отношение энергии активации (*E_a*) водородного обмена при данном углеродном атоме к энергии активации (*E*) водородного обмена в метане следующее:

Положение метки	3β	3α	5α	5β	2	4
<i>E_a</i> : <i>E</i>	0.946	0.856	0.653	0.794	0.852	0.924
Содержание метки, %	1	6	59	21	9	4

При проведении твердофазного изотопного обмена в относительно мягких условиях прослеживается такая тенденция: чем меньше энергия активации обмена у данного атома углерода, тем больше замещение протия на тритий.

Использование дополнительного носителя способствовало повышению молярной радиоактивности и в случае аминокислот (табл. 17).⁴⁸ Как правило, применяли активированный уголь, оксид алюминия и карбонат кальция. Опи-

Таблица 16. Молярная радиоактивность, выход и оптическая чистота меченых аминокислот, полученных твердофазным изотопным обменом (200 °C, 60 мин).⁸⁶

Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹	Выход, %	Оптическая чистота, %
Глицин	1.8	90	—
Серин	1.4	50	75
Аланин	3.2	65	82
Валин	6.5	85	94
Лейцин	7.9	70	85
Изолейцин	8.1	75	88
Гистидин	4.5	20	50
Триптофан	3.6	30	70

Таблица 17. Молярная радиоактивность биотина и аминокислот, полученных твердофазным изотопным обменом с использованием различных дополнительных носителей.⁴⁸

Соединение	Условия реакции				МР, ПБК · моль ⁻¹
	I ^a	II ^b	III ^c	T, °C	
Катализатор 5% Pd/CaCO ₃					
Биотин	10 : 1	Al ₂ O ₃	10 : 1	200	1.6
L-Фенилаланин	16 : 1	Al ₂ O ₃	5 : 1	200	3.03
Катализатор 5% Rh/Al ₂ O ₃					
L-Метионин	10 : 1	Al ₂ O ₃	10 : 1	200	3.30
Катализатор 5% Pd/BaSO ₄					
L-Гистидин	10 : 1	CaCO ₃	10 : 1	220	4.60

^a Отношение катализатор : вещество, мг·мкмоль⁻¹.

^b Дополнительный носитель.

^c Отношение дополнительный носитель : вещество, мг·мг⁻¹.

санная методика позволила получить различные по устойчивости меченые соединения с высокой молярной радиоактивностью.

В работе⁸³ показано, как один и тот же дополнительный носитель, например углерод, приготовленный по разным технологиям, может влиять на степень включения метки (табл. 18). Так, на углерод Norit или волокнистый углерод наносили фенилаланин в отношении 10:1. Образовавшиеся смеси механически объединяли с 5% Pd/C в отношении 1:1. После обработки тритием ($T = 130^{\circ}\text{C}$, $\tau = 25$ мин) определяли выход и молярную радиоактивность меченого фенилаланина.

Оказалось, что при использовании 5% Pd/C выход составил только 1%, а в случае смеси 5% Pd/C с углеродом Norit выход был еще ниже — 0.1%. Больших выходов и молярной радиоактивности (при 140°C) удалось добиться при использовании волокнистого углерода. Аналогичные результаты получены при смешении систем волокнистый углерод–фенилаланин с 5% Pd/CaCO₃, 5% PdO/BaSO₄ и 5% PdO/Al₂O₃ (см. табл. 18). Выходы фенилаланина при использовании волокнистого углерода были в 15–20, а молярные радиоактивности в 1.5–2 раза выше, чем для обычно используемого в таких реакциях активированного угля Norit.

Авторы работы⁸³ связали это с тем, что волокнистый углерод состоит из очень тонких графитовых слоев (толщина 30–500 Å), уложенных в высокоупорядоченные структуры,⁸⁴ поэтому он адсорбирует водорода примерно на порядок

больше, чем обычный уголь. Кроме того, наблюдались существенные различия количеств водорода, адсорбированного и десорбированного при комнатной температуре из графитовых нановолокон, что свидетельствует о хемосорбции водорода на углероде. Это было подтверждено методом температурно-программированной десорбции.⁸⁴ Следовательно, волокнистый углерод как носитель имеет определенные преимущества перед другими веществами-носителями. Бóльшее насыщение молекулами трития всего объема реакционной массы должно положительно сказаться на эффективности его спилловера и привести к увеличению концентрации активированных частиц трития непосредственно в зоне реакции.

Более высокий выход меченых органических соединений позволяет получать приемлемый выход меченых препаратов при более высокой температуре (на $35–45^{\circ}\text{C}$ выше, чем при стандартной методике). А это, в свою очередь, дает возможность значительно повысить их молярную радиоактивность, например в случае фенилаланина — в ~ 3 раза.⁸³

Еще одним эффективным способом повышения молярной радиоактивности термически неустойчивых препаратов оказался метод, при котором смесь вещества с катализатором перед реакцией обрабатывали солями переходных металлов. Так, в работе⁸⁵ были использованы соли родия при введении метки в аминокислоты. Как отмечалось выше, можно увеличить молярную радиоактивность меченых соединений, создав условия для более эффективного спилловера водорода, при которых реакция изотопного обмена осуществляется во всем объеме субстрата, а также повысив термическую стабильность вещества (в этом случае метку можно вводить при более высокой температуре). Чтобы выяснить роль треххлористого родия в процессе введения метки, его использовали для импрегнирования катализатора и носителя как по отдельности, так и совместно.

Из данных, представленных в табл. 19, видно, что RhCl₃ не столько стабилизирует аминокислоту, образуя с ней комплекс, сколько уменьшает деструктивное действие активированных частиц трития на субстрат. При обработке катализатора треххлористым родием и последующим его механическим смешиванием с носителем (волокнистый углерод или Al₂O₃), на который был нанесен фенилаланин, выход меченого продукта возрастал в 3–6 раз. При обработке носителя раствором RhCl₃ и фенилаланина с лиофилизацией образующейся смеси и последующим механическим смешиванием с катализатором выход меченого продукта возрастал только в 2–4 раза. В обоих экспериментах получали молярные радиоактивности одного порядка. Этот факт указывает на то, что RhCl₃ при использовании обычной методики (водный раствор аминокислоты и RhCl₃ лиофилизируют с катализато-

Таблица 18. Выход и относительная молярная радиоактивность меченого фенилаланина при проведении твердофазного каталитического изотопного обмена в различных условиях ($\tau = 25$ мин, $T = 130^{\circ}\text{C}$).⁸³

Условия реакции		Выход, % ОМР, %	
катализатор	носитель		
5% Pd/C	—	1	—
	Углерод Norit	< 0.1	—
	Волокнистый углерод	16	100
5% Pd/CaCO ₃	Углерод Norit	2	29
	Волокнистый углерод	39	44
5% PdO/Al ₂ O ₃	Углерод Norit	1.5	17
	Волокнистый углерод	41	35
5% PdO/BaSO ₄	Углерод Norit	2	22
	Волокнистый углерод	35	47

Таблица 19. Выход и относительная молярная радиоактивность меченого фенилаланина при разных способах модификации реакционных ингредиентов треххлористым родием ($\tau = 20$ мин, $T = 190^{\circ}\text{C}$, отношение носитель : фенилаланин 10:1, катализатор : носитель 1:1, фенилаланин : RhCl₃ 1:1).

Катализатор	Носитель	Выход, %	ОМР, %
5% PdO/BaSO ₄	Волокнистый углерод	4.2	100
	Волокнистый углерод/RhCl ₃	14.8	18
	То же	20.5	21
5% PdO/BaSO ₄ /RhCl ₃	»	31.1	9
	—	1.5	48
5% PdO/BaSO ₄	Al ₂ O ₃	8.9	83
5% PdO/BaSO ₄ /RhCl ₃	Al ₂ O ₃ , RhCl ₃	17.2	44
	Al ₂ O ₃	30.4	42

ром) не только стабилизирует лабильные соединения, но одновременно и модифицирует инициатор спилловера водорода. По-видимому, при соосаждении солей родия на палладии с последующим нагреванием в атмосфере газообразного трития образуются биметаллические активные центры, которые приобретают новые свойства как адсорбента, так и инициатора спилловера водорода. Подобные явления подробно рассмотрены авторами работы⁸⁶ при исследовании влияния технеция на эффективность твердофазного изотопного обмена.

При сравнении каталитической активности моно- (Pd или Pt) и биметаллических (Pd–Tc или Pt–Tc) систем показан неаддитивный рост каталитической активности (синергизм) в случае биметаллических катализаторов по сравнению с активностью металлов-катализаторов, используемых в тех же условиях раздельно.⁸⁷ Одни исследователи объясняют эффект синергизма тем, что водород активируется на одних активных центрах, а реакции происходят на других.^{88–91} В соответствии с такой моделью предполагается, что между этими центрами существенно возрастает спилловер водорода. Другие исследователи считают главной причиной синергизма взаимодействие атомов одного металла-катализатора с другим.^{92–102} В этом случае водород активируется и реагирует в пределах одной и той же фазы, т.е. происходит миграция активированных частиц водорода с одного атома металла на другой в пределах биметаллического активного центра.

В экспериментах с использованием твердофазной методики степень включения метки в аминокислоты в присутствии биметаллических катализаторов была ниже, чем в присутствии монометаллических катализаторов.⁸⁶ Это свидетельствует о том, что на биметаллических катализаторах не происходит активации спилловера трития, а активированные частицы трития просто мигрируют с одного атома металла на другой в пределах общего каталитического центра. Действительно, способность сорбировать водород у биметаллических катализаторов ниже, чем у монометаллических,⁸⁷ что обычно связывают с уменьшением эффективности спилловера водорода.

Таким образом, повышение устойчивости аминокислот, наблюдаемое при модификации катализатора солями родия, связано в основном с тем, что взаимодействие молекул этих соединений с активированными частицами трития на биметаллических катализаторах меньше, чем на монометаллических. Поэтому при твердофазном введении метки на металлах-катализаторах после обработки последних солями родия степень распада исходного вещества уменьшается, что позволяет проводить реакции изотопного обмена при более высоких температурах. Так, без использования солей родия при повышении температуры на 60°C (отношение 5% PdO/Al₂O₃:аминокислота 10:1, τ = 30 мин, давление трития 350 гПа) выход глицина снизился в ~20 раз, а ω -аминокапроновой кислоты — в 5 раз.⁸⁵

T , °C	160	180	200	220
Выход глицина, %	66	21	5	3
Выход ω -аминокапроновой кислоты, %	4.8	1.8	1.2	0.9

При обработке катализатора треххлористым родием оказалось, что снижение выхода меченых аминокислот с ростом температуры существенно замедляется (табл. 20). Последнее обстоятельство позволило ввести метку в термически нестабильную ω -аминокапроновую кислоту при 180°C (молярная радиоактивность продукта 0.85 ПБк·моль⁻¹, выход 45%).⁸⁵

Очевидно, создав условия для более эффективного взаимодействия активированных частиц трития с молекулами субстрата, также можно повысить степень изотопного обмена.

Таблица 20. Выход и относительная молярная радиоактивность меченых аминокислот, при проведении твердофазного изотопного обмена в различных условиях (отношение 5% Pd/CaCO₃:RhCl₃ 8:1).⁸⁵

Соединение	τ , мин	T , °C	Выход, %	ОМР, %
Глицин	20	200	83	30
	30	210	75	35
	60	210	73	37
	120	210	71	40
	20	240	45	70
	10	260	30	93
ω -Аминокапроновая кислота	15	170	42	80
	15	200	14	100

Для более успешного введения тритиевой метки в высокоплавкие соединения можно использовать 4-диметиламинопиридин (табл. 21).⁸⁵ Многие реакции, связанные с участием протонов, могут осуществляться только в присутствии этого соединения.¹⁰³ По-видимому, оно при соосаждении с субстратом может облегчить диффузию катионов трития в объем вещества и тем самым повысить вероятность изотопного обмена. Данные, приведенные в табл. 21, подтверждают правомерность такой гипотезы. Но делать более определенные выводы пока рано. Очевидно, что подобные твердофазные реакции можно проводить только при относительно низких температурах, иначе тритий будет включаться в 4-диметиламинопиридин, что приведет к снижению молярной радиоактивности меченого препарата и заметно осложнит его выделение и очистку.

Таблица 21. Выход и относительная молярная радиоактивность фенилаланина при различных способах нанесения 4-диметиламинопиридина (τ = 20 мин, отношение 5% Pd/CaCO₃: вещество 10:1, отношение фенилаланин:4-диметиламинопиридин 1:1, T = 160°C).

Условия проведения реакции	Выход, %	ОМР, %
Смесь катализатор–фенилаланин	31.4	38
Смесь катализатор–фенилаланин, обработанная 4-диметиламинопиридином	20.0	56
Смесь катализатор–4-диметиламинопиридин, обработанная фенилаланином	14.4	85
Катализатор, обработанный раствором фенилаланина и 4-диметиламинопиридина	10.4	100

Как и в случае соединений липидной природы, степень замещения трития на тритий в метильных группах аминокислот, как правило, доминирует над включением метки в метиленовые группы и при изотопном обмене у третичного углеродного атома (табл. 22).¹⁰⁴

Данные о распределении метки в ароматических аминокислотах и их относительной реакционной способности приведены в табл. 23.¹⁰⁴ Видно, что степень изотопного обмена наибольшая в гистидине, причем основная часть метки обнаруживается в ароматическом кольце. Для других ароматических аминокислот наблюдается та же закономерность. Степень изотопного обмена в зависимости от природы аминокислот изменяется в последовательности:¹⁰⁴ основные аминокислоты > алифатические аминокислоты, не содержащие ионных группировок > кислые аминокислоты.

Для введения метки в пептиды часто применяют жидкофазные методы гидрирования и дегалогенирования их предшественников, полученных многостадийными синтезами. В большинстве случаев используют производные, молекулы которых включают дегидропролин, иодфенилаланин или диодтирозин.¹⁰⁵ Молярная радиоактивность препаратов,

Таблица 22. Относительная реакционная активность аминокислот в твердофазных реакциях изотопного обмена и распределение трития в меченых соединениях ($T = 150^\circ\text{C}$).¹⁰⁴

Соединение	Относительная реакционная активность	Доля (%) метки при атомах углерода с разной степенью замещения		
		RCH_3	RR^1CH_2	$\text{RR}^1\text{R}^2\text{CH}$
Аланин	0.52	96	—	4
Аспарагин	0.75	—	60	40
Аспарагиновая кислота	0.25	—	60	40
Треонин	0.76	73	9	18
Лейцин	1.04	86	5	9
Изолейцин	0.95	86	5	9
Валин	1.0	92	—	8

Таблица 23. Относительная реакционная активность ароматических и гетероароматических аминокислот и серотина в твердофазных реакциях изотопного обмена и распределение трития в меченых соединениях ($T = 150^\circ\text{C}$).¹⁰⁴

Соединение	Относительная реакционная активность ^a	Доля (%) метки в разных положениях		
		α -положение	β -положение	кольцо
Гистидин	1.10	20	4	76
Фенилаланин	0.77	13	40	47
Триптофан	0.96	11	24	65
Тироксин	0.72	11	35	54
Серотонин	1.2	35	7	58

^a В качестве репера использовали валин.

полученных этим методом, в зависимости от предшественника составляла 0.77–2.35 ПБк·моль^{–1}.

Синтез пептидов обычно проводят или в растворе, или в твердой фазе. Получение предшественника — очень трудоемкая и дорогая стадия. Поэтому более перспективным, как правило, оказывается твердофазный изотопный обмен между газообразным тритием и пептидом.

Пептиды — более лабильные соединения, чем аминокислоты. Кроме того, существует проблема рацемизации по α -положениям аминокислотных остатков в процессе введения метки. Поэтому меченые пептиды получают, проводя реакции при относительно низких температурах (табл. 24).¹⁰⁶ Распределение метки в этих пептидах по аминокислотным остаткам было примерно одинаковым, но наиболее реакционноспособным при изотопном обмене с тритием оказался водород при α -углеродных атомах аминокислот. Например, при введении метки в Met–Gly–His–Phe–Pro–Gly–Pro (140°C) в пептид включалось в среднем 1.44 атома трития, при этом 88% из них находилось в α -положении аминокислотных остатков. При 180°C в этот пептид включалось уже 4.29 атома трития, при этом только 76% трития находилось в α -положении аминокислотных остатков.¹⁰⁶ Таким образом, наблюдалась та же закономерность: чем выше температура, при которой проводили реакцию, тем более равномерно распределялась метка (табл. 25).

Исследование влияния строения пептида на распределение метки между аминокислотными остатками проводили на модельных трипептидах.¹⁰⁴ Как видно из данных, приведенных в табл. 26, при 150°C наблюдается неравномерное включение метки. Например, распределения трития в Gly(I) и Gly(II) в пептиде Gly–Gly–Val различаются в ~5 раз.

Таблица 24. Молярная радиоактивность меченных тритием пептидов ($T = 140^\circ\text{C}$, для введения метки использовали дополнительный носитель или родиевый комплекс с пептидом).¹⁰⁶

Пептид	МР, ПБк·моль ^{–1}
Tyr–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Arg	1.68
Thr–Lys–Pro–Arg–Pro–Gly–Pro	1.96
Met–Gly–His–Phe–Pro–Gly–Pro	1.74
Tyr–Ala–Gly–Phe–Tyr–Pro	1.63
Gly–Leu–Leu–Asn–Leu–Lys	1.40
Tyr–Pro–Arg	1.44
Tyr–D-Ala–Gly–Phe–Gly(OH)	1.78
Gly–Asn–NH ₂	1.42
Tyr–Pro–Pro–Gly–Gly–Ser–Lys–Val–Ile–Leu–Phe	2.33
Tyr–Ala–Gly–Phe–Leu	1.67
Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu–Arg	1.11
Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu	0.89
Met–Glu–His–Phe–Pro–Gly–Pro	1.69

Таблица 25. Распределение трития в меченом трипептиде His–Gly–Gly при различных температурах.¹⁰⁴

$T, ^\circ\text{C}$	МР, ПБк·моль ^{–1}	His	Gly(I)	Gly(II)
135	1.85	$\frac{86}{17.2}$	$\frac{5}{2.5}$	$\frac{9}{4.5}$
150	4.07	$\frac{72}{14.4}$	$\frac{12}{6}$	$\frac{16}{8}$
170	6.30	$\frac{63}{12.6}$	$\frac{16}{8}$	$\frac{21}{10.5}$

Примечание. Над чертой — доля метки в данной аминокислоте (в %), под чертой — доля метки в данной аминокислоте, приходящаяся на один атом водорода (в %).

Таблица 26. Распределение трития в меченых трипептидах ($T = 150^\circ\text{C}$).¹⁰⁴

Пептид	МР, ПБк·моль ^{–1}	Выход, %	Распределение метки, %		
			His (или Val)	Gly(I)	Gly(II)
His–Gly–Gly	4.07	40	72	12	16
Gly–His–Gly	2.41	25	62	30	8
Gly–Gly–His	2.59	12	57	29	14
Val–Gly–Gly	2.59	45	72	10	18
Gly–Val–Gly	1.41	30	13	59	28
Gly–Gly–Val	1.74	32	6	79	15

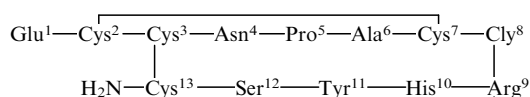
Метка при введении трития в одинаковые аминокислотные остатки обнаруживается преимущественно в концевых аминокислотах, а если оба остатка концевые, то включение происходит предпочтительно в аминокислотный остаток, находящийся на N-конце пептида. При этом характер распределения метки внутри аминокислоты, когда она включена в пептид и когда она находится в свободном состоянии, идентичен. При 180°C молярная радиоактивность Val–Gly–Gly достигает 7.70 ПБк·моль^{–1}. Общее замещение трития на тритий при этом составляет 70%. Следует отметить, что рацемизация не превышала 1%, что соответствует точности эксперимента.¹⁰⁴

Интересные результаты получены при введении тритиевой метки в даларгин (Tyr–D-Ala–Gly–Phe–Leu–Arg), синтетический аналог эндогенного опиоидного пептида [Leu⁵]энкефалина (Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu), который в ка-

честве лекарственного препарата используют в гастроэнтерологии.¹⁰⁷ В соответствии с температурной зависимостью степени изотопного обмена, изотопная метка включалась во все аминокислотные фрагменты даларгина (отношение 5% Rh/Al₂O₃ : пептид : Al₂O₃ равно 2 : 1 : 20). При 140°C большей реакционной способностью обладали остатки аланина и глицина, а при 190°C возрастала доля трития, включенного в ароматические остатки фенилаланина и тирозина. Оптимальными для введения метки оказались условия: 160°C, выдерживание в атмосфере газообразного трития в течение 40 мин; при этом меченый пептид имел молярную радиоактивность 1.93 ПБк · моль⁻¹. Такой пептид полностью сохранил биологическую активность, которую оценивали по способности связываться с опиодными рецепторами головного мозга крыс.

При введении метки в более сложные аминокислотные последовательности возникают ситуации, когда одна часть молекулы вещества может экранировать другую от взаимодействия с активными частицами трития. При этом распределение метки вдоль аминокислотной цепи перестает быть примерно одинаковым.¹⁰⁸

Например, распределение метки в α -конотоксине G1



(отношение 5% Rh/Al₂O₃:пептид:Al₂O₃ равно 5:2:50, $T = 140^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ мин, молярная радиоактивность меченого препарата 1.30 ПБк·моль⁻¹) было следующим:

Амино- кислот- ный фраг- мент	Glu ¹	Cys ²	Cys ³	Cys ⁷	Gly ⁸	Arg ⁹	His ¹⁰	Tyr ¹¹	Ser ¹²	Cys ¹³
Доля три- пептидной метки, %	3.33	6.80	8.93	7.80	2.61	1.64	50.56	4.08	3.55	8.92

Менее 2% метки содержится во фрагменте $\text{Asn}^4\text{--Pro}^5\text{--Ala}^6$. Вероятно, низкая реакционная способность этих остатков связана с особенностями пространственного строения данного пептида. По-видимому, характер распределения трития в пептидной цепи определяется не только способностью к изотопному обмену, но и доступностью того или иного аминокислотного фрагмента для активированных частиц трития, а также конформационными факторами, связанными с возможностью реализации S_{Ei} переходного состояния (см. ниже). Действительно, согласно данным ЯМР ^1H , участок $\text{Asn}^4\text{--Pro}^5\text{--Ala}^6\text{--Cys}^7$ в отличие от остальной части молекулы исследуемого пептида имеет жесткую конформацию.¹⁰⁹ Вместе с тем экстремально высокую степень изотопного обмена при атоме C(2) в гистидиновом остатке можно объяснить сильным взаимодействием его имидазольного кольца с аргининовым фрагментом.^{109, 110}

Нативность меченого пептида была доказана не только хроматографическими и спектральными методами, но и полным сохранением биологической активности, например если судить по связыванию с никотиновым ацетилхолиновым рецептором.

Разработаны подходы, которые позволили вводить метку и в белки (табл. 27).^{28, 104}

Протеолитическая активность меченой коллагеназы измерена по азоказеину и составила >70% от исходной. Меченый коллаген сохранил растворимость, устойчивость к действию трипсина и способность образовывать в растворе фибриллы, доступные для гидролиза коллагеназами микроорганизмов и беспозвоночных. На примере β -глюкозидазы

Таблица 27. Условия получения, радиохимические и биологические характеристики меченных тритием белков.

Белок	$T, ^\circ\text{C}$	Выход, %	Удельная радиоактивность, мКи · мг ⁻¹	Биологическая активность, %
Коллагеназа	80	25	25	70
Коллаген	60	10	8	—
Лихеназа	60	40	28	80
β -Глюкозидаза	20	55	7	86
	40	40	20	75
	60	30	70	28
	80	10	200	12

были исследованы температурные зависимости химического выхода, молярной радиоактивности и биологической активности. Естественно, что с повышением температуры выход и биологическая активность снижались, а молярная радиоактивность росла. Распределение метки между аминокислотными остатками в β -глюкозидазе отражают данные табл. 28.¹⁰⁴ Третий вкладывается во все аминокислотные фрагменты, но вклады каждого из них в общую радиоактивность белка существенно различаются.

Таблица 28. Распределение тритиевой метки между аминокислотными остатками в β -глюкозидазе ($T = 40^\circ\text{C}$, $\tau = 60$ мин).

Аминокислотный остаток	Мольная доля остатка	Доля радиоактивности, %	Аминокислотный остаток	Мольная доля остатка	Доля радиоактивности, %
Asp	3.0	2.2	Cys	0.1	0.1
Thr	10.2	5.9	Met	4.1	4.2
Ser	3.8	2.0	Ile	4.7	2.5
Glu	4.0	1.5	Leu	9.3	7.4
Pro	0.3	0.1	Tyr	3.8	6.7
Gly	11.1	2.4	Phe	5.0	13.4
Ala	9.9	5.2	Lys	8.1	20.7
Val	11.7	5.6	His	2.1	7.4
Trp	3.6	8.9	Arg	5.2	5.4

С учетом изложенного выше можно предположить, что при проведении твердофазных реакций существуют по крайней мере три температурные области, в которых метка включается по-разному. Границы этих зон строго не фиксированы, так как есть зависимость от условий проведения реакции и от природы субстрата. По-видимому, такой характер изменения эффективности включения трития в органические соединения можно объяснить следующим образом. В первой температурной зоне ($\sim 130 - 150^\circ\text{C}$) изотопный обмен происходит преимущественно с катионами трития. Во второй зоне ($\sim 150 - 220^\circ\text{C}$) участие в реакциях принимают как катионы, так и атомы трития. В третьей ($> 220^\circ\text{C}$) — включение метки осуществляется в основном с участием атомарного трития.

2. Твердофазное гидрирование тритием

Гетерогенное каталитическое гидрирование — еще один способ получения меченных тритием соединений. Твердофазное гидрирование проводят по тем же методикам, что и реакции твердофазного изотопного обмена. Для твердофазных реакций гидрирования характерны многие закономерности, присущие реакциям изотопного обмена, но есть и свои особенности. Так, гидрирование моно- и дисмещенных двойных углерод-углеродных связей происходит уже при

Таблица 29. Молярная радиоактивность и выходы меченых соединений при введении тритиевой метки твердофазным гидрированием.^{53, 62, 63, 68}

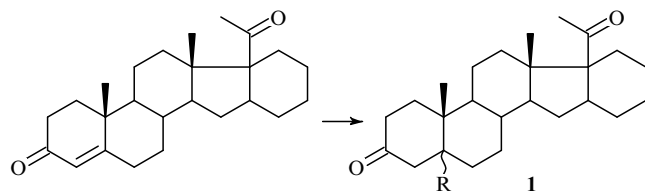
Исходное соединение	Условия реакции			MP ^a	Выход, ^b %
	катализатор	T, °C	τ, мин		
Аллиловый спирт	5% Pd/BaSO ₄	20	30	2.20	76
Бут-3-ен-1-ол	5% Pd/BaSO ₄	20	30	1.95	85
11-Цианоундекановая кислота	5% Rh/C	80	180	2.05	51
2,2,6,6-Тетраметил-4-оксопиперидин	5% Rh/C	80	180	4.80	57
2,2,6,6-Тетраметил-4-гидроксииминопиперидин	5% Rh/C	100	180	4.80	20
Бензиламин	5% Rh/Al ₂ O ₃	60	180	7.78	45
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Амино-2-(4-метилпиперидинил)метилциклогекс-4-ен	5% Pd/C	120	15	1.15	2
Метакриловая кислота	5% Pd/C	170	20	5.63	80

^a Размерность в ПБк·моль⁻¹.^b Выход восстановленного или гидрированного продукта.

комнатной температуре, а гидрирование ненасыщенных связей углерод—гетероатом, как правило, — в более жестких условиях (табл. 29).^{53, 62, 63, 68, 111}

Для проведения рецептурных или аналитических исследований необходимы меченые препараты с молярными радиоактивностями существенно более высокими, чем радиоактивности обычно получаемые при гидрировании двойных связей (1.85–2.04 ПБк·моль⁻¹ на одну связь). В этом случае твердофазный метод гидрирования более перспективен по сравнению со стандартной жидкофазной методикой. Это связано с тем, что параллельно с реакцией гидрирования при нагревании протекает и реакция изотопного обмена (см. табл. 29).

Например, при гидрировании метакриловой кислоты, которую обрабатывали газообразным тритием при 170°C на катализаторе 5% Pd/C, молярная радиоактивность меченой кислоты оказалась в ~3 раза выше, чем можно ожидать при восстановлении двойной связи.⁶³ Кроме того, используя твердофазное гидрирование, можно повысить (по сравнению с жидкофазным методом) выход меченого препарата. Такая ситуация часто складывается, если при гидрировании образуются изомерные продукты, например, как при восстановлении 16α,17α-циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона.



R = —H (5β,16α,17α-циклогексанопрегн-3,20-дион),
 $\text{—}^3\text{H}$ (5α,16α,17α-циклогексанопрегн-3,20-дион).

В результате реакции образуются насыщенные стероиды: изомеры 5α- и 5β,16α,17α-циклогексанопрегн-3,20-диона в соотношении 1 : 14. Из реакционной смеси удалось выделить не более нескольких процентов 5α-изомера, его препаративные количества (соотношение в реакционной массе 1 : 3)

Таблица 30. Соотношение (*z*), количества (*m*₁, *m*₂) и молярная радиоактивность 5α- и 5β-изомеров соединения **1** в реакционной смеси при различных температурах.

T, °C	<i>z</i>	<i>m</i> ₁ , мг·мг ⁻¹	<i>m</i> ₂ , мг·мг ⁻¹	MP, ^a отн. ед.
80	1 : 3	0.16	0.46	1.04
100	1 : 2.7	0.17	0.45	1.27
110	1 : 2.1	0.20	0.41	1.49
140	1 : 1.8	0.15	0.28	2.84
170	1 : 1.5	0.08	0.13	—

^a За единицу принята радиоактивность насыщенных стероидов, полученных жидкофазным методом.

удалось получить, используя твердофазное гидрирование.¹¹² Такое различие можно объяснить тем, что в случае жидкофазного гидрирования реакция идет на активных центрах катализатора, а при использовании твердофазного метода на атомах металла-катализатора генерируются активированные частицы трития, вступающие в реакцию с молекулой стероида. Очевидно, что при адсорбции стероида на активных центрах катализатора при гидрировании в растворе влияние стерических факторов максимально, если же активные частицы трития атакуют двойные связи молекулы субстрата, адсорбированной на носителе, образование 5α-изомеров более вероятно.

Зависимость соотношения 5α- и 5β-изомеров от температуры реакции можно проследить по данным табл. 30, в которой приведены также количества изомеров в реакционной смеси, если в реакцию вводили 1 мг вещества.

Для твердофазного гидрирования ненасыщенных связей углерод—гетероатом необходимо тщательно выбирать условия введения метки. Например, для синтеза меченого этаноламина в качестве предшественника использовали нитрил гликолевой кислоты. Этот предшественник восстанавливали в присутствии 5% Pt/C, 5% Pd/C, 5% Rh/Al₂O₃, 5% Rh/CaCO₃.^{113–115} Оптимальными с точки зрения получения высокомеченного (1.04–1.48 ПБк·моль⁻¹) препарата оказались катализатор 5% Rh/C (табл. 31), температура 100°C и время реакции 20 мин. При использовании палладиевых катализаторов меченый препарат образуется с выходом 10–20% и молярной радиоактивностью 0.15–0.22 ПБк·моль⁻¹ (см.¹¹⁴). Такой невысокий выход можно объяснить тем, что на металлах-катализаторах про-

Таблица 31. Относительные молярные радиоактивности препарата, полученного восстановлением нитрила гликолевой кислоты (катализатор 5% Rh/C, отношение катализатор:вещество 5 : 1) при различных температурах и временах проведения реакции.

T, °C	ОМР, % (см. ^a)	τ, мин	ОМР, % (см. ^b)
20	11	5	26
50	31	10	50
70	55	15	80
90	67	20	100
100	100	30	92
120	85	40	78
140	66	50	57
160	33	60	29
180	13	75	16
190	6	90	11
		120	9
		150	6

^a Время реакции 20 мин. ^b Температура реакции 100°C.

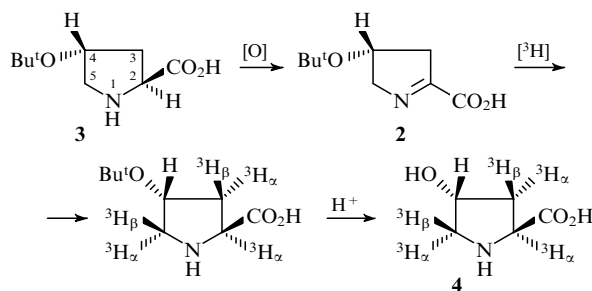
исходят параллельные реакции дегидратации, дезаминирования и другие.^{61, 69}

Примером твердофазного восстановления кето-группы может служить синтез [2-³H]инозита из *сцилло*-инозозы (пентагидроксициклогексанола) и 2,2,6,6-тетраметил-4-гидрокси-4-пиперидина из 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидина.^{62, 113} Для подбора оптимальных условий восстановления *сцилло*-инозозы использовали следующие катализаторы: 5% Pd/CaCO₃, 5% Rh/Al₂O₃, 5% Pd/BaSO₄, 5% Pt/C, 5% Pd/C. Лучшие результаты получены на родиевом катализаторе (отношение катализатор: субстрат составляло 10:1) при нагревании до 150°C в течение 15 мин (молярная радиоактивность меченого препарата 0.56 ПБк·моль⁻¹, выход 25%). 2,2,6,6-Тетраметил-4-оксопиперидин гидрировали на 5% Rh/C до 2,2,6,6-тетраметил-4-гидрокси-4-пиперидина (см. табл. 29).

Молярные радиоактивности при введении метки в первом и во втором случаях отличаются в ~9 раз, так как эффективность изотопного обмена сильно зависит от строения вещества. В первом случае кето-енольная таутомерия *сцилло*-инозозы затруднена, и метка включается только за счет гидрирования кетона. Во втором — до восстановления кето-группы успевают обменяться все четыре α-атома водорода. Последнее обстоятельство можно считать весомым аргументом в пользу образования ³H⁺ как активированной частицы при спилловере.

Кроме восстановления фрагмента C≡N до C³H₂NNH₂ и фрагмента C=O до C³(H)OH, есть сведения о гидрировании C=NOH до C³HNNH₂. Например, в работе⁶² описано восстановление 2,2,6,6-тетраметил-4-гидрокси-4-пиперидина до 2,2,6,6-тетраметил-4-аминопиперидина, при этом изотопный обмен идет столь же интенсивно, как и в случае восстановления 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидина (см. табл. 29).

Чтобы составить представление о механизме твердофазного гидрирования, было проведено исследование¹¹⁶ восстановления (R)-4-*трет*-бутоксид-4,5-дигидро-3H-пиррол-2-карбоновой кислоты (2), полученного из аминокислоты 3.



Соединение 2 наносили на оксид алюминия, высушивали, затем механически перемешивали с 5% Pd/BaSO₄ и подвергали лиофилизации (отношение катализатор: Al₂O₃: субстрат равно 10:20:1, T = 100°C, τ = 60 мин). После проведения реакции *трет*-бутильную защиту снимали обработкой реакционной смеси соляной кислотой, проводили очистку по методу, описанному в работах^{117–119}. Выход (R)-4-гидрокси-[G-³H]-L-пролина (4) — 23%, молярная радиоактивность — 1.85 ПБк·моль⁻¹. Изотопмер выделяли с выходом 4%. Распределение метки фиксировали методом ЯМР ³H. Распределение метки в пролине 4, полученном при гидрировании соединения 2 газообразным тритием при 100°C, следующее:

Положение метки	3β	3α	5α	5β	2	4
Содержание метки, %	29	20	0	35	16	0

В качестве реперного соединения использовали 4,5-дигидро-3H-пиррол-2-карбоновую кислоту. Распределение

метки в [G-³H]пролине (молярная радиоактивность 2.07 ПБк·моль⁻¹), полученном при гидрировании 4,5-дигидро-3H-пиррол-2-карбоновой кислоты при 100°C, следующее:

Положение метки	3β	3α	5	2	4
Содержание метки, %	34	34	6	26	0

По-видимому, на первой стадии гидрирования соединения 2 происходит захват катионов трития атомами азота и кислорода, в связи с чем подвижность водорода при третьем и пятом атомах углерода значительно возрастает, и у карбоксильной группы появляется возможность ориентироваться в *транс*-положение к 4-*трет*-бутоксигруппе. Поэтому гидрирование исходной двойной связи может сопровождаться присоединением трития в положения 2, 3 и 5. Направление атаки трития в положение 5 однозначно идет со стороны β-Н, атака в положение 3 определяется, с одной стороны, экранированием атома β-Н карбоксильной группой, а с другой — экранированием атома α-Н 4-*трет*-бутоксигруппой. Следовательно, содержание трития в α- и β-положениях при атоме C(3) должно быть сравнимо. Действительно, приведенные данные по распределению метки показывают, что в 5α-положении пролина 4 метка отсутствует, а отношение содержания метки при атоме C(3) 29:20 в пользу 3β-положения. Последнее, возможно, связано с тем, что метка в положении 2 пролина 4 появляется, по мнению авторов статьи¹¹⁶, за счет внутримолекулярного переноса трития из 3α-положения молекулы. Если при гидрировании 4,5-дигидро-3H-пиррол-2-карбоновой кислоты образуется рацемат, стерических затруднений для включения метки при атоме C(3) не возникает и основная часть трития оказывается в положении 3 молекулы этой аминокислоты. По этой же причине больше метки оказывается и в положении 2 молекулы пролина, поэтому вероятность включения трития в положение 5 падает в ~6 раз.

Если первой стадией твердофазного гидрирования является взаимодействие субстрата с катионами трития, то логично предположить, что после захвата катионов трития молекулами ненасыщенной аминокислоты возможны два варианта: 1) происходит захват электрона с образованием радикала, который вступает в реакцию рекомбинации с атомарным тритием; 2) происходит гидрирование с участием газообразного трития на центрах, созданных благодаря спилловеру.^{7–11} Наблюдаемые стерические эффекты дают основание считать, что непосредственное участие газообразного трития в процессе гидрирования может быть доминирующим.

В качестве примера на рис. 3 приведены кривые зависимости выхода меченой аминокислоты, полученной восстановлением 2-бензоиламино-3,3-диметилакриловой кислоты до N-бензоил[³H]валина (2.74 ПБк·моль⁻¹), от времени при разных температурах и давлениях газообразного трития.⁸¹ Видно, что с ростом температуры, времени и давления газообразного трития скорость гидрирования растет, но ниже 100°C реакция не доходит до конца,⁸¹ хотя уже при 60°C в результате спилловера трития происходит изотопное уравнивание практически всех лабильных водородов (при атомах азота, кислорода, серы и т.д.). По-видимому, это связано с тем, что при таких температурах металл-катализатор быстро насыщается водородом и дезактивируется (см. раздел IV).

Энергия активации гидрирования 2-бензоиламино-3,3-диметилакриловой кислоты (46.09 кДж·моль⁻¹) оказалась близка к энергии активации изотопного обмена между валином и газообразным тритием (50.28 кДж·моль⁻¹).^{81, 120} Последнее обстоятельство, по мнению авторов, указывает на то, что обе реакции лимитируются одной и той же стадией включения трития. Полученные значения согласуются с

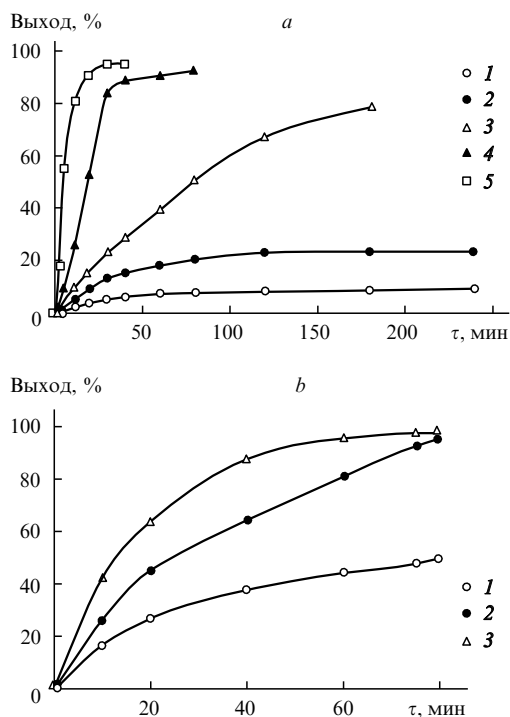


Рис. 3. Зависимость выхода меченого продукта твердофазного гидрирования 2-бензоиламино-3,3-диметилакриловой кислоты ($P = 333$ гПа, катализатор 5% Pd/BaSO₄) от времени реакции при разных температурах (а) и разных давлениях (б).
а: T , °C: 1 — 60, 2 — 80, 3 — 100, 4 — 120, 5 — 140;
б: P , гПа: 1 — 50, 2 — 150, 3 — 250; $T = 120$ °C.

хорошо известной величиной энергии активации твердофазных реакций гидрогенолиза на платиновых металлах.⁷ Можно утверждать, что этой стадией не является изотопный обмен, так как энергии активации изотопного обмена и гидрирования сильно зависят от природы субстрата и различаются даже для разных фрагментов молекулы одного и того же соединения. Вызывает сомнение, что лимитирующей стадией могут оказаться процессы, связанные с образованием активированного трития и спilloвером этих частиц в зону реакции. Так, в работе⁸¹ показано, что даже при 20 °C за 20 мин подвижные атомы водорода в молекуле 2-бензоиламино-3,3-диметилакриловой кислоты обмениваются на тритий. Поэтому наиболее правдоподобным является предположение, что приведенные выше значения энергии активации обусловлены необходимостью сближения катиона трития с атомом углерода органического соединения для образования переходного состояния.

Метод твердофазного гидрирования может быть применен для восстановления соответствующих производных уридина. Например, восстановлением 5-гидроксиметил-2'-дезоксирин-5'-монофосфата (7% Pd/BaSO₄, $T = 170$ °C, $\tau = 30$ мин) был получен тимидин-5'-монофосфат с молярной радиоактивностью 2.54 ПБк·моль⁻¹ и выходом 10%.¹²¹ Интересно, что использование реакций гидрирования как способа получения высокомеченных пуриновых и пиримидиновых соединений не дало никаких преимуществ по сравнению с изотопным обменом.⁷⁸ Например, при восстановлении 5-формилурацила и 5-гидроксиметилурацила до тимина меченые препараты были получены с молярной радиоактивностью 3.15 и 4.07 ПБк·моль⁻¹ соответственно,^{80, 122, 123} в то время как меченый тимин, полученный изотопным обменом, имел молярную радиоактивность 4.26 ПБк·моль⁻¹. При восстановлении 5-гидроксиметилдезоксирин-5'-монофосфата до тимина

дина молярная радиоактивность была еще ниже (2.82 ПБк·моль⁻¹).¹²⁴

3. Твердофазное дегалогенирование

Наиболее известной реакцией гидрогенолиза является каталитическое дегалогенирование. Если в качестве реагента используют газообразный тритий, то в результате дегалогенирования образуется тритийсодержащее соединение.

Обычно ароматические соединения дегалогенируют жидкофазным методом.¹⁰⁵ При этом образуются меченые препараты с молярной радиоактивностью 0.7–0.9 ПБк·моль⁻¹. Но жидкофазный метод, как правило, не позволяет вводить метку в насыщенные галогенсодержащие соединения в условиях, приемлемых для работы с газообразным тритием.

Впервые реакцию твердофазного каталитического дегалогенирования использовали для введения тритиевой метки в урацил.¹ В работе¹²⁵ детально исследованы особенности этой реакции при введении тритиевой метки в компоненты нуклеиновых кислот.

В работе⁶⁰ на примере дегалогенирования алифатических соединений показаны преимущества твердофазного метода. В качестве модельного соединения для отработки условий введения метки дегалогенированием алифатических соединений была выбрана 11-хлорундекановая кислота. Изучали зависимости включения метки от природы катализатора и температуры реакции как в саму 11-хлорундекановую кислоту, так и в образующуюся ундекановую кислоту (рис. 4).

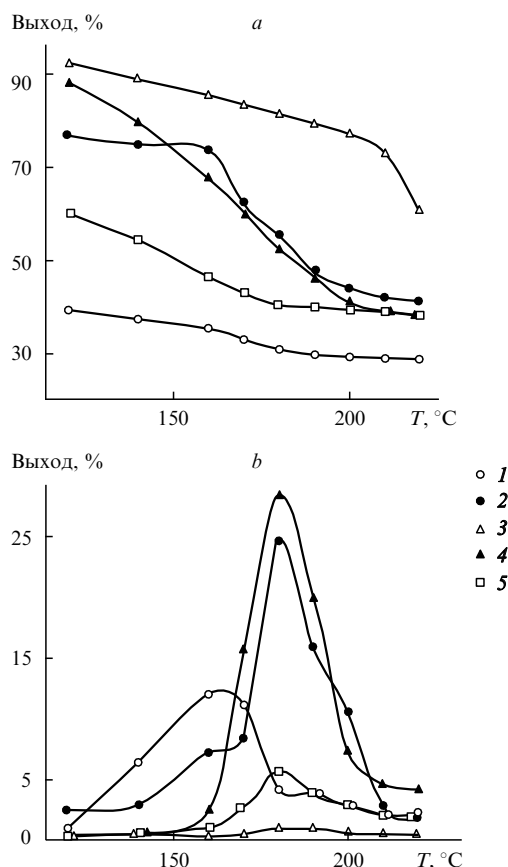


Рис. 4. Зависимость выхода меченых 11-хлорундекановой (а) и полученной из нее ундекановой кислоты (б) от температуры и природы катализатора (отношение катализатор:кислота 5:1, $\tau = 20$ мин).
1 — 5% Pt/C; 2 — 10% Pd/C; 3 — 5% Pd/C; 4 — 10% Pd/BaSO₄; 5 — 5% Rh/C.

При этом молярная радиоактивность 11-хлорундекановой кислоты достигала $6.30 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$, а полученной из нее ундекановой кислоты — $4.20 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$. Для сравнения: при дебромировании 3-бромпропионовой кислоты ($10\% \text{ Pd/C}$, 1 M NaOH , $\tau = 4 \text{ ч}$, $P = 905 \text{ rPa}$) образуется $[3\text{-}^3\text{H}]$ пропионовая кислота с молярной радиоактивностью $0.72 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см. ¹²⁶).

Как видно из приведенных данных, в оптимальных условиях ($10\% \text{ Pd/BaSO}_4$, $T = 180^\circ\text{C}$) выход ундекановой кислоты достигал 25–30%. Если ставилась задача ввести метку в исходное соединение, то реакцию проводили при 170°C и выход хлорсодержащего предшественника достигал 50–60% (см. рис. 4). При этом оказалось, что изотопный обмен в галогенсодержащих насыщенных кислотах происходил намного легче, чем дегалогенирование. По-видимому, это связано с тем, что галогены являются нуклеофильными агентами и могут быть удалены из молекулы органического соединения в данных условиях только в виде галогеноводорода. Поэтому твердофазное дегалогенирование алифатических соединений при относительно низких температурах менее вероятно, чем изотопный обмен. При высоких температурах, скорее всего реализуется радикальный механизм дегалогенирования.

Введение метки за счет твердофазного дегалогенирования подробно исследовано для бромзамещенных компонентов нуклеиновых кислот (табл. 32).^{75, 127}

В работе¹²⁷ показано, что степень дегалогенирования увеличивается с повышением содержания палладия на угле или с возрастанием отношения катализатор:вещество. Это связано с тем, что в качестве побочного продукта образуется бромистый водород, который дезактивирует катализатор. При достижении определенного отношения палладий:галогенсодержащий предшественник выход возрастал до 85–90% и далее не менялся. Поэтому авторы ввели для таких реакций понятие каталитической емкости катализатора. Эта величина равна количеству молей галогенпроизводного, которое определенное количество (навеска) палладиевого катализатора способна превратить в дебромированное соединение. В ходе исследования установлено, что данные соединения не могут мигрировать по поверхности носителя, поэтому каталитическая емкость зависит от температуры реакции и природы исходного галогенпроизводного.

Твердофазное дегалогенирование ароматических соединений менее перспективно, чем дегалогенирование в растворе

Таблица 32. Молярные радиоактивности меченых гетероароматических соединений, полученных твердофазным дебромированием ($5\% \text{ Pd/C}$, $T = 100^\circ\text{C}$, $\tau = 120 \text{ мин}$; положение трития соответствует положению брома в предшественнике).

Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹	Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹
$[5\text{-}^3\text{H}]$ Урацил	0.60	$[8\text{-}^3\text{H}]$ Гуанозин-5'-монофосфат	0.19
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Гуанин	0.46	$[5\text{-}^3\text{H}]$ Уридин-5'-монофосфат	0.10
$[5\text{-}^3\text{H}]$ Цитидин	0.60	$[5\text{-}^3\text{H}]$ Цитидин-5'-монофосфат	0.22
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Гуанозин	0.25	$[8\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезоксиаденин-5'-монофосфат	0.08
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Аденозин	0.39	$[8\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезокси-гуанозин-5'-монофосфат	0.06
$[5\text{-}^3\text{H}]$ Уридин	0.43	$[5\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезоксцитидин-5'-монофосфат	0.06
$[5\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезоксиуридин	0.68		
$[5\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезоксицитидин	1.22		
$[8\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезоксиаденин	0.61		
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Аденозин-5'-монофосфат	0.18		

Таблица 33. Молярные радиоактивности меченых ароматических соединений, полученных реакцией дебромирования в растворе (положение трития соответствует положению брома в предшественнике).

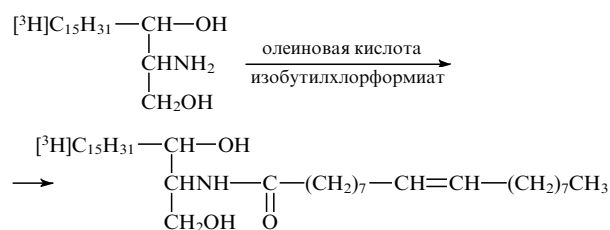
Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹	Соединение	МР, ПБк · моль ⁻¹
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Аденозин	0.36	$[8\text{-}^3\text{H}]$ ГМФ	0.41
$[8\text{-}^3\text{H}]$ Гуанозин	0.47	$[5\text{-}^3\text{H}]$ Цитидин	0.64
$[5\text{-}^3\text{H}]$ Урацил	0.67	$[2\text{-}^3\text{H}]$ Аденин	0.93
$[5\text{-}^3\text{H}]$ Уридин	0.78	$[2,8\text{-}^3\text{H}]$ Аденин	1.85
$[5\text{-}^3\text{H}]$ 2'-Дезокси-уридин	0.79	$[5\text{-}^3\text{H}]$ Цитозин	1.11
$[8\text{-}^3\text{H}]$ АМФ	0.23	$[8\text{-}^3\text{H}]$ АТФ	0.63
$[5\text{-}^3\text{H}]$ УМФ	0.14	$[8\text{-}^3\text{H}]$ ГТФ	0.41
$[5\text{-}^3\text{H}]$ ЦМФ	0.04	$[5\text{-}^3\text{H}]$ УТФ	0.63
		$[5\text{-}^3\text{H}]$ ЦТФ	0.78

Примечание. Приняты следующие обозначения: УМФ — уридин-5'-монофосфат, ЦМФ — цитидин-5'-монофосфат, ГМФ — гуанозин-5'-монофосфат, ГТФ — гуанозин-5'-трифосфат, УГФ — уридин-5'-трифосфат, ЦТФ — цитидин-5'-трифосфат.

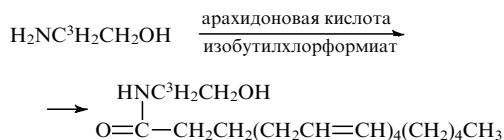
(табл. 33). Последний метод экспериментально проще, его легче воспроизвести, продукты реакции лучше подвергаются очистке и часто имеют более высокие радиохимические характеристики. Поэтому конкретный смысл в исследованиях твердофазного дегалогенирования ароматических соединений появляется, если возникает необходимость ввести метку в галогензамещенное биологически активное вещество и сохранить его нативное строение. При введении метки в алпразолам удалось получить меченый препарат с молярной радиоактивностью $0.15 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ без потери хлора даже при 175°C ,¹²⁸ т.е. происходил селективный изотопный обмен при наличии в молекуле органического соединения фрагментов, лабильных в атмосфере газообразного трития.

4. Получение тритийсодержащих соединений на основе реагентов, меченных твердофазным методом

Иногда ввести метку в биологически активное соединение оказывается гораздо труднее, чем в один из его фрагментов. В таких случаях метку вводят в этот фрагмент с последующим воссозданием структуры молекулы. Например, *N*-олеилдигидросфингозин с высокой молярной радиоактивностью был синтезирован в два этапа. Сначала метку вводили твердофазным методом в дигидросфингозин,⁶⁹ затем конденсировали его с олеиновой кислотой методом смешанных ангидридов.

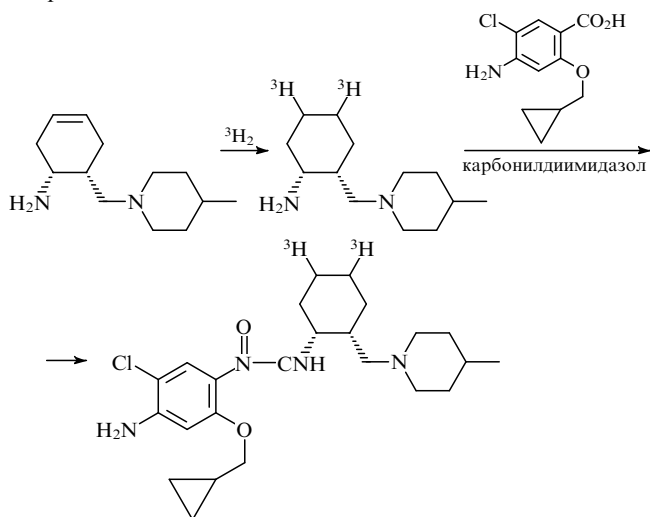


Аналогично синтезировали 2-гидроксиэтиламиды эйкозаполиеновых кислот. Очевидно, нельзя ввести сколько-нибудь значимые количества трития в конечное соединение, не затронув двойные связи полиненасыщенных жирных кислот. Поэтому твердофазным тритированием нитрила гликолевой кислоты вводили метку в аминоктанол,¹¹⁴ который затем конденсировали с жирной кислотой методом смешанных ангидридов.



Немеченный реагент брали в десятикратном избытке.

В качестве конденсирующего агента в реакциях подобного рода применяли карбонилдиимидазол, карбонилдигидрофузол, карбодиимиды. Например, с использованием карбонилдиимидазола синтезирован меченый (1*R*,2*R*)-*N*-[2-(4-метилпиперидилметил)циклогексил]-4-амино-5-хлор-2-циклопропилметоксibenзамид.⁷⁴



Ацетилирование аминов немеченными реагентами не составляет проблемы. В реакциях с использованием уксусного ангидрида, хлорангидрида уксусной кислоты и т.д. наблюдается высокий выход амидов. Однако при синтезе меченых аналогов этих реагентов приходится сталкиваться с рядом трудностей, которые делают данные методики непривлекательными. Главная трудность — высокая летучесть таких веществ. С ними (в отличие от нелетучих веществ) можно работать только в специально оборудованной лаборатории. Кроме того, высокая стоимость этих реагентов мешает их широкому применению. В ацетат натрия можно вводить метку непосредственно, поскольку он нелетуч ($T_{\text{пл}} = 324^\circ\text{C}$),⁶¹ поэтому данное соединение удобно использовать для получения меченых амидов. Суть метода заключается в смешивании растворов меченого ацетата натрия¹²⁹ с хлоргидратом амина, в результате чего образуется меченая уксусная кислота и хлорид натрия. После добавления конденсирующего агента ампулу запаивают и нагревают. По окончании реакции содержимое ампулы замораживают, перемораживают для отделения всех летучих продуктов, остаток растворяют в метаноле, подкисляют соляной кислотой и упаривают для удаления следов меченой уксусной кислоты. В качестве конденсирующего агента используют дициклогексилкарбодиимид и карбонилдигидрофузол. Оптимальным оказалось применение карбонилдигидрофузола (выход меченого препарата достигал 15%).

5. Проблемы селективности при твердофазном гидрогенолизе тритием

Выше было показано, что при наличии в соединениях атомов галогенов метку можно вводить селективным изотопным обменом. Как уже отмечалось, при введении метки в аллпразолам удалось получить меченый препарат с молярной радиоактивностью $0.15 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.¹²⁸).

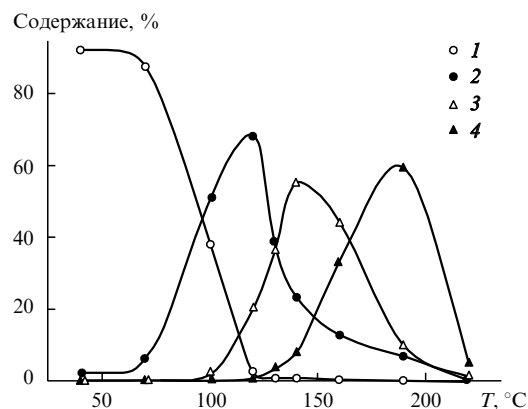
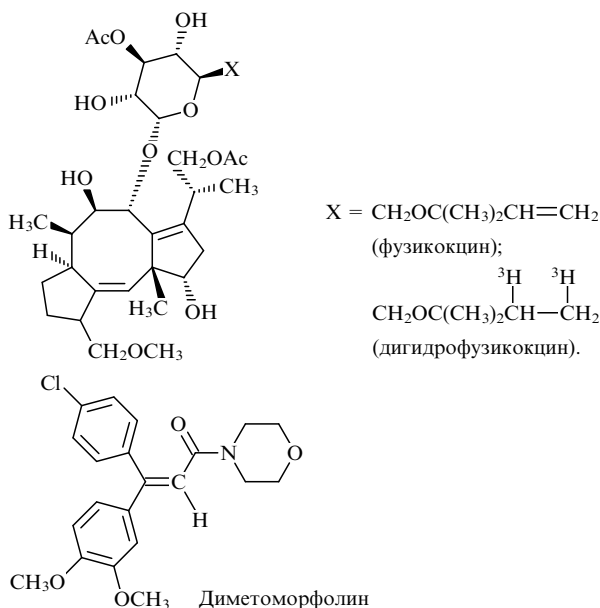


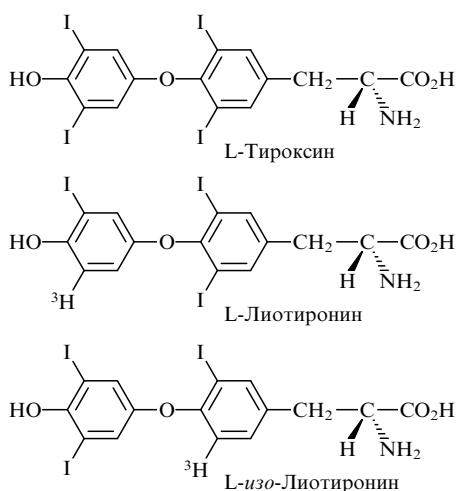
Рис. 5. Температурная зависимость содержания в реакционной смеси продуктов гидрирования фузикоцина.¹³⁰
1 — фузикоцин, 2 — дигидрофузикоцин (ДГФ); 3 — [³H₄]тетрагидрофузикоцин (ТГФ); 4 — [³H₆]гексагидрофузикоцин (ГГФ).

Таблица 34. Молярные радиоактивности лабильных соединений при введении метки на гетерогенных катализаторах платиновой группы.¹³¹

Соединение	$T, ^\circ\text{C}$	МР, ПБк · моль ⁻¹
9-Нитрокамптотецин	190	0.59
Диметоморфин	160	0.24
Тироксин	180	0.25
Метилловый эфир <i>N</i> -нитроаргинина	180	0.85
Этомидат	160	0.86
Витамин К ₁	130	2.3

В этом разделе рассмотрены подходы, позволяющие в условиях твердофазного метода осуществлять введение метки или за счет изотопного обмена при наличии в молекулах субстрата легко восстанавливающихся фрагментов (например, нитрогрупп и двойных связей), или за счет селективного дегалогенирования и гидрирования (рис. 5, табл. 34). Причем введение метки селективным гидрированием может происходить или за счет гидрирования одной из нескольких двойных связей, или за счет гидрирования одного ароматического фрагмента при наличии нескольких других.





В соединениях, содержащих нитрогруппы, изотопный обмен осуществляли при температурах 180–190°C, а в соединениях, содержащих двойные связи, — при 100–160°C.

Как отмечалось выше, устойчивость биологически активного соединения можно повысить, используя треххлористый родий, дополнительный носитель или частично дезактивированный катализатор. Например, в случае тироксина и витамина K₁ использовали палладиевые катализаторы, дезактивированные диацетатом свинца,¹³⁰ в случае диметоморфина — треххлористый родий,⁷³ в случае этомидата — дополнительный носитель.¹³¹

Чтобы найти оптимальные условия введения метки в соединения, содержащие двойные углерод-углеродные связи, было проведено специальное исследование с целью установить температуры восстановления двойных связей с разной степенью замещения.¹³⁰

Для отработки условий введения метки селективным твердофазным гидрированием одной из двойных связей в качестве модельного соединения был выбран фузикоцин,^{132–134} так как это соединение содержит моно-, три- и тетразамещенные двойные связи. Селективное твердофазное гидрирование изучали в интервале температур 40–220°C, при этом варьировали также время реакции и давление газообразного трития (см. рис. 5, табл. 35). Селективное гидрирование монозамещенной двойной связи начинается уже при 40°C, а эффективно проходит при 100°C.

Таблица 35. Зависимость содержания в реакционной смеси основных продуктов гидрирования фузикоцина от давления газообразного трития и времени проведения реакции ($T = 100^\circ\text{C}$, отношение катализатор Линдлара : вещество 10 : 1).¹²⁹

Условия реакции		Содержание, %		
P , гПа	τ , мин	фузикоцин	$[\text{}^3\text{H}_2]\text{ДГФ}$	$[\text{}^3\text{H}_4]\text{ТГФ}$
210	20	38	51	2
280	20	32	57	2
350	20	13	60	3
350	60	6	69	4

Увеличение давления газообразного трития и времени реакции в меньшей степени влияют на селективность процесса.¹³⁰ Если цель эксперимента — получение максимального выхода дигидрофузикоцина, то реакцию надо проводить при 130°C (см. рис. 5).

Выявленные закономерности были проверены при введении метки в витамин K₁ (табл. 36).¹³⁰ Из приведенных данных видно, что тризамещенные двойные связи выдерживали

Таблица 36. Содержание витамина K₁ в реакционной смеси и степень изотопного обмена при различных температурах введения тритиевой метки (отношение катализатор Линдлара : вещество 10 : 1, $P = 333$ гПа, $\tau = 20$ мин).¹³⁰

T , °C	Содержание, %	ОМР, %	Радиохимическая чистота, % (см. ^a)
80	99	9	95
100	68	16	64
120	60	52	21
140	16	100	8

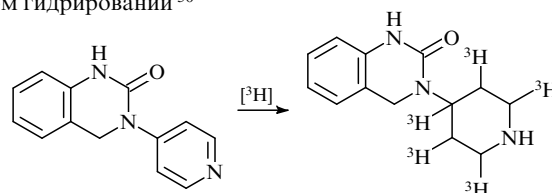
^a Радиоактивность метки в веществе, отнесенная к радиоактивности реакционной смеси.

температуры в интервале 120–140°C, поэтому метки в витамин K₁ вводили при 130°C (см. табл. 34).

В качестве галогенсодержащего соединения, на котором изучали возможность введения метки селективным дегалогенированием, был выбран тироксин. При высоких температурах (180–200°C) из реакционной смеси удавалось выделить в индивидуальном виде литионин и *изо*-литоинин. При 180°C ($\tau = 10$ мин) выход этих соединений составил 3.2 и 0.4%, а при 200°C ($\tau = 5$ мин) — 5.3 и 1.3% соответственно. Молярная радиоактивность дегалогенированных продуктов достигала 0.7 ПБк·моль⁻¹ (см.¹³⁰).

Исследования процессов твердофазного гидрирования и дегалогенирования необходимы, как правило, для изучения устойчивости определенного лабильного фрагмента молекулы исследуемого класса соединений и осуществления твердофазного изотопного обмена при сохранении нативности исходного вещества, как, например, в случае с введением метки в витамин K₁.

Совсем иная ситуация складывается при отработке условий селективного гидрирования одного ароматического фрагмента при наличии нескольких других (например пиридинового и бензольного колец). Известно, что гидрирование ароматических соединений в растворе происходит только при очень низких рН.^{68,135} Но в таких условиях происходит очень сильное изотопное разбавление меченого препарата. Например, при получении циклогексилметиламина из бензиламина меченый препарат при использовании жидкофазного гидрирования имеет молярную радиоактивность 1.66 ПБк·моль⁻¹, а при использовании твердофазного гидрирования — 7.78 ПБк·моль⁻¹ (см.⁶⁸). Преимущества твердофазного метода в этом случае очевидны. По-видимому, принципиальная возможность проявления селективности во многом зависит от природы активированных частиц трития. Если это катионы, селективность процесса будет высокой (протонирование пиридинового фрагмента происходит намного эффективнее, чем бензольного). Ароматическая структура пиридинового фрагмента при этом нарушается, и его гидрирование облегчается. Так, при селективном гидрировании⁵⁰



молекула меченого препарата включала пять атомов трития (6.44 ПБк·моль⁻¹). Содержание этого продукта в реакционной смеси было в 7 раз больше, чем всех остальных веществ, т.е. селективность процесса оказалась высокой. Последнее обстоятельство свидетельствует о том, что активную роль в спилловере водорода играют катионы трития. Другими сло-

вами, специфичностью твердофазных реакций во многом можно объяснить относительную устойчивость органических соединений, лабильных в условиях гидрогенолиза. Поэтому ниже рассмотрены особенности твердофазных реакций, влияющие не только на сохранение нативной структуры исходных соединений (в том числе и на ее хиральность), но и на распределение метки в молекулах.

IV. Особенности твердофазных реакций гидрогенолиза тритием

Один из ведущих специалистов в области синтеза меченных тритием органических соединений Эванс считал,¹³⁶ что методы введения метки при выдерживании органических веществ в атмосфере трития за счет инициирования этого процесса под действием разряда Тесла, УФ- или γ -излучения, а также газовая экспозиция препарата, нанесенного на гетерогенный катализатор являются всего лишь различными модификациями метода Вильцбаха. И до сих пор многие исследователи придерживаются подобной точки зрения.¹³⁷ Однако еще в 1960-х годах было установлено, что распределение метки в ароматическом кольце при использовании гетерогенных катализаторов существенно отличается от распределения метки при проведении реакции в других условиях (табл. 37, 38).^{138, 139}

Как видно из приведенных данных, при обмене водорода на тритий в ароматическом кольце с использованием гетерогенного катализатора доминирует электрофильное замещение, а в остальных случаях — радикальное замещение. Подобная тенденция отмечена и в работе¹⁴⁰. Например, при введении метки в нанесенный на гетерогенный катализатор пептид с N-концевым тирозином при температуре 135°C в *орто*-положения по отношению к гидроксильной группе тирозина включалось в ~20 раз больше метки, чем в *мета*-положения.

Таким образом, при проведении реакций между газообразным тритием и веществом, нанесенным на гетерогенный катализатор, мы имеем дело с иным механизмом, чем при введении метки методом Вильцбаха.

Таблица 37. Распределение метки (%) в толуоле, введенной методом Вильцбаха и его модификациями.¹³⁸

Положение метки	Без использования активирующего фактора (метод Вильцбаха)	Метод активации		
		γ -излучение	разряд Тесла	УФ-излучение
<i>орто</i>	56.5	54.7	39.7	49.8
<i>мета</i>	29.3	29.3	40.8	33.5
<i>пара</i>	14.2	16.0	19.5	16.7

Таблица 38. Распределение метки в бензойной и салициловой кислотах, введенной методом Вильцбаха (I) и при обработке газообразным тритием кислот, нанесенных на гетерогенный катализатор (II).¹³⁹

Кислота	Содержание метки (%) в положении		
	<i>орто</i>	<i>мета</i>	<i>пара</i>
Бензойная	58.3	21.3	20.4
	5.0	72.5	22.5
Салициловая	39.0 ^a	48.4 ^a	13.6 ^a
	16.9 ^a	31.7 ^a	51.4 ^a

Примечание. Над чертой — значение, полученное с использованием метода I, под чертой — значение, полученное с использованием метода II. ^a По отношению к гидроксильной группе.

Обычно это связывают с процессами, происходящими при насыщении катализаторов водородом.^{141–143} Так, на основании изучения валентного состояния водорода в гидридах интерметаллических соединений, авторами статьи¹⁴¹ был предложен и обоснован тезис, позволяющий рассматривать гидридное диспергирование как результат окислительно-восстановительного процесса, протекающего с образованием гидрид-ионов $H^{\delta-}$ при концентрациях водорода (c_H) в твердом гидриде больших, чем критическая $c_{H_{кр}}$. Значение $c_{H_{кр}}$ определяется окислительно-восстановительным потенциалом реакции



где MM — металлическая матрица катализатора.

Согласно этой модели, водород, хемосорбированный на активных центрах поверхности катализатора, отдает часть своих s-электронов в зону проводимости металла. В связи с этим при малых значениях c_H поведение адсорбированного водорода удовлетворительно описывается моделью Уббеллоде,¹⁴² предполагающей высокую диффузионную подвижность $H^{\delta+}$ и рост (или, по крайней мере, отсутствие снижения) электропроводности гидридной фазы по сравнению с электропроводностью исходного металла. Значение $c_{H_{кр}}$ соответствует такой концентрации окислителя, т.е. частиц $H^{\delta+}$, при которой последние окисляют металлическую матрицу и становятся акцепторами электронной плотности, превращаясь в объемные и малоподвижные ионы $H^{\delta-}$, обедняя тем самым зону проводимости металла. Очевидно, что при более высоких степенях заполнения пустот относительно большими по своему эффективному объему ионами $H^{\delta-}$ электронный дефицит на атомах металла, образующих металлическую подрешетку в кристаллической структуре катализатора, должен возрастать, что, видимо, ограничивает обратимую адсорбцию водорода. В связи с этим резко уменьшается концентрация активированных частиц (в случае получения меченых препаратов — трития), способных вступать в обменные реакции, а это приводит практически к полному прекращению изотопного обмена. Значение $c_{H_{кр}}$ может не достигаться продолжительное время при наличии спилловера водорода.

В данной работе мы не стали подробно рассматривать причины переноса активированных частиц с кристаллита металла на носитель, так как этому вопросу посвящено множество работ (см., например,^{144–148}), авторы которых оценили влияние на этот процесс адсорбции молекулярного водорода, глубиной перестройки поверхности сорбента, релаксации разупорядоченных структур и т.д. Перемещение протона по кислородсодержащей поверхности носителя происходит по эстафетному механизму. Энергия активации такого переноса составляет 20.1 кДж·моль⁻¹ (см.¹⁴⁹). При исследовании спилловера по поверхности носителя обнаружены одновременно и электронная, и ионная проводимость.³⁵ Поэтому наблюдаемое явление, в отличие от процессов, происходящих при использовании метода Вильцбаха, более достоверно может быть описано с помощью «конденсаторной модели», представленной в работе¹⁵⁰. Согласно этой модели образовавшиеся при взаимодействии газообразного трития с катализатором ионы $^3H^+$ и электроны двигаются по поверхности раздельно. Поверхность носителя представляет собой своеобразный многослойный конденсатор. В зависимости от условий эксперимента с той или иной вероятностью происходит взаимодействие катионов трития и электронов (разрядка соседних противоположно заряженных зон), при этом образуется атомарный тритий, который быстро рекомбинирует и переходит в газовую фазу. Когда поток $^3H^+$ и электронов достигает субстрата, эффективно протекают реакции изотопного обмена, гидрирования, дегалогенирования и т.д. Если субстрат содержит легко протони-

руемые группы, степень включения метки должна существенно уменьшаться. Очевидно, что при более высоких температурах вероятность взаимодействия соседних противоположно заряженных зон будет расти, поэтому вклад реакций атомарного трития в процесс получения меченого соединения тоже будет расти. Таким образом, если субстрат содержит легко протонируемые группы, при повышении температуры молярная радиоактивность меченого продукта должна существенно возрастать (незаряженные частицы атомарного трития будут более эффективно взаимодействовать с такими соединениями). В качестве примера можно привести упомянутое выше получение меченого пептида с N-концевым тирозином. Так, при температуре 150°C в *орто*-положении к гидроксильной группе тирозина включалось только в 3 раза больше метки, чем в *мета*-положения, а молярная радиоактивность возросла в 1.9 раза.¹⁴⁰

Распределение метки в ароматических аминокислотах особенно информативно для выяснения природы активированных частиц трития. Это можно проиллюстрировать на примере распределения метки в ароматических кольцах тирозина и серотонина. Доля метки (в %) в ароматических кольцах относительно гидроксильной группы (вся метка в кольце принята за 100%) составила:¹⁰⁴

Положение	<i>орто</i>	<i>мета</i>
Тирозин	78	22
Серотонин	85	15

Как отмечено в предыдущем разделе, распределение метки, которое можно ожидать в рамках модели электрофильного замещения, может оказаться сильным аргументом в пользу того, что активированной частицей при спилловере водорода является катион трития.

На основании опубликованных данных можно сделать два вывода: 1) включение метки происходит преимущественно по механизму электрофильного замещения; 2) чем ниже температура реакции, тем больше доминирует электрофильное замещение. Предложенная концепция конденсаторной модели помогает объяснить влияние тех или иных факторов в процессе получения меченных тритием препаратов и устраняет многие противоречия, возникающие при изучении теоретических аспектов этой проблемы.

Например, с помощью конденсаторной модели можно объяснить, почему выходы меченых препаратов при твердофазных реакциях могут быть высокими. Это связано с тем, что участие атомарного трития при введении метки будет минимальным, так как радикальный отрыв водорода с последующей рекомбинацией образующегося радикала представляет собой более сложный процесс, чем простая рекомбинация атомарного трития.^{151–153}

Механизм включения трития, как отмечалось выше, влияет на распределение метки в молекулах органических соединений. Так, в результате исследований, проведенных с использованием ЯМР ³H (вводили метку в аланин, нанесенный на уголь, в присутствии катализаторов платиновой группы), показано,¹⁴⁰ что при 130°C скорость включения трития в положение при третьем углеродном атоме в 7.5 раз выше, чем при втором. Причем в интервале 70–155°C константа скорости реакции изотопного обмена изменялась на два порядка (энергия активации была равна 62.8 кДж·моль⁻¹). При 130°C изотопная метка селективно включалась в метильную группу аланина, в то время как при 190°C происходило равномерное распределение метки в молекулах аланина. Энергия активации изотопного обмена в метильной группе аланина составила 58.7 кДж·моль⁻¹, а в метиновой группе — 107.7 кДж·моль⁻¹. Такую большую разницу можно объяснить следующим образом. Амино-

группа легко протонируется, что мешает взаимодействию ³H⁺ с атомом углерода метиновой группы аланина. Появление заряда на атоме азота вызывает перемещение электронной плотности в метильной группе (гиперконъюгация⁴⁵). В результате происходит компенсация дефицита электронной плотности на атоме углерода в положении 2, увеличивается подвижность атомов водорода метильных групп, а энергия активации изотопного обмена при третьем углеродном атоме уменьшается. При более высоких температурах (190°C) реакции радикального отрыва начинают играть все более заметную роль. Поэтому эффективность включения метки в положение 2 резко возрастает, что и определяет иное распределение метки.

Справедливость данного подхода подтверждает распределение метки в некоторых других аминокислотах (табл. 39). Только в случае серина и метионина метка больше включалась в положение C(2). По-видимому, это связано с тем, что кислород и сера, так же как и аминогруппы, легко протонируются, а находящаяся рядом с аминогруппой карбоксильная группа делает доминирующим изотопный обмен при атоме C(2).

Сама возможность введения метки в лабильные при гидрогенолизе органические вещества тоже во многом определяется механизмом этого процесса. Известно, что при использовании жидкофазного метода реакция идет на активных центрах катализатора. На этих центрах, в первую очередь, адсорбируются ненасыщенные фрагменты молекул, и реакции гидрогенолиза и гидрирования оказываются доминирующими. В условиях твердофазных реакций включение метки происходит за счет взаимодействия молекул вещества с активированным тритием. По-видимому, восстановление фрагментов N—CHR—C₆H₅, O—CHR—C₆H₅ до толуола и его производных; групп —NO₂, =N—OR до аминогрупп и т.д. при использовании твердофазных реакций будет затруднено, так как атомы азота и кислорода легко протонируются и можно селективно провести изотопный обмен, не нарушая нативного строения биологически активных соединений. Важная особенность твердофазных реакций гидрогенолиза — сохранение исходной структуры соединений, включая их хиральность. Рассмотрим причины этого явления.

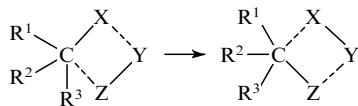
При введении метки в биологически активные соединения большое внимание уделяют проблеме сохранения оптической активности. Только при сохранении нативной конформации соединения можно гарантировать сохранение исходных биологических свойств субстрата.

Исследования закономерностей электрофильного замещения в ряду алифатических соединений⁴⁵ в основном были закончены в 1960-е годы. Обнаружены бимолекулярный

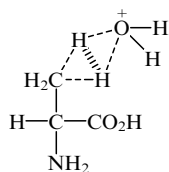
Таблица 39. Распределение метки (%) в аминокислотах, нанесенных на гетерогенные катализаторы и обработанных газообразным тритием при 150°C.¹⁰⁴

Аминокислота	Содержание метки при атомах				
	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)
Аланин	4	96			
Аспарагин	40	60			
Аспарагиновая кислота	40	60			
Аргинин	19	23	14	44	
Пролин	9	6	4	81	
Метионин	75		4	21	
Серин	70	30			
Треонин	18	9	73		
Лейцин	4	5	5	86	
Лизин	31	10	12	18	29
Валин	4	4	92		

(S_E2), мономолекулярный (S_E1) и внутримолекулярный (S_Ei) механизмы электрофильного алифатического замещения. Для нас особый интерес представляют данные, связанные с изучением закономерностей механизма S_Ei, так как очевидно, что при его реализации стереохимическая конфигурация при замещении не меняется.



Расчеты сил пространственного отталкивания, основанные на предполагаемых структурах переходного состояния, дали результаты, согласующиеся с результатами экспериментов.⁴⁵ Для выяснения механизма твердофазного изотопного обмена использовали квантово-химические расчеты.¹⁵⁴ При этом в качестве Y рассматривали молекулу воды. Расчеты фрагментов поверхности потенциальной энергии взаимодействия атомов углерода в аланине с ионом гидроксония, выполненные полуэмпирическим методом AM1 Дьюара, уточняли с помощью расчетов *ab initio* методами Хартри–Фока в базисах 3-21G и 6-31G с использованием программы GAMESS. Полученные результаты показали, что за счет дополнительного взаимодействия атомов водорода происходит понижение энергии активации изотопного обмена, т.е. такое переходное состояние дополнительно стабилизировано за счет образования связи между обменивающимися ионами водорода. В переходном состоянии тритий атакует связь C–H с той же стороны, с которой расположен замещаемый атом, т.е. осуществляется механизм S_Ei. Таким образом, если изотопный обмен будет происходить у хирального атома углерода, то нативная конфигурация исходного соединения сохранится. Переходное состояние при осуществлении S_Ei механизма электрофильного алифатического замещения иллюстрирует следующая формула:¹⁵⁴



Прямые доказательства того, что активные частицы водорода взаимодействуют с субстратом без модифицирования кристаллической решетки вещества, были получены в 1980-е годы.¹⁵⁵ Эксперименты проводили с 3-метил-4-изопропилфенолом. Это соединение в растворе не является оптически активным, но при кристаллизации самопроизвольно образует хиральные структуры (право- и левовращающие кристаллы). Порошок, полученный из одного из видов кристаллов 3-метил-4-изопропилфенола, перетирали с 5% Pt/C и выдерживали в течение 95 мин при 80°C в атмосфере водорода. Продукт реакции оказался оптически активным.

При более высоких температурах, когда вклад атомарного трития в изотопный обмен становится существенным, отсутствие рацемизации можно объяснить тем, что энергии активации в реакциях радикального отрыва существенно ниже, чем при электрофильном изотопном обмене (табл. 40). По-видимому, сохранение хиральности в этом случае обусловлено тем, что скорость рекомбинации образующихся радикалов несравнима со скоростями образования радикалов и тем более конформационных превращений.

Возможность получения меченых соединений, содержащих тризамещенные ненасыщенные углерод-углеродные связи, также зависит от природы активированного трития. Известно,⁴⁵ что лимитирующей стадией гидрирования является стадия переноса ³H⁺, а в качестве промежуточ-

Таблица 40. Кинетические параметры реакций радикального отрыва и присоединения.¹⁵²

Реакция	E_{c0} , кДж·моль ⁻¹	$r_c \cdot 10^{11}$, м	$(r^*/r_c)_0$	ΔH , кДж·моль ⁻¹
$H^{\cdot} + RH \rightarrow H_2 + R^{\cdot}$	54.6	3.762	0.48	94.5
$H^{\cdot} + CH_2=CHX \rightarrow$ $\rightarrow CH_3\dot{C}HX$	101.6	4.563	0.41	227.6
$H^{\cdot} + HOR \rightarrow$ $\rightarrow H_2 + RO^{\cdot}$	38.3	2.812	0.47	33.5
$H^{\cdot} + O=CR^1R^2 \rightarrow$ $\rightarrow HOC^{\cdot}R^1R^2$	102.9	4.401	0.38	149.7

Примечание. Приняты следующие обозначения: r_c — расстояние, равное сумме амплитуд колебаний атомов реагирующих связей в переходном состоянии; r^* — параметр, характеризующий положение переходного состояния на отрезке r_c ; отношение $(r^*/r_c)_0$ характеризует положение переходного состояния при $\Delta H = 0$.

ного продукта образуется карбениевый ион ($R' - H^{\cdot}NC - C^+H - CH_2R$). Последний, восстанавливаясь, превращается в насыщенное соединение. Таким образом, если рядом с C=C-связью находится легко протонируемый фрагмент, который приобрел заряд, то вероятность протонирования этой двойной связи уменьшается, что приводит к ее дополнительному упрочнению. Косвенным доказательством образования карбениевых ионов в процессе твердофазного гидрирования может служить возможность миграции двойных связей ($R' - H^{\cdot}NC - CH = CHR$). Зафиксировать этот процесс проще всего, если R=OH. В этом случае при миграции двойной связи образуется альдегид, устойчивый в условиях реакции. Например, при гидрировании аллилового спирта при комнатной температуре в твердофазном режиме выход альдегида оказался ~10–20%.¹⁵⁶ Таким образом, с помощью твердофазных реакций можно осуществлять селективный изотопный обмен и получать ненасыщенные меченые препараты.

Если реакцию проводят при более высоких температурах, необходимо учитывать возможность восстановления двойных связей атомарным тритием. При сравнении кинетики радикальных реакций присоединения и отрыва показано, что отрыв атома водорода протекает всегда легче, чем его присоединение к двойной связи. Это обусловлено разной геометрией реакционного центра и более сильным отталкиванием в нелинейном центре, который образуется при взаимодействии активированного водорода с двойной связью (см. табл. 40).⁴³ Важную роль играет и силовая постоянная атакуемой связи, которая у кратной связи всегда больше, чем у одинарной. Кроме того, энергия активации реакции присоединения сильнее зависит от изменения энтальпии, чем энергия активации реакции отрыва. В результате происходит в основном рекомбинация атомарного трития, образующегося при взаимодействии катионов трития с электронами, что повышает устойчивость ненасыщенных соединений в этих условиях.

Таким образом, если в молекуле органического соединения есть легко протонируемые фрагменты, то активированные частицы трития в первую очередь будут взаимодействовать с ними. Если протонированные фрагменты молекул лабильны, то может образоваться ряд специфических побочных продуктов. При введении метки в соединения с температурами плавления более высокими, чем температура, при которой проводили реакцию изотопного обмена, степень изотопного обмена будет зависеть главным образом от эффективности спilloвера трития в объеме органического вещества, нанесенного на катализатор. Если протонированные фрагменты или исходно заряженные группы молекул препят-

ствуют электрофильному замещению или спилloverу трития в объем органического вещества, то конечная молярная радиоактивность меченого препарата существенно снизится.

Действительно, давно замечено,¹³⁶ что обмен изотопов водорода осуществляется, в первую очередь, при гидроксильных, карбоксильных, amino- и других функциональных группах. А при введении тритиевой метки твердофазным изотопным обменом в амины⁶⁸ (бензиламин, спермин, этилендиамин и его производные) (табл. 41) образуется ряд дезаминированных продуктов, причем в случае спермина меченый препарат не удалось выделить из реакционной смеси.

Таблица 41. Молярная радиоактивность и выход меченных тритием аминов (5% Pd/C, $T = 190^\circ\text{C}$, $\tau = 15$ мин).^{53, 61, 74}

Соединение	МР, ПБк·моль ⁻¹	Выход, %
Этилендиамин	0.13	50
Пиперазин	0.32	23
1,4-Диазабисцикло[2.2.2]октан	0.46	15

Если метку вводят в высокоплавкие соединения, то физико-химические свойства исходного вещества оказывают большое влияние на конечную молярную радиоактивность меченого препарата. Например, в то время как практически весь водород в молекулах метилстеарата ($T_{\text{пл}} = 39^\circ\text{C}$) обменивается на тритий, только часть молекул натриевой соли уксусной кислоты ($T_{\text{пл}} = 324^\circ\text{C}$), по данным ЯМР ^3H (см.⁶⁸), оказывается в тех зонах, где активно происходит изотопный обмен.

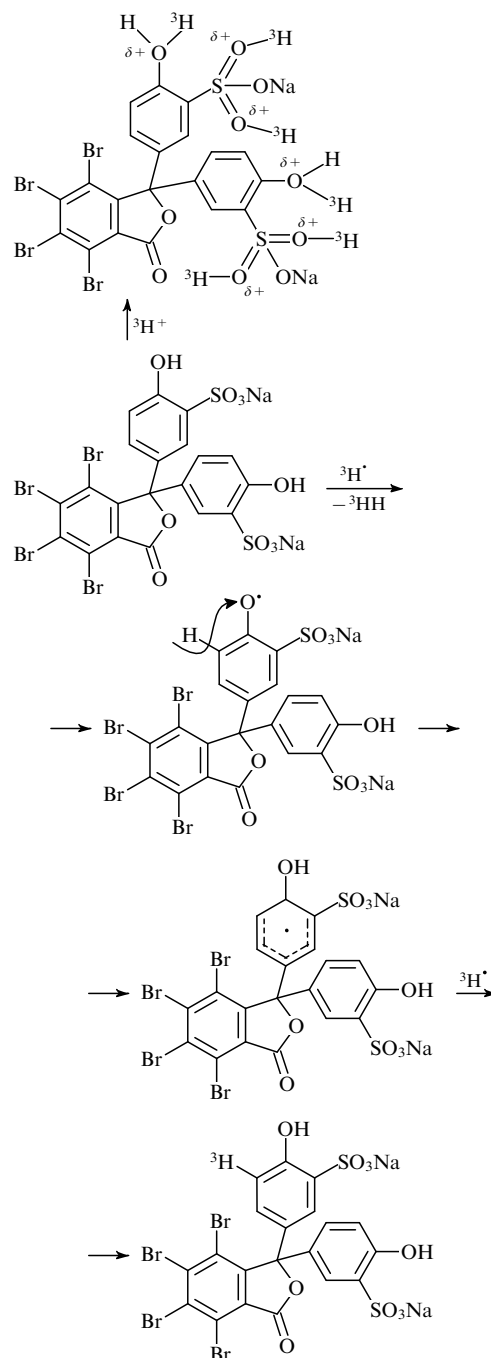
Анализ спектров ЯМР ^3H меченого ацетата натрия показал, что меченые молекулы на 74% состоят из трижды замещенных, на 24% из дважды замещенных и на 2% из монозамещенных изотопомеров, т.е. молярная радиоактивность должна быть ~ 3 ПБк·моль⁻¹. На самом же деле молярная радиоактивность [^3H]CH₃CO₂Na была равна 1.1–1.3 ПБк·моль⁻¹. Причина этого в том, что методом ЯМР ^3H можно определить лишь соотношение различных тритийсодержащих изотопомеров в молекулах ацетата натрия. Количество немеченного исходного вещества в реакционной смеси методом ЯМР ^3H не фиксируется. Поэтому расхождение результатов, полученных с помощью ЯМР ^3H и при измерении радиоактивности, вызвано тем, что $\sim 60\%$ ацетата натрия не вступает в реакцию изотопного обмена, что заметно снижает конечную молярную радиоактивность меченого препарата. Действительно, как показали микрографические исследования,¹⁵⁷ при твердофазном гидрогенолизе другого высокоплавкого соединения — динатриевой соли *транс*-эпоксиянтарной кислоты ($T_{\text{пл}} = 262^\circ\text{C}$) — не происходит ее заметной диффузии по поверхности палладиевого катализатора.

Таким образом, если температура плавления соединения сравнима или ниже температуры, при которой проводят изотопный обмен, то возможно перемещение молекул субстрата друг относительно друга: все молекулы с равной вероятностью могут подвергаться воздействию активированного трития⁶⁰ и влияние эффективности спилloverа трития в объем данного вещества на конечную молярную радиоактивность меченого препарата становится не столь значительным. Это можно проиллюстрировать следующими данными о молярной радиоактивности, полученными при введении тритиевой метки в жирные кислоты твердофазным методом:²⁹

Кислота	Стеариновая	Пальмитиновая	Миристиновая	Лауриновая
МР, ПБк·моль ⁻¹	13.0–13.5	12.5–12.9	12.0–12.1	11.0–11.5

Для подтверждения положения о том, что твердофазные реакции могут протекать с участием как катионов трития, так и атомарного трития, а их вклад в конечную молярную радиоактивность меченого препарата зависит от природы исходного вещества, необходимо было в качестве модельного использовать такое соединение, которое, с одной стороны, могло служить своеобразной ловушкой для катионов трития, а с другой — было бы достаточно термически устойчивым для создания благоприятных условий для изотопного обмена с участием атомарного трития.

В качестве модельных веществ испытан ряд соединений,⁵³ но они или оказывались хорошими субстратами для катионов трития, или были недостаточно термически устойчивы. В наибольшей степени удовлетворил упомянутым выше условиям сульфобромфталейн.¹⁵⁸ Схема получения меченого тритием сульфобромфталейна следующая:



В этом соединении содержатся легко протонируемые группы (в том числе и сульфогруппы), благодаря которым может возникнуть значительный положительный заряд: кроме того, оно выдерживало нагрев в присутствии катализатора в атмосфере газообразного трития до 280–290°C. Метку вводили в присутствии палладия на сульфате бария, карбонате кальция, угле и оксиде алюминия. Отношение катализатор:вещество было равно 10:1, интервал температур 150–290°C. При температурах 150–180°C выход препарата был практически количественным, при 180–220°C он постепенно снизился до 60%, при 250°C — до 53%, при 270°C — до 46% и при 285°C — до 34%. Оказалось, что даже при проведении реакции при 210°C за 0.5 ч молярная радиоактивность меченого препарата не превышала 0.08 ПБк·моль⁻¹. И только при температурах выше 285°C радиоактивность достигла 0.5–0.6 ПБк·моль⁻¹. Тот факт, что ароматическое соединение, содержащее четыре атома брома, после реакции с газообразным тритием при таких высоких температурах может быть выделено с выходом 30–50%, указывает на практическое отсутствие взаимодействия между катионами трития и протонированными молекулами сульфобромфталейна.

Наблюдаемый эффект — свидетельство в пользу того, что включение метки в этом случае определяется механизмом радикального отрыва водорода с последующей рекомбинацией образующегося радикала. Действительно, если атомарный тритий взаимодействует с фенольным фрагментом молекулы сульфобромфталейна, образуется арилокси-радикал, который далее рекомбинирует, захватывая водород из *орто*-положения. При этом образуется радикал, который может стабилизироваться путем сопряжения с делокализацией радикального центра по трем положениям бензольного кольца.⁴⁵ Затем происходит реакция с атомарным тритием и образование меченого препарата. Естественно, что спилловер атомарного трития, не имеющего заряд, в объем кристаллита субстрата будет осуществляться, даже если молекулы вещества имеют легко протонируемые группы.

Таким образом, введение метки в твердофазных реакциях происходит с участием как катионов трития, так и атомарного трития. Молярная радиоактивность меченых препаратов при относительно невысоких температурах (обычно ниже 180°C) в основном определяется реакциями органического соединения с катионами трития. Степень изотопного обмена зависит главным образом от эффективности спилловера трития в объем органического вещества, нанесенного на катализатор. При повышении температуры вклад атомарного трития в процесс введения метки возрастает.

В. Заключение

В данном обзоре приведены результаты синтеза меченых препаратов при использовании твердофазных реакций гидрогенолиза, в том числе гидрирования и изотопного обмена с участием трития. Исследованы закономерности этих реакций: влияние природы субстрата, катализатора, давления газообразного трития, времени проведения процесса, температуры и т.д. на выход и молярную радиоактивность получаемых препаратов. Приведены примеры получения меченых биологически активных соединений.

Показано, что при температурах ниже 180°C, при которых чаще всего вводят метку твердофазным методом, основные радиохимические параметры меченых препаратов (выход, молярная радиоактивность, распределение трития) определяются взаимодействием ³H⁺ с субстратом. При более высоких температурах концентрация атомарного трития будет расти. В этом случае, особенно если субстрат содержит легко протонируемые группы, молярные радиоактивности продукта должны существенно возрастать (неза-

ряженные частицы атомарного трития более эффективно взаимодействуют с такими соединениями).

Продолжительность работы катализатора будет зависеть от времени достижения некоторого порогового значения концентрации водорода в кристаллитах металла-катализатора c_{H_2} . Время достижения этого критического значения определяется соотношением скорости насыщения кристаллитов металла газообразным тритием и эффективностью его спилловера. Эффективность спилловера трития с точки зрения получения меченых органических соединений определяется временем его существования как системы катионов и электронов, сольватированных на поверхности носителя и в объеме субстрата.

Если поставлена задача получить меченый препарат с высоким выходом и распределением метки, наиболее соответствующим электрофильному замещению, то твердофазную реакцию нужно проводить при максимально низкой температуре, которая позволяет обеспечить необходимую молярную радиоактивность. Время реакции определяется временем дезактивации катализатора. При необходимости синтезировать меченый препарат с максимально высокой молярной радиоактивностью реакцию проводят в диапазоне температур, в котором можно выделить нужное [³H]соединение хотя бы с выходом 5–10%. Время реакции при этом обычно составляет 5–15 мин.

Судя по имеющимся в литературе данным, перспективным является использование комбинаций различных катализаторов (смешанные катализаторы типа палладий–родий, палладий–технеций), носителей (раздельное нанесение на катализатор и субстрат с последующим их механическим смешением), субстратов (последовательное нанесение нескольких субстратов). Эти подходы приводят к повышению выхода меченого препарата, а в некоторых случаях просто дают принципиальную возможность получить указанный препарат.

Литература

1. А.с. 243621 СССР; *Бюл. изобрет.*, (39), 159 (1976)
2. В.В.Розанов, О.В.Крылов. *Успехи химии*, **66**, 117 (1997)
3. Х.М.Миначев, Р.В.Дмитриев, Н.Г.Рассамахина, А.А.Дергачев. *Докл. АН СССР*, **291**, 393 (1986)
4. J.E.Benson, H.W.Kohn, M.Boudart. *J. Catal.*, **5**, 307 (1966)
5. F.Roessner, A.Hagen, R.V.Dmitriev. In *Catalysis by Microporous Materials*. Vol. 94. Elsevier, Amsterdam, 1995. P. 472
6. F.Roessner, U.Roland, T.Braunschweig. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **91**, 1539 (1995)
7. W.C.Conner, G.M.Pajonk, S.J.Teichner. *Adv. Catal.*, **34**, 1 (1986)
8. G.C.Bond. In *Spillover of Adsorbed Species*. (Eds G.M.Pajonk, S.J.Teichner, J.E.Germain). Elsevier, Amsterdam, 1983. P. 1
9. M.Lacroix, G.M.Pajonk, S.J.Teichner. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 265 (1981)
10. S.J.Teichner. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 27
11. M.Lacroix, G.M.Pajonk, S.J.Teichner. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 258 (1981)
12. R.V.Levy, M.Boudart. *Ind. Chim. Belg.*, **38**, 506 (1973)
13. U.Roland, R.Salzer, S.Stolle. In *Zeolites and Related Microporous Materials: State of the Art 1994*. Vol. 84. Elsevier, Amsterdam, 1994. P. 1231
14. J.A.Altham, G.Webb. *J. Catal.*, **18**, 133 (1970)
15. D.Bianchi, M.Lacroix, G.M.Pajonk, S.J.Teichner. *J. Catal.*, **68**, 411 (1981)
16. D.Bianchi, M.Lacroix, G.M.Pajonk, S.J.Teichner. *J. Catal.*, **59**, 467 (1979)
17. M.Boudart, A.M.Aldag, M.A.Vannice. *J. Catal.*, **18**, 46 (1970)
18. L.E.Hunt. *J. Catal.*, **23**, 93 (1971)
19. W.C.Neikam, R.A.Vannice. *J. Catal.*, **20**, 260 (1971)
20. W.C.Neikam, R.A.Vannice. *J. Catal.*, **27**, 207 (1972)

21. R.Kramer, M.Andre. *J. Catal.*, **58**, 287 (1979)
22. P.A.Sermon, G.C.Bond. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **72**, 730 (1976)
23. T.Fleisch, R.Abermann. *J. Catal.*, **50**, 268 (1977)
24. T.C.Sheng, I.D.Gay. *J. Catal.*, **71**, 119 (1981)
25. R.F.Taylor, M.M.Silva-Crawford, B.C.Gerstein. *J. Catal.*, **62**, 401 (1980)
26. R.K.Edvinsson, R.R.Hudgins, P.L.Silveston. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 229
27. Y.W.Nam, P.L.Silveston. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 235
28. А.В.Филиков. Дис. канд. хим. наук. ИМГ РАН, Москва, 1985
29. R.V.Dmitriev, K.H.Steinberg, A.N.Detjuk, F.Hoffmann, H.Bremer, Kh.M.Minachev. *J. Catal.*, **65**, 105 (1980)
30. D.H.Lentz, W.C.Connor, J.P.Fraissard. *J. Catal.*, **117**, 281 (1989)
31. W.C.Naikam, M.A.Vannice. In *Proceedings of the 5th International Congress on Catalysis. Vol. 1*. Elsevier, Amsterdam, 1973. P. 609
32. A.F.Carley, H.A.Edwards, B.Mile, M.W.Roberts, C.C.Rowlands, T.E.Hanlock, S.D.Jackson. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **90**, 3341 (1994)
33. Х.М.Миначев, Р.В.Дмитриев, К.Х.Штайнберг, А.Н.Детюк, Х.Бремер. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2682 (1978)
34. R.V.Levy, M.Boudart. *J. Catal.*, **32**, 304 (1974)
35. E.Keren, A.Soffer. *J. Catal.*, **50**, 43 (1977)
36. M.Misono, H.Igarashi, K.Katamura, T.Okuhara, N.Mizuno. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 105
37. J.Herrman, P.Pichat. In *Spillover of Adsorbed Specier*. (Eds G.M.Pajonk, S.J.Teichner, J.E.Germain). Elsevier, Amsterdam, 1983. P. 77
38. Th.Braunschweig, U.Roland, H.Winkler. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 183
39. U.Roland, R.Salzer, Th.Braunschweig, F.Roessner, H.Winkler. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **91**, 1091 (1995)
40. U.Roland, Th.Braunschweig, F.Roessner. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **127**, 61 (1997)
41. Л.Полинг. *Общая химия*. Мир, Москва, 1974
42. E.Kikuchi, T.Matsuda. In *New Aspects of Spillover Effect in Catalysis*. Elsevier, Amsterdam, 1993. P. 53
43. Е.Т.Денисов. *Успехи химии*, **69**, 166 (2000)
44. В.А.Радциг, С.Н.Кострица. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1468 (1997)
45. К.Ингольд. *Теоретические основы органической химии*. Мир, Москва, 1973
46. Д.А.Князев, Н.Ф.Мясоедов, А.В.Бочкарев. *Успехи химии*, **61**, 384 (1992)
47. Ю.А.Золотарев, В.С.Козик, Д.А.Зайцев, Е.М.Дорохова, Н.Ф.Мясоедов. *Докл. АН СССР*, **308**, 1146 (1989)
48. Ю.А.Золотарев, Е.В.Ласкерев, В.С.Козик, Е.М.Дорохова, С.Г.Розенберг, Ю.А.Борисов, Н.Ф.Мясоедов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 757 (1997)
49. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 270 (1995)
50. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф. Мясоедов. *Радиохимия*, **44**, 72 (2002)
51. О.В.Лушкина, Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **19**, 117 (1993)
52. В.П.Шевченко, С.В.Фараджеева, И.Ю.Нагаев, Н.Ф. Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 84 (1998)
53. И.Ю.Нагаев, В.П.Шевченко, Н.Ф. Мясоедов. *Радиохимия*, **41**, 289 (1999)
54. K.Saito, A.Nakamura, H.Takey, B.Wang. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 58 (1980)
55. P.N.Rylander. In *Catalytic Hydrogenation in Organic Synthesis*. Academic Press, New York, 1979. P. 31
56. N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **33**, 391 (1993)
57. Т.Одзак. *Изотопные исследования гетерогенных катализаторов*. Мир, Москва, 1979
58. Я.Е.Гегузин. *Физика спекания*. Наука, Москва, 1967
59. А.А.Лопаткин, Ж.В.Стрельникова, В.П.Лебедев. *Вестн. МГУ. Сер. хим.*, 255 (1956)
60. С.В.Фараджеева. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 1990
61. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **36**, 440 (1994)
62. В.П.Шевченко. Дис. д-ра хим. наук. ИМГ РАН, Москва, 1992
63. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, А.В.Камерницкий, И.С.Левина, Л.Е.Куликова. *Радиохимия*, **42**, 176 (2000)
64. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **35**, 132 (1993)
65. G.P.Akulov, Ju.L.Kaminski, N.A.Korsakova, B.K.Kudelin. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **31**, 227 (1992)
66. G.P.Akulov, E.V.Snetkova, Ju.L.Kaminski, B.K.Kudelin, V.L.Efimova. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **29**, 1351 (1991)
67. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **41**, 80 (1999)
68. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **36**, 445 (1994)
69. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, А.В.Потапова, Н.Ф. Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 265 (1995)
70. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 75 (1998)
71. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **35**, 106 (1993)
72. J.L.Wong, J.H.Keek Jr. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **4**, 125 (1975)
73. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **41**, 526 (1999)
74. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 79 (1998)
75. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Успехи химии*, **68**, 254 (1999)
76. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, Н.В.Бовин. *Радиохимия*, **45**, 2 (2003)
77. О.В.Лушкина, Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **19**, 113 (1993)
78. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов, В.И.Мишин, В.Н.Крамеров. *Журн. прикл. химии*, **72**, 2017 (1999)
79. Г.В.Сидоров. Дис. д-ра хим. наук. ИМГ РАН, Москва, 1999
80. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **34**, 353 (1994)
81. Yu.A.Zolotarev, V.S.Kozic, D.A.Zaitsev, E.M.Dorokhova, N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **29**, 507 (1991)
82. Ю.А.Золотарев, Ю.А.Борисов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1056 (1999)
83. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, К.В.Шевченко, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **44**, 537 (2002)
84. A.Chambers, C.Park, R.T.K.Baker, N.M.Rodriguez. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4253 (1998)
85. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **45**, 1 (2003)
86. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, Н.Н.Попова, Г.Н.Пирогова. *Радиохимия*, **44**, 533 (2002)
87. Н.Н.Попова. Дис. канд. хим. наук. ИФХ РАН, Москва, 1992
88. B.Delmon. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **88**, 979 (1979)
89. B.Delmon. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **13**, 203 (1980)
90. B.Delmon. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **22**, 1 (1983)
91. M.Karrooa, H.Matralis, P.Granger. *J. Catal.*, **133**, 371 (1993)
92. H.Topsoe, B.S.Clausen, F.E.Massoth. *Hydrotreating Catalysts. Science and Technology*. Springer, Berlin, 1996
93. S.I.Kim, S.I.Woo. *Appl. Catal.*, **74**, 109 (1991)
94. С.И.Кондратьев, С.Б.Никищенко, Г.В.Антошин, А.А.Слинкин, Э.А.Федоровская, Х.М.Миначев. *Кинетика и катализ*, **25**, 1168 (1984)
95. M.W.J.Craje, V.H.J.de Beer, A.M.van der Kraan. *Appl. Catal.*, **68**, 57 (1991)
96. R.Candia, B.S.Clausen, J.Bartholdy, N.-Y.Topsoe, B.Lengeler, H.Topsoe. In *Proceedings of the 8th International Congress on Catalysis. Vol. 1*. Verlag Chemie, Weinheim; West Berlin, 1984. P. 375
97. M.J.Ledoux, G.Maire, S.Hantzer, O.Michaux. In *Proceedings of the 9th International Congress on Catalysis. Vol. 1*. Chemical Institute of Canada, Ottawa; Calgary, 1988. P. 74
98. H.Topsoe, B.S.Clausen, R.Candia, S.Moing. *J. Catal.*, **68**, 435 (1981)

99. R.Candia, B.S.Clausen, H.Topsoe. *J. Catal.*, **77**, 364 (1982)
100. S.M.A.M.Bouwens, F.B.M.van Zon, M.P.van Dijk. *J. Catal.*, **146**, 375 (1994)
101. O.Sorensen, B.S.Clausen, R.Candia, H.Topsoe. *Appl. Catal.*, **13**, 363 (1985)
102. B.Scheffer, E.M.van Oeri, P.Arnoldy, V.H.J.de Beer, J.A.Moulijn. *Appl. Catal.*, **25**, 301 (1986)
103. W.Seglich, G.Hoeftle. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **8**, 981 (1969)
104. Ю.А.Золотарев. Дис. д-ра хим. наук. ИМГ РАН, Москва, 1998
105. C.Tömböly, R.Dixit, I.Lengyel, A.Borsodi, G.Tóth. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **44**, 355 (2001)
106. Д.А.Зайцев, Ю.А.Золотарев, Н.Ф.Мясоедов. *Докл. АН СССР*, **313**, 619 (1990)
107. Ю.А.Золотарев, А.К.Дадаян, Б.В.Васковский, Н.В.Кост, С.К.Гаранин, В.П.Макаренкова, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **26**, 512 (2000)
108. Ю.А.Золотарев, Э.В.Бочаров, А.К.Дадаян, И.Е.Кашеверов, М.Н.Жмак, И.В.Масленников, Ю.А.Борисов, А.С.Арсеньев, Н.Ф.Мясоедов, В.И.Цетлин. *Биоорг. химия*, **26**, 587 (2000)
109. I.V.Maslennikov, A.G.Sobol, K.V.Gladky, A.A.Lugovskoy, A.G.Ostrovsky, V.I.Tsetlin, V.T.Ivanov, A.S.Arseniev. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 238 (1998)
110. L.W.Guddat, J.A.Martin, L.Shan, A.B.Edmundson, W.R.Gray. *Biochemistry*, **35**, 11329 (1996)
111. В.Н.Крамеров. Дис. канд. хим. наук. НПО ГИПХ, Ленинград, 1987
112. V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, A.V.Potapova, N.F.Myasoedov, A.V.Kamernitsky, I.S.Levina, L.E.Kulikova, A.N.Smirnov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **41**, 919 (1998)
113. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. В кн. *Тезисы докладов на Всероссийской конференции «50 лет производства и применения изотопов в России»*. Обнинск, 1998. С. 33
114. С.И.Рогов, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, В.В.Безуглов, М.Ю.Бобров, В.М.Федосеев. *Радиохимия*, **39**, 458 (1997)
115. H.W.Cook, W.E.M.Lands. *Can. J. Biochem.*, **53**, 1220 (1975)
116. Ю.А.Золотарев, Е.В.Ласкерев, В.С.Козик, Е.М.Дорохова, С.Г.Розенберг, Ю.А.Борисов, Н.Ф.Мясоедов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1820 (1997)
117. Н.Ф.Мясоедов, Ю.А.Золотарев, В.И.Пенкина, О.В.Петреник. В кн. *I Всесоюзное совещание по проблеме «Получение и выделение радиоактивных изотопов»*. (Тез. докл.). ФАН, Ташкент, 1980. С. 162
118. Yu.A.Zolotarev, V.S.Kozic, E.M.Dorokhova, N.F.Myasoedov. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **29**, 997 (1991)
119. Yu.A.Zolotarev, N.F.Myasoedov, V.I.Penkina, O.V.Petrenik, V.A.Davankov. *J. Chromatogr.*, **207**, 231 (1981)
120. Yu.A.Zolotarev, V.S.Kozic, E.M.Dorokhova, D.A.Zaitsev, N.F.Myasoedov. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **162**, 3 (1992)
121. Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Биоорг. химия*, **22**, 291 (1996)
122. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **121**, 461 (1988)
123. Е.К.Иванькова, Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **23**, 296 (1981)
124. G.V.Sidorov, N.F.Myasoedov, O.V.Lushkina. In *Proceedings of International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. Elsevier, Amsterdam, 1992. P. 460
125. Н.С.Марченков. Дис. канд. хим. наук. ИАЭ им. И.В.Курчатова, Москва, 1974
126. G.F.Taylor, K.K.Foarde, T.D.Webber, J.A.Kepler. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **44**, 165 (2001)
127. Н.Ф.Мясоедов, Н.С.Марченков, К.С.Михайлов. В кн. *Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами*. (Сб. докл.). Чехословацкая комиссия по атомной энергии, Прага, 1977. С. 275
128. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 70 (1998)
129. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. В кн. *Тезисы докладов на третьей Российской конференции по радиохимии «Радиохимия 2000»*. ЛПМ-Контакт, Санкт-Петербург, 2000. С. 255
130. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **44**, 349 (2002)
131. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **44**, 353 (2002)
132. В.Л.Садовская, Л.Ю.Ракитин, И.И.Гришина, Л.М.Краснопольская, Г.С.Муромцев, В.П.Шевченко. *Биоорг. химия*, **16**, 1407 (1990)
133. В.П.Шевченко, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **31**, 75 (1989)
134. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **31**, 90 (1989)
135. R.E.Lutz. *J. Med. Chem.*, **11**, 273 (1968)
136. Э. Эванс. *Третий и его соединения*. Атомиздат, Москва, 1970
137. M.Cabell. In *Isotopes in the Physical and Biochemical Sciences. Vol. 1*. (Eds E.Buncel, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1991. P. 71
138. H.J.Ache, W.Herr, A.Thiemann. In *Proceedings of the IAEA Symposium of the Chemical Effect of Nuclear Transformations. Vol. 2*. Vienna, 1961. P. 111
139. T.Meshi, Y.Sato. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**, 683 (1964)
140. Yu.A.Zolotarev, Yu.A.Borisov, N.F.Myasoedov. In *Proceedings of Symposium: Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds*. (Eds J.R.Heys, D.G.Melillo). Elsevier, Philadelphia, 1997. P. 653
141. К.Н.Семенов, В.В.Бурнашева, Н.А.Яковлева, Е.А.Ганич. *Изв. АН. Сер. хим.*, 214 (1998)
142. A.R.Ubbelode. *J. Chem. Soc.*, 1143 (1950)
143. T.R.Gibb. In *Progress in Inorganic Chemistry. Vol. 3*. Interscience, London; New York, 1962. P. 315
144. Н.Е.Любашина, Н.Н.Саввин, И.А.Мясников. *Докл. АН СССР*, **268**, 1434 (1983)
145. Дж.Андерсон. *Структура металлических катализаторов*. Мир, Москва, 1978
146. S.Katsuhiko. *J. Chem. Soc. Jpn., Chem. Ind. Chem.*, 35 (1975)
147. Ю.Н.Руфов. В кн. *Проблемы кинетики и катализа. Т. 16*. Наука, Москва, 1975. С. 212
148. С.А.Завьялов, И.А.Мясников, Э.Е.Гутман. *Докл. АН СССР*, **236**, 375 (1977)
149. А.Б.Ярославцев. *Успехи химии*, **63**, 449 (1994)
150. V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov, A.B.Susan. In *The Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds*. Willey, Dresden, 2000. P. 59
151. Е.Т.Денисов. *Mendeleev Commun.*, 1 (1992)
152. Е.Т.Денисов. *Успехи химии*, **66**, 953 (1997)
153. Е.Т.Денисов. *Кинетика и катализ*, **35**, 671 (1994)
154. Е.В.Ласкателев. Дис. канд. хим. наук. ИНЭОС, Москва, 1997
155. R.Lamartine, R.Perrin. *Stud. Surf. Catal.*, **17**, 251 (1983)
156. В.В.Салов, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, О.М.Петрухин, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **29**, 662 (1987)
157. Т.Kitamura, T.Harada. *J. Mol. Catal.*, **148**, 197 (1999)
158. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **43**, 367 (2001)

A SOLID-PHASE PROCESS FOR THE INTRODUCTION OF THE TRITIUM LABEL INTO BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov***Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences**2, Pl. Kurchatova, 123182 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)196-0221*

A solid-phase method for conducting hydrogenolysis, hydrogenation and isotope exchange reactions is described. The potential of the solid-phase method for tritium labelling of various organic compounds including lipids, nucleotides, amino acids, peptides, etc. is demonstrated. The influence of the reaction conditions on the yield and the molar radioactivity of the labelled specimens is demonstrated. It is shown that the obtained results can be interpreted by the dependence of tritium spillover on the nature of the initial compound and other factors.

Bibliography — 158 references.

Received 15th October 2002