

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ 5% Pd/C И 5% Pd/Al₂O₃ ГАЗООБРАЗНЫМ ДЕЙТЕРИЕМ НА ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН МЕЖДУ ДЕЙТЕРИЕВОЙ ВОДОЙ И ОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ

© 2025 г. В. П. Шевченко*, И. Ю. Нагаев, К. В. Шевченко, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2

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

Получена 07.10.2024, после доработки 17.12.2024, принята к публикации 20.12.2024

При использовании серотонина, 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидина, *n*-фенилбензоата натрия, Pro-Gly-Pro показано, что активация изотопного обмена с D₂O происходит и в случае, когда раствор органического соединения в D₂O смешивали с 5% Pd/Al₂O₃ или 5% Pd/C (после предварительной обработки катализаторов газообразным дейтерием при нагревании). При реализации этой методики в серотонин включалось 2–3 атома дейтерия, в Pro-Gly-Pro – 4–5 атомов, в 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин – 7–8 атомов, а в *n*-фенилбензоат натрия – 3–4 атома. В последнем случае, судя по продуктам, образовавшимся в результате реакции, в активации изотопного обмена с D₂O принимает участие атомарный дейтерий. На участие в этих реакциях атомарного дейтерия указывает и усиление процессов деградации соединений при дейтерировании. При использовании соединений, не содержащих лабильные фрагменты, можно активировать изотопный обмен с D₂O при предварительном выдерживании катализатора при комнатной температуре и при нагревании.

Ключевые слова: дейтерий, 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин, *n*-фенилбензоат натрия, Pro-Gly-Pro, серотонин, изотопный обмен, катализ

DOI: 10.31857/S0033831125010122

ВВЕДЕНИЕ

С использованием тритиевой и дейтериевой воды метку вводят в самые разнообразные соединения: абсцисзовую кислоту, стероиды, альдегиды, полимеры, алкил-, гидроксил-, аминосодержащие ароматические соединения, а также в различные гетероароматические аналоги и т.д. в присутствии щелочных и кислотных агентов, а также кислот Льюиса [1–5]. Для этой цели используют также гомогенные катализаторы, химические и ферментативные методы [4, 6–9]. Дейтериевая вода пассивна при введении метки во многие органические соединения. Поэтому повышение эффективности изотопного обмена остается актуальной задачей и в настоящее время. Изотопный обмен с D₂O удалось активировать за счет применения гетерогенных катализаторов [10].

В работе [10] установлено, что гетерогенные катализаторы, будучи обработанными в атмосфере D₂, эффективно активировали изотопный обмен с D₂O. Так как катализатор выдерживали в атмосфере газообразного дейтерия при комнатной температуре, после чего вносили D₂O и помещали в термостат, технически более рационально было приготовить смесь катализатора с веществом, в которую после выдерживания в атмосфере D₂ добавляли D₂O.

В результате можно было определить оптимальные условия для введения метки этим методом в нужное соединение. Таким образом, катализатор активировали без растворителя, а затем изотопный обмен проводили в жидкофазном режиме. Для объяснения повышения изотопного обмена с D₂O в присутствии таких катализаторов были привлечены закономерности, выявленные при использовании твердофазного метода.

Известно, что водород при комнатной температуре (20–25°C) передвигается по носителю в виде протон-электронной пары. При этом электрон связан с ионом металла, а протон – с ионом кислорода. Интерпретация экспериментальных данных подтверждена квантовомеханическими расчетами [11]. В качестве ловушек электронов могут выступать не только такие дефекты поверхностей, как грани, углы и ступеньки, но и другие нарушения регулярной структуры [12]. В реальных условиях катализа поверхность оксидов металлов содержит сорбированные молекулы воды, которые дополнительно стабилизируют кластеры (²H⁺, e) [13]. Подобные кластеры из атомов водорода на носителе также обладают повышенной стабильностью. Образование кластеров, содержащих электроны, подтверждено ЭПР, ИК и УФ-спектрометрией.

В более ранней работе был установлен не предполагаемый заранее эффект – удаление Вос-группы с молекулы пептида [14]. Это служит еще одним доказательством участия катионов дейтерия в процессе включения метки при нагревании органического соединения в D_2O . Возник вопрос о механизме этой реакции. Высказано предположение о возможном участие в этом процессе электрона.

Есть данные, что при высоких температурах в изотопном обмене начинают принимать участие атомы изотопов водорода [15–17]. Следовательно, при таких температурах необходимо более тщательно отрабатывать условия проведения подобных реакций. Атомы дейтерия будут способствовать не только изотопному обмену, но и реакциям гидрирования и полимеризации, что будет влиять на выход искомого соединения. Возникает вопрос, что будет превалировать: активация изотопного обмена или деградация вещества.

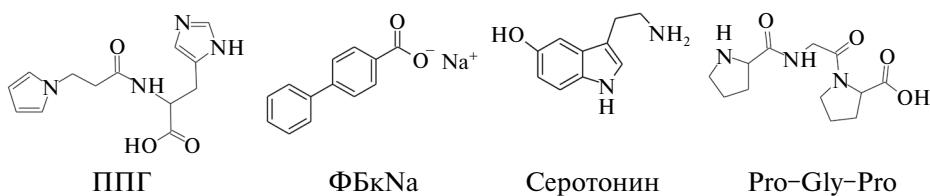
В качестве веществ, на которых проверяли эффективность методик, использовали Pro–Gly–Pro, серотонин, 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин (ППГ) и *n*-фенилбензоат натрия (ФБкNa). Такой выбор обусловлен тем, что, с одной стороны, оптимизация условий для получения изотопнومеченных биологически активных соединений всегда является приоритетной, с другой стороны, выбранные соединения позволяют установить лабильность как насыщенных, так и ароматических молекул с разной степенью устойчивости в условиях реакции.

Биологическая активность ППГ, Pro–Gly–Pro и серотонина не нуждается в подтверждениях. Они обладают антиоксидантным, цитопротекторным и нейропротекторным действием [18–20]. Установлено, что Pro–Gly–Pro проходит

гематоэнцефалический барьер и соответственно может действовать не только на периферии, но и непосредственно на структуры центральной нервной системы [21]. Кроме того, Pro–Gly–Pro проявляет противоязвенные эффекты и оказывает терапевтическое действие, замедляя развитие и ускоряя заживление ацетатной язвы. Серотонин играет важную роль в процессах свертывания крови, участвует в процессах аллергии и воспаления, в регуляции моторики и секреции в желудочно-кишечном тракте, а также во многих других процессах [22].

Использование ФБкNa может оказаться особенно информативным [15–17]. Дело в том, что имеются стандарты продуктов гидрирования как фенильного фрагмента, так и восстановленного фрагмента бензоата. А ранее было показано, что если изотопный обмен идет под действием катионов дейтерия, то взаимодействие эффективно происходит только с фенильным фрагментом, в результате при восстановлении ФБкNa образуется 4-циклогексилбензоат натрия (ЦГБкNa). При взаимодействии с атомарным дейтерием более эффективно происходит гидрирование фрагмента бензоата с образованием *n*- $C_6H_5C_6H_{10}COONa$ (ФЦГСОONa). Таким образом, анализ продуктов, полученных при различных условиях реакции, позволяет сделать определенные выводы о природе активированных частиц дейтерия, участвующих при введении изотопа водорода.

Цель работы – введение дейтерия в ППГ, ФБкNa, серотонин и Pro–Gly–Pro изотопным обменом с D_2O и исследование влияния на эффективность этого процесса катализаторов 5% Pd/C, 5% Pd/ Al_2O_3 , предварительно обработанных газообразным дейтерием при разных температурах.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, реагенты и растворители – коммерческие препараты. Катализаторы 5% Pd/ Al_2O_3 (Fluka, США, арт. 76002, Lot 1237712/24106249), 5% Pd/C (Fluka, США, арт. 75992, Lot 1298039/33407344). ППГ любезно предоставлен Научным центром неврологии (Москва, Россия).

Для анализа реакционных смесей использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. ВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром А-02 с использованием

колонки ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ (2×75 мм, размер частиц 5 мкм). Подвижная фаза: А – 200 мМ LiClO₄ + 5 мМ HClO₄, Б – MeOH, линейный градиент 50–100% MeOH и 30–100% MeOH. Скорость подачи элюента 0.15 мл/мин. Температура колонки 35°C.

Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (ThermoElectron, США) с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекуларного иона в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ.

*Общая методика введениядейтерия
в ППГ и ФБкНа*

а) Катализатор (10 мг) помещали в ампулу и обрабатывали газообразным дейтерием 1 ч при комнатной температуре или 10 мин при 100–220°C. Затем вносили в ампулу 50 мкл раствора ППГ или ФБкНа в дейтериевой воде (10 мг/мл), заполняли ампулу аргоном и запаивали. Реакцию вели при 150°C в течение 30 мин. После реакции ампулу вскрывали, вещество смывали с катализатора водным метанолом (MeOH–H₂O 1 : 1) (3 × 0.2 мл). Фильтраты упаривали, и остаток растворяли в 0.5 мл смеси MeOH–H₂O (1 : 4). Экстракт анализировали. В качестве катализатора использовали 5% Pd/C, 5% Pd/Al₂O₃.

б) Катализатор (10 мг) помещали в ампулу и обрабатывали газообразным дейтерием 10 мин при 100–220°C. После охлаждения до комнатной температуры ампулу присоединяли к вакуумной установке и откачивали до давления 1 Па. Затем прекращали вакуумирование и заполняли ампулу аргоном. Далее реакцию и анализ проводили, как описано выше.

Методика введения дейтерия в серотонин

Серотонин (15.0 мг) растворяли в 0.5 мл воды, вносили 300 мг Al₂O₃. Смесь при вращении на роторном испарителе замораживали жидким азотом и лиофилизовали в течение ночи. Образовавшийся остаток растирали с 5% Pd/Al₂O₃ (75 мг). В результате получали смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–серотонин (5 : 20 : 1).

а) Смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–серотонин (6.5 мг) помещали в ампулу и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере газообразного дейтерия (при давлении 400 гПа). К насыщенной дейтерием смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–серотонин добавляли 50 мкл дейтериевой воды, ампулу заполняли аргоном, запаивали и выдерживали 30 мин при температуре 150–200°C. Затем растворитель удаляли лиофилизацией. К смеси добавляли 0.5 мл метанола, катализатор отфильтровывали и промывали метанолом (3 × 0.5 мл). Экстракты упаривали. Сухой остаток растворяли в 250 мкл воды, определяли выход [D]серотонина, раствор выдерживали в течение 1 ч для удаления лабильного дейтерия и снимали массспектр и ВЭЖХ.

б) 5% Pd/Al₂O₃ (15 мг) помещали в ампулу и обрабатывали газообразным дейтерием 10 мин при 200°C. Затем после охлаждения до комнатной температуры ампулу с катализатором вакуумировали до давления 1 Па и заполняли аргоном, как описано выше. Затем добавляли 50 мкл раствора серотонина в дейтериевой воде (10 мг/мл) и запаивали. Реакцию вели 30 мин при 150–200°C. Далее содержимое ампулы разбавляли 0.5 мл метанола, отделяли катализатор центрифугированием. Раствор упаривали, остаток растворяли в 0.5 мл MeOH–H₂O (1 : 4), проводили анализ, как описано выше.

Методика введения дейтерия в Pro–Gly–Pro

Pro–Gly–Pro (8.4 мг) растворяли в 0.6 мл воды, затем в раствор вносили 168 мг Al₂O₃. Смесь при вращении на роторном испарителе замораживали жидким азотом и лиофилизовали. Образовавшийся остаток растирали с 5% Pd/Al₂O₃ (42 мг). В результате получали смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–(Pro–Gly–Pro) (5 : 20 : 1).

Смесь Al₂O₃ (100 мг) и 5% Pd/Al₂O₃ (25 мг) дисперсировали в воде (0.6 мл), при вращении на роторном испарителе замораживали жидким азотом и лиофилизовали.

а) Смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–(Pro–Gly–Pro) (13 мг) помещали в ампулу и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере газообразного дейтерия (давление 400 гПа). К насыщенной дейтерием смеси 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–(Pro–Gly–Pro) добавляли 50 мкл дейтериевой воды, ампулу продували аргоном, запаивали и выдерживали 30 мин при температуре 150°C. Затем растворитель удаляли лиофилизацией. К остатку добавляли 0.5 мл метанола, пептид экстрагировали три раза с использованием шейкера и центрифугирования. Затем определяли выход Pro–Gly–Pro и содержание в нем дейтерия (методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ).

б) Смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ помещали в 3 ампулы (навески по 25 мг). Первую ампулу обрабатывали газообразным дейтерием (давление 400 гПа) 1 ч при комнатной температуре, а две других – 10 мин при 200°C.

При использовании первой методики в ампулу вносили 50 мкл раствора Pro–Gly–Pro в D₂O (20 мг/мл), заполняли аргоном и запаивали. Дальнейшие действия проводили, как описано в предыдущем разделе.

Вторую ампулу с насыщенным дейтерием 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ присоединяли к вакуумной установке и откачивали до давления 1 Па. Затем прекращали вакуумирование и заполняли ампулу аргоном. Ампулу снимали, вносили 50 мкл раствора Pro–Gly–Pro в D₂O (20 мг/мл) и запаивали. Дальнейшие действия проводили, как описано выше.

В третью ампулу сразу вносили 50 мкл раствора Pro–Gly–Pro в D₂O (20 мг/мл), заполняли аргоном и запаивали. Дальнейшие действия проводили, как описано выше.

в) 5% Pd/Al₂O₃ (10 мг) помещали в ампулу и обрабатывали газообразным дейтерием (при давлении 400 гПа) при комнатной температуре в течение 1 ч или 10 мин при 200°C. В ампулу помещали 50 мкл раствора Pro–Gly–Pro в D₂O (20 мг/мл), заполняли аргоном и запаивали. После выдерживания ампулы в течение 30 мин при температуре 150°C D₂O упаривали. Далее реакции и обработку проводили, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поставленная задача – оценка влияния температуры активации катализатора на эффективность изотопного обмена между D_2O и органическим соединением – потребовала изменить применяемую ранее методику [10], согласно которой смесь вещества, 5% Pd/Al_2O_3 и Al_2O_3 активировали газообразным дейтерием при комнатной температуре, затем вносили D_2O и грели при выбранной температуре. Таким образом, варьировали температуру и время, в течение которого проводили реакцию с D_2O . Эта методика была возможна, так как при комнатной температуре включение дейтерия в препараты не происходило. При активации катализатора при более высоких температурах присутствие вещества в контакте с ним уже невозможно. В этом случае протекал бы твердофазный изотопный обмен, что исказило бы зависимость эффективности изотопного обмена между D_2O и органическим соединением от температуры, при которой активировали катализатор. Поэтому активацию катализатора при разных температурах проводили отдельно от вещества (“новая методика”). В ампулу с катализатором, активированным при определенной температуре в атмосфере дейтерия, вносили раствор вещества в D_2O , заполняли ампулу аргоном, запаивали и нагревали в термостате.

В качестве реперов для оценки влияния активированных катализаторов на изотопный обмен с D_2O использовали хорошо изученные ранее соединения ППГ [10] и ФБкNa [14–16], а условия реакции с D_2O (30 мин и 150°C) взяты из работы [10].

При использовании новой методики оказалось, что активированный газообразным дейтерием при комнатной температуре 5% Pd/Al_2O_3 обеспечивал включение в ППГ изотопным обменом с D_2O около 6.15 атома дейтерия, что примерно на 10% отличается от количества дейтерия, включаемого по прежней методике (содержание дейтерия 6.78 атома) [10]. Таким образом, при сравнении новой и прежней методики активирования изотопного обмена можно проследить, какие изменения атомарный дейтерий вносит в эффективность включения метки. Одновременно можно оценить изменение устойчивости биологически активного соединения.

При выдерживании раствора ППГ в D_2O даже при комнатной температуре в течение 30 мин с катализатором, предварительно активированным при 220°C, оказалось, что выход ППГ упал до 30–40%. Включение дейтерия в случае 5% Pd/Al_2O_3 достигало 1.15 атома, а в случае 5% Pd/C – 0.64 атома. Другими словами, образовавшийся при такой температуре на палладиевом катализаторе атомарный дейтерий активирует реакции с D_2O даже при комнатной температуре, но этот процесс больше способствует деградации вещества, чем изотопному обмену.

Естественно, при проведении реакции между D_2O и ППГ (150°C, 30 мин) на катализаторе,

активированном при 220°C, выход оказался еще ниже. В этих условиях на активированном 5% Pd/C выход не превышал 10%, а на 5% Pd/Al_2O_3 – 20%. Среднее количество дейтерия, которое включалось в ППГ при изотопном обмене с D_2O на 5% Pd/C , активированном при 160, 180 и 200°C, составляло 7.65, 7.60 и 5.85 атома соответственно. Для 5% Pd/Al_2O_3 включение дейтерия изменялось меньше. Активация при 160, 180 и 200°C приводила к включению в среднем 6.42, 6.60 и 6.75 атома дейтерия соответственно. Другими словами, при работе с ароматическими соединениями степень включения метки оказалась примерно та же, что и при использовании прежней методики, но деградация вещества происходит интенсивней, и выход дейтерированного аналога небольшой. Набор изотопомеров в ППГ при использовании прежней и новой методик для одного и того же катализатора приведен на рис. 1.

При использовании прежней методики максимальное содержание изотопомера с семью атомами дейтерия, при новой методике на том же катализаторе – с шестью, при использовании 5% Pd/C – с четырьмя атомами дейтерия (рис. 1). Практически все молекулы вещества вступают в реакцию обмена. Изотопомеры, не содержащие дейтерий, присутствуют в незначительном количестве, что важно при использовании дейтерированных препаратов в масс-спектрометрии.

Состав изотопомеров, образовавшихся при нагревании ППГ в D_2O (150°C, 30 мин) в присутствии катализаторов, предварительно обработанных D_2 при 180 и 200°C, представлен на рис. 2. Можно отметить, что вклад ППГ, не содержащего дейтерия, меньше в присутствии 5% Pd/Al_2O_3 . На 5% Pd/C , активированном при 180°C, при изотопном обмене с D_2O (150°C, 30 мин) образование изотопомеров с большим количеством атомов дейтерия выше, чем на 5% Pd/Al_2O_3 . При активации 5% Pd/C при 200°C изотопомеров с 8–10 атомами дейтерия становится меньше, чем при 180°C, что, по-видимому, связано с деградацией при более высокой температуре активации в первую очередь изотопомеров с большим количеством атомов дейтерия. При активации 5% Pd/Al_2O_3 при 200°C наблюдается другая картина: количество изотопомеров с большим количеством атомов дейтерия растет. Можно предположить, что на менее активном 5% Pd/Al_2O_3 при 200°C деградация изотопомеров с большим количеством атомов дейтерия происходит менее интенсивно. Еще одним объяснением этого эффекта может бытьdezактивация катализатора. Показано, что, если потоки активированных частиц с металлаактиватором и спилловер катионов водорода по носителю не равнозначны, то происходит насыщение металла-катализатора водородом [23–25]. В результате частицы $H^{\delta+}$ превращаются в объемные и малоподвижные ионы $H^{\delta-}$. Концентрация $H^{\delta+}$ падает, что приводит к практически полному прекращению

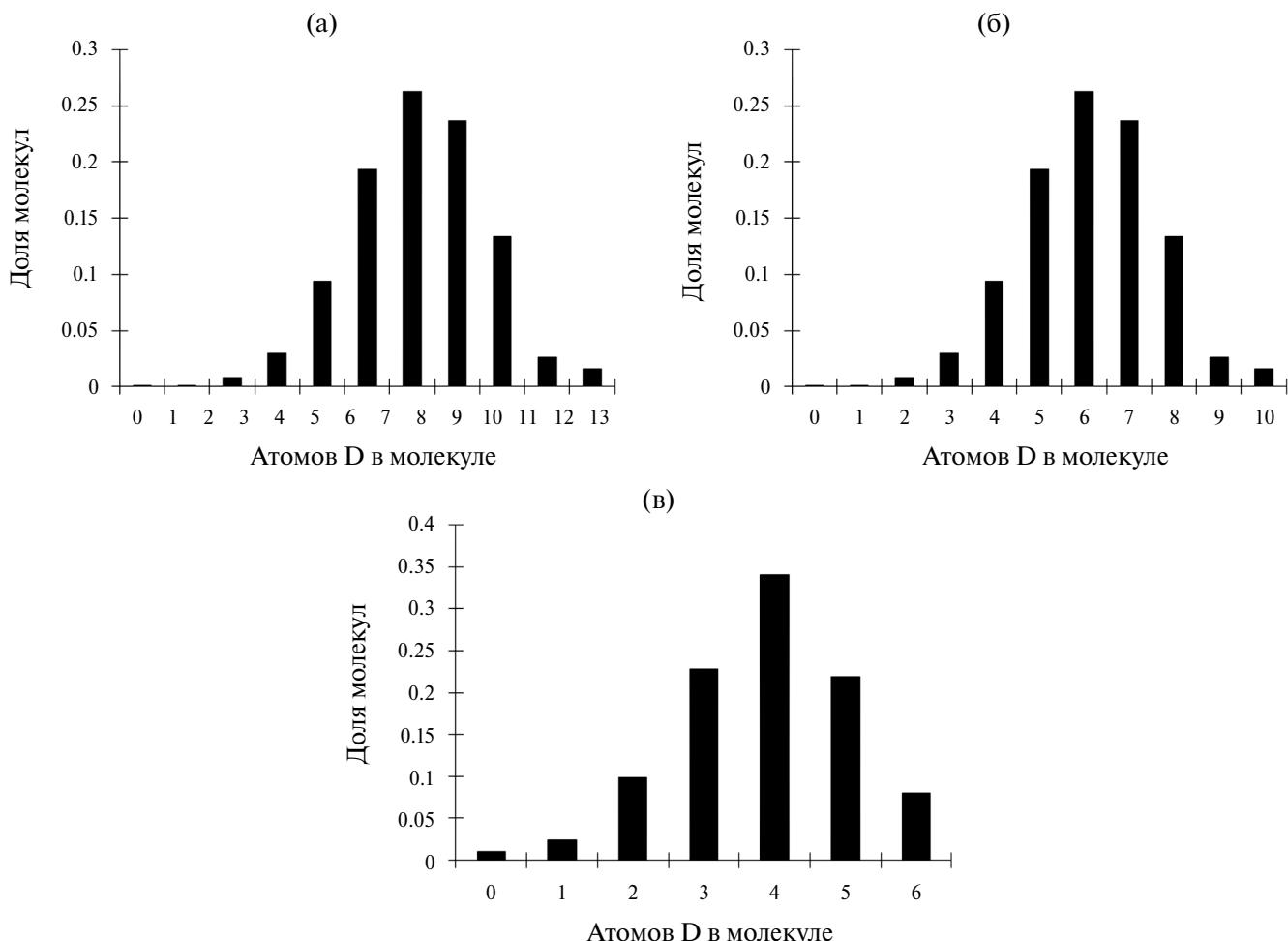


Рис. 1. Изотопный состав ППГ после реакции с D₂O (150°C, 30 мин) с катализаторами, активированными при комнатной температуре. а – прежняя методика, 5% Pd/Al₂O₃; б – новая методика, 5% Pd/Al₂O₃; в – новая методика, 5% Pd/C.

изотопного обмена. По-видимому, при повышении температуры в случае 5% Pd/C насыщение металла-катализатора водородом происходит быстрее, чем в случае 5% Pd/Al₂O₃. Поэтому активация изотопного обмена при более высокой температуре на 5% Pd/Al₂O₃ выше.

Причина падения выхода ППГ за счет образования атомарногодейтерия при активизации катализаторов при более высокой температуре подтверждена при проведении аналогичной серии экспериментов с ФБкNa. Установлено, что на катализаторе, активированном при температурах выше 100°C, при реакции ФБкNa с D₂O (150°C, 30 мин) образовывался не только [D]ФБкNa, но и [D]ЦГБкNa и [D]ФЦГСОONa, т.е. при включениидейтерия в ФБкNa принимает участие атомарныйдейтерий (табл. 1).

Как видно из полученных данных (табл. 1), основным продуктом реакции является ФЦГСОONa. Гидрирование фенильного кольца тоже происходит, но в меньшей степени. При этом чем выше температура, при которой предварительно выдерживали катализатор в атмосфередейтерия, тем меньше

становится ЦГБкNa, что также указывает на участие в гидрировании атомарногодейтерия. При активации катализатора при 180°C и выше соединения с гидрированным фенильным кольцом не обнаруживаются. По-видимому, основная часть ФБкNa под воздействием D[•] образует полимер.

Этот результат можно объяснить тем, что при более высокой температуре в атмосфере D₂ не только увеличивается количество кластеров (D⁺, e⁻) на носителе, но и образуются кластеры с большим содержанием активированных частиц водорода в расчете

Таблица 1. Продукты реакции ФБкNa с D₂O (150°C, 30 мин) в присутствии 5% Pd/C, активированного при 120–200°C 10 мин в атмосфере D₂

Соединение	Выход, %, при температуре активации катализатора, °C			
	120	160	180	200
ФБкNa	12.6	0.7	0.5	0.3
ЦГБкNa	4.1	1.3	—	—
ФЦГСОONa	9.4	10.8	10.6	9.6

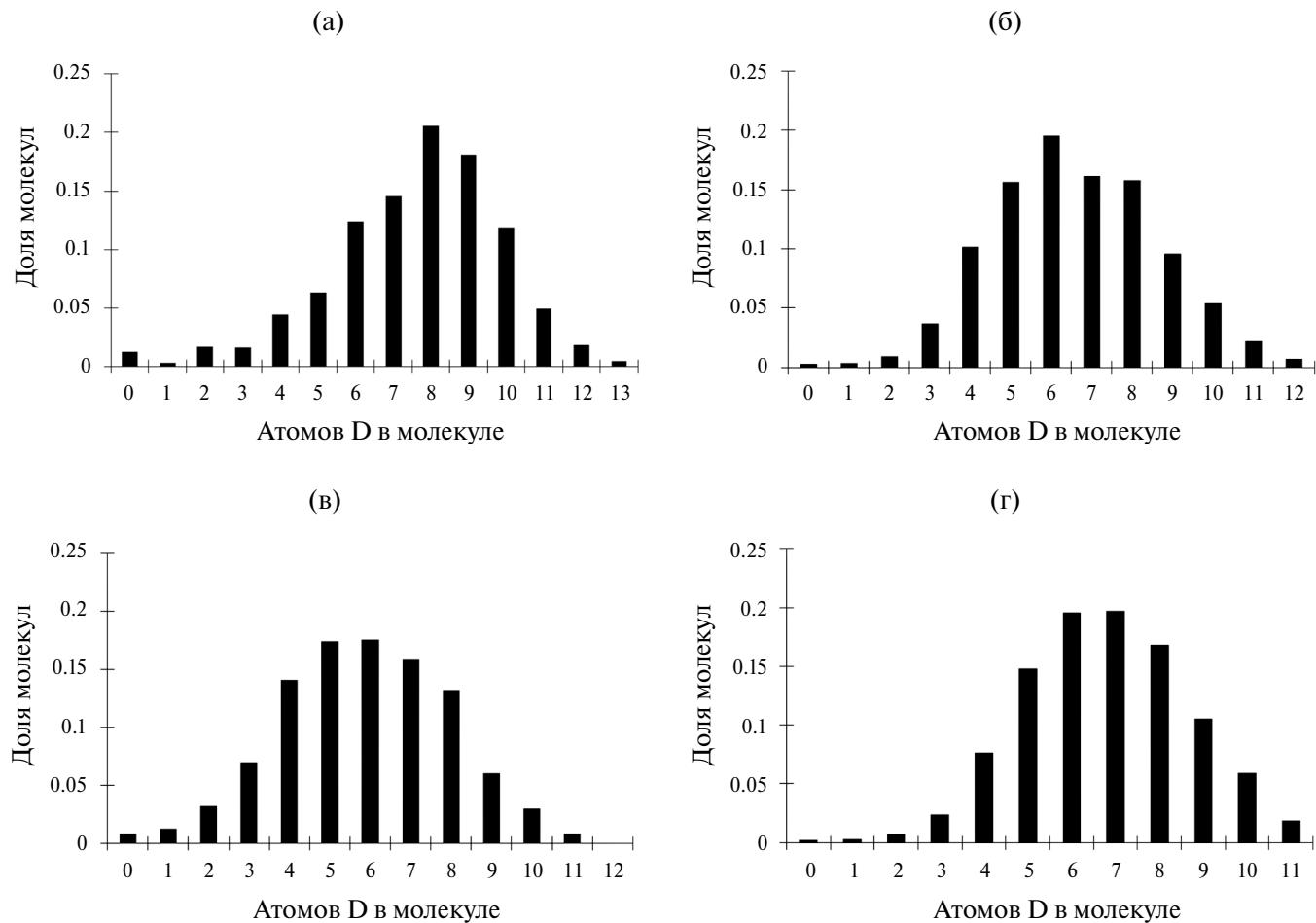


Рис. 2. Изотопный состав ППГ после реакции с D₂O (150°C, 30 мин) с катализаторами, активированными при 180 и 200°C. а – 180°C, 5% Pd/C; б – 180°C, 5% Pd/Al₂O₃; в – 200°C, 5% Pd/C; г – 200°C, 5% Pd/Al₂O₃.

на атомы носителя [11]. Очевидно, что увеличение количества активированных частиц (nD^+ , $n\bar{e}$) в кластере приведет при взаимодействии D⁺ и электронов к большей вероятности образования атомарногодейтерия, который способен к восстановлению ароматических соединений [26, 27]. В результате образования атомарного дейтерия восстанавливается ФБкNa до ФЦГСОONa и усиливается деградация вещества [4].

Известно, что при более низком давлении скорость гидрирования заметно падает [28]. С целью повышения выхода ароматических соединений

катализатор после нагревания в атмосфере дейтерия вакуумировали до давления 1 Па при комнатной температуре.

После вакуумирования катализатора в ампулу вносили раствор ФБкNa в D₂O, запаивали и помещали в термостат. В этом случае использовали 5% Pd/Al₂O₃ (табл. 2).

Как видно из табл. 2, выход [D]ФБкNa стал высоким, т.е. соотношение активированных частиц дейтерия на носителе изменилось в пользу катионов дейтерия. Но дейтерирование ФБкNa по-прежнему

Таблица 2. Продукты реакции ФБкNa с D₂O (150°C, 30 мин) в присутствии 5% Pd/Al₂O₃, активированного при 100–160°C 10 мин в атмосфере D₂ и вакуумированного до 1 Па

Соединение	Выход, %, при температуре активации катализатора, °C			
	100	120	140	160
ФБкNa	53.3 (2.55)*	55.2 (2.83)	55.1 (3.35)	44.5 (3.78)
ЦГБкNa	2.2	2.8	2.0	1.6
ФЦГСОONa	12.0	11.6	10.3	10.4

* В скобках указано количество атомов дейтерия.

определялось атомарным дейтерием. С большим преимуществом образуется ФЦГСОONa по сравнению с ЦГБкNa.

Были и отрицательные последствия вакуумирования. Количество молекул ФБкNa, не содержащих дейтерий, значительно возросло. Даже при активации катализатора при 220°C таких молекул около 6%. Таким образом, новую методику с учетом устойчивости соединения в присутствии атомарного водорода можно использовать для введения изотопов водорода.

Еще один тест для прежней и новой методик провели при сравнении выхода и включения дейтерия при введении метки в серотонин (рис. 3, 4). Активацию D₂ проводили на 5% Pd/Al₂O₃ при 180, 200 и 220°C с последующим вакуумированием. При смешении раствора серотонина в D₂O с катализатором реакцию вели при 150°C в течение 30 мин.

Включение дейтерия при 180, 200 и 220°C равнялось 2.18, 2.33 и 1.64 атома соответственно, выход при этом падал с 20 до 8%. По-видимому, уменьшение включения дейтерия при активации катализатора при 220°C связано с частичной дезактивацией катализатора при такой температуре. Можно отметить, что при активации дейтерием 5% Pd/Al₂O₃ при 180°C без вакуумирования (рис. 4) включение дейтерия было выше (3.62 атома), но выход падал более чем в 6 раз. Использование вакуумирования, как и в случае с получением [D]ФБкNa, имеет тот же недостаток: состав изотопомеров содержит большой процент слабомеченных продуктов и продуктов, не содержащих дейтерий (рис. 3б, 4а). По-видимому, при вакуумировании происходит значительное уменьшение активированных частиц в кластерах, за счет чего увеличивается выход меченого соединения и уменьшение эффективности изотопного обмена.

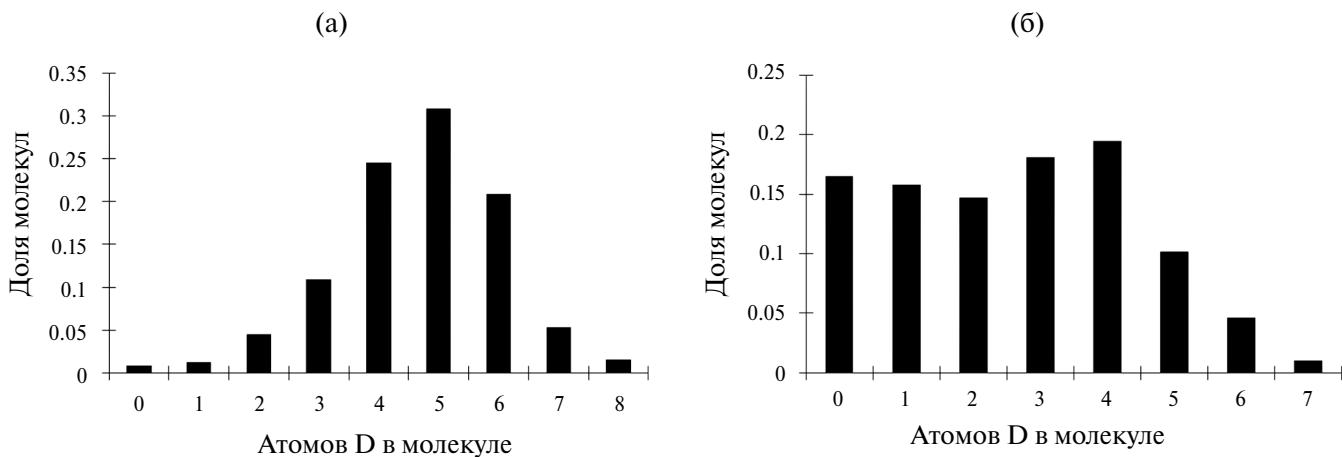


Рис. 3. Изотопный состав серотонина после реакции с D₂O (200°C, 30 мин): а – смесь 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃–серотонин (5 : 20 : 1), активированная при комнатной температуре 60 мин (прежняя методика); б – 5% Pd/Al₂O₃, активированный при 200°C 10 мин с последующим вакуумированием (новая методика).

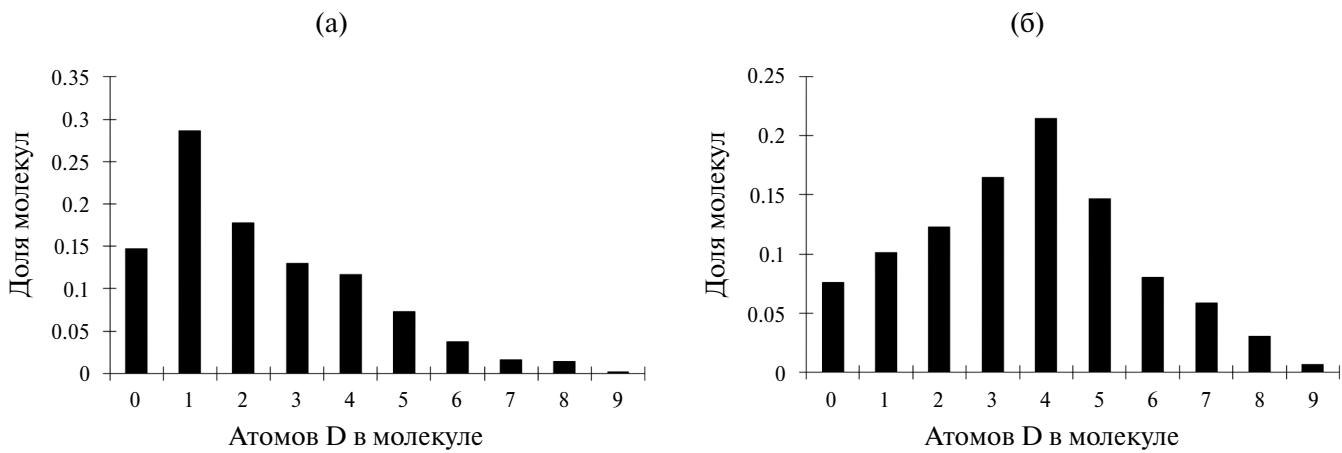


Рис. 4. Изотопный состав серотонина после реакции с D₂O (150°C, 30 мин, новая методика): а – 5% Pd/Al₂O₃, активированный при 180°C 10 мин с последующим вакуумированием; б – 5% Pd/Al₂O₃, активированный при 180°C 10 мин без вакуумирования.

Учитывая эти данные, для дальнейшего использования прежней и новой методик (5% Pd/Al₂O₃) активировали при 200°C, с последующим вакуумированием) сравнили выход и включение дейтерия в серотонин при изотопном обмене с D₂O при 150, 170, 190 и 200°C. Оказалось, что при использовании новой методики повышение температуры увеличило включение дейтерия только 1.2 раза, а выход падал с 20 (150°C) до 13 (170°C), 7% (190°C) и практически до нуля (200°C). Условия прежней методики оказались более приемлемыми: повышение температуры увеличивало включение дейтерия с 2.29 (150°C) до 2.40 (170°C), 3.43 (190°C) и 4.68 атома (200°C) при уменьшении выхода с 43 до 38, 30 и 20% соответственно. Таким образом, для лабильных соединений прежняя методика более перспективна.

Использование Pro–Gly–Pro, который не содержит ароматических и других ненасыщенных фрагментов, позволяет проводить изотопный обмен с D₂O, не опасаясь побочных реакций восстановления, гидрогенолиза и полимеризации. Таким образом, можно сравнить применимость прежней и новой методик для насыщенных соединений (табл. 3).

Как видно из представленных данных (табл. 3), новую методику можно применять для введения дейтерия в соединения, более устойчивые к атомарному дейтерию. В этом случае при активации катализатора при комнатной температуре или при 200°C включение дейтерия практически не отличается, но выход все же ниже при активации катализатора при 200°C. В отличие от экспериментов с серотонином в случае Pro–Gly–Pro последующее вакуумирование катализатора, обработанного при 200°C, не требовалось.

Чтобы соотношение всех компонентов в реакционной смеси по прежней и новой методике было одинаковым, при использовании новой методики готовили смесь Al₂O₃ и 5% Pd/Al₂O₃ (20 : 5). Таким образом, количество Al₂O₃ в экспериментах по обоим методикам становилось одинаковым. При этом оказалось, что при использовании новой методики включение дейтерия стало на 16% ниже. Таким образом, меньшее количество Al₂O₃ в новой методике

Таблица 3. Продукты реакции Pro–Gly–Pro с D₂O по прежней и новой методикам

Условия обработки перед реакцией с D ₂ O (150°C, 30 мин)	Выход	Σ[D]
Пептид в D ₂ O	100	0.03
Пептид–5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ , D ₂ , 1 ч, комнатная температура	56.9*	4.3
5% Pd/Al ₂ O ₃ , D ₂ , 1 ч, комнатная температура → пептид в D ₂ O	58.6**	4.4
5% Pd/Al ₂ O ₃ , D ₂ , 10 мин, 200°C → пептид в D ₂ O	32.6**	4.6
5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ , D ₂ , 1 ч, комнатная температура → пептид в D ₂ O	82.0**	3.6
5% Pd/Al ₂ O ₃ , D ₂ , 10 мин, 200°C → вакуум 1 Па → пептид в D ₂ O	60.6**	3.6
5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ , D ₂ , 10 мин, 200°C → вакуум 1 Па → пептид в D ₂ O	75.8**	1.6
5% Pd/Al ₂ O ₃ –Al ₂ O ₃ , D ₂ , 10 мин, 200°C → пептид в D ₂ O	70.3**	1.7

* Прежняя методика; ** новая методика.

не является причиной изменения эффективности изотопного обмена.

Наименьшее содержание изотопомера Pro–Gly–Pro, не содержащего дейтерий, в случае, когда реакцию проводили при активации катализатора при комнатной температуре, оказалось при использовании прежней методики (рис. 5). Активацию 5% Pd/Al₂O₃, 5% Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ или 5% Pd/Al₂O₃ с последующим вакуумированием проводили при 200°C в атмосфере D₂. После нагревания раствора пептида с D₂O (30 мин и 150°C) в присутствии катализаторов, обработанных в перечисленных выше условиях, содержание изотопомера Pro–Gly–Pro, не содержащего дейтерий, составило 6, 39 и 12% соответственно (рис. 6). При реализации новой методики использование дополнительного носителя (Al₂O₃) или вакуумирование катализатора уменьшает эффективность изотопного обмена (табл. 3).

Для использования меченых изотопами водорода препаратов в биологических исследованиях важно знать распределение метки в их фрагментах. При введении дейтерия в Pro–Gly–Pro и по прежней, и по новой методике оказалось, что основная часть метки входит в N-концевой пролин. Относение содержания дейтерия в аминокислотных остатках в Pro–Gly–Pro при реализации прежней методики составило: N-концевой пролин : глицин : C-концевой пролин = 7.4 : 3.2 : 1 (рис. 7). При раздельной активации катализатора (200°C) с последующим смешиванием его с раствором Pro–Gly–Pro в D₂O и нагреванием соотношение дейтерия в цепочке пролин–глицин–пролин составило 9.3 : 4.1 : 1 (рис. 7). Таким образом, с катализатором, активированным при более мягких условиях, распределение метки происходит более равномерно.

Это, по-видимому, свидетельствует о том, что при реализации прежней методики разные фрагменты Pro–Gly–Pro в зависимости от их способности захватывать активированные частицы дейтерия и электроны, образовавшиеся на носителе, будут определять распределение метки и эффективность изотопного обмена при нагревании в D₂O. В случае новой методики изотопный обмен происходит более интенсивно, и дейтерий включается в наиболее

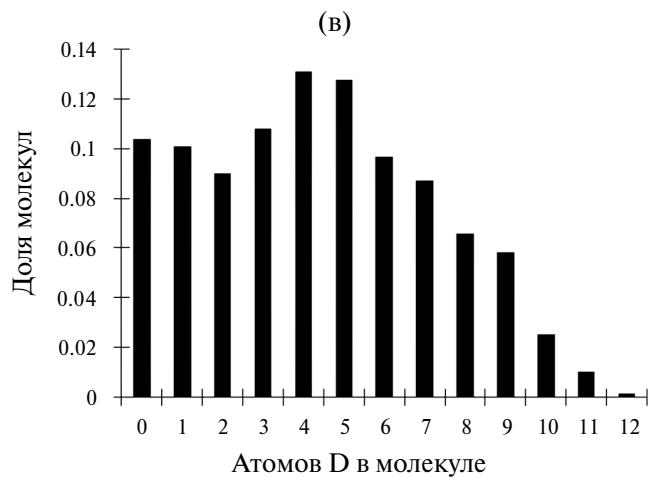
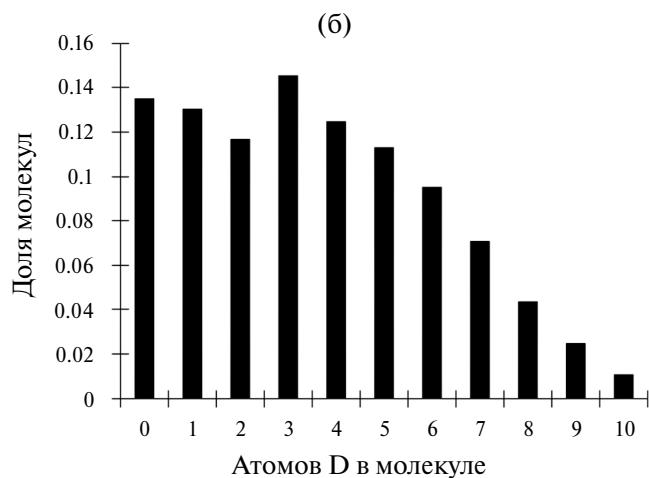
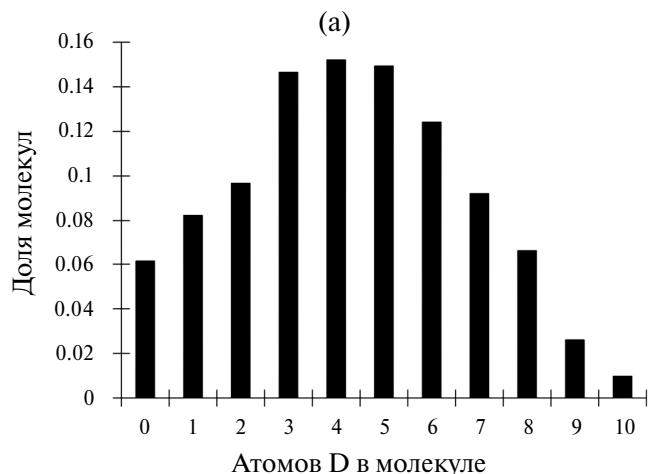


Рис. 5. Изотопный состав Pro—Gly—Pro после реакции с D_2O ($150^\circ C$, 30 мин): а – Пептид–5% Pd/ Al_2O_3 – Al_2O_3 , D_2 , 1 ч, комнатная температура (прежняя методика); б – 5% Pd/ Al_2O_3 – Al_2O_3 , D_2 , 1 ч, комнатная температура, затем добавили пептид в D_2O ; в – 5% Pd/ Al_2O_3 – Al_2O_3 , D_2 , 1 ч, комнатная температура, затем добавили пептид в D_2O .

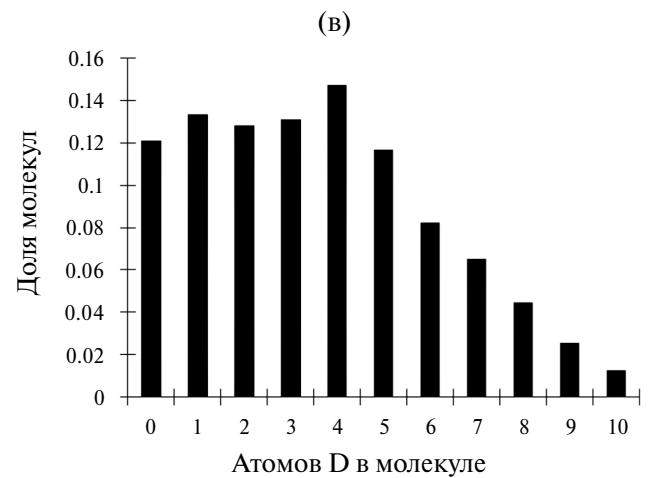
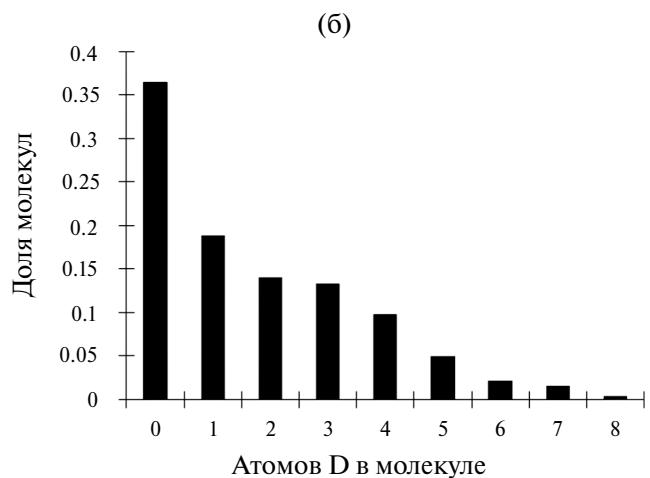
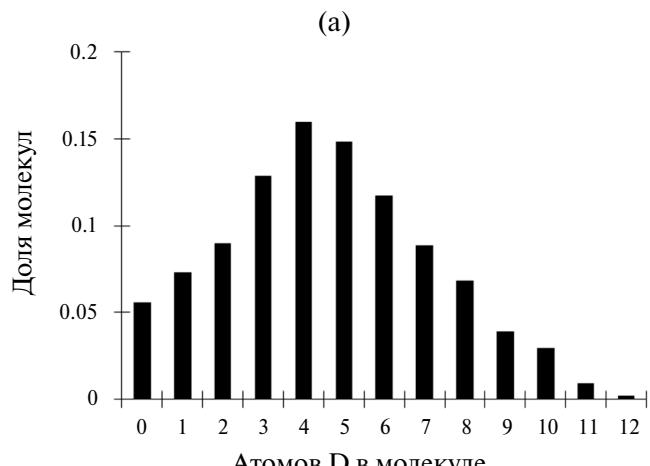


Рис. 6. Изотопный состав Pro—Gly—Pro после реакции с D_2O ($150^\circ C$, 30 мин): а – 5% Pd/ Al_2O_3 , D_2 , 10 мин, $200^\circ C$, затем добавление пептида в D_2O ; б – 5% Pd/ Al_2O_3 – Al_2O_3 , D_2 , 10 мин, $200^\circ C$, затем добавление пептида в D_2O ; в – 5% Pd/ Al_2O_3 – Al_2O_3 , D_2 , 10 мин, $200^\circ C$, затем вакуумирование, затем добавление пептида в D_2O .

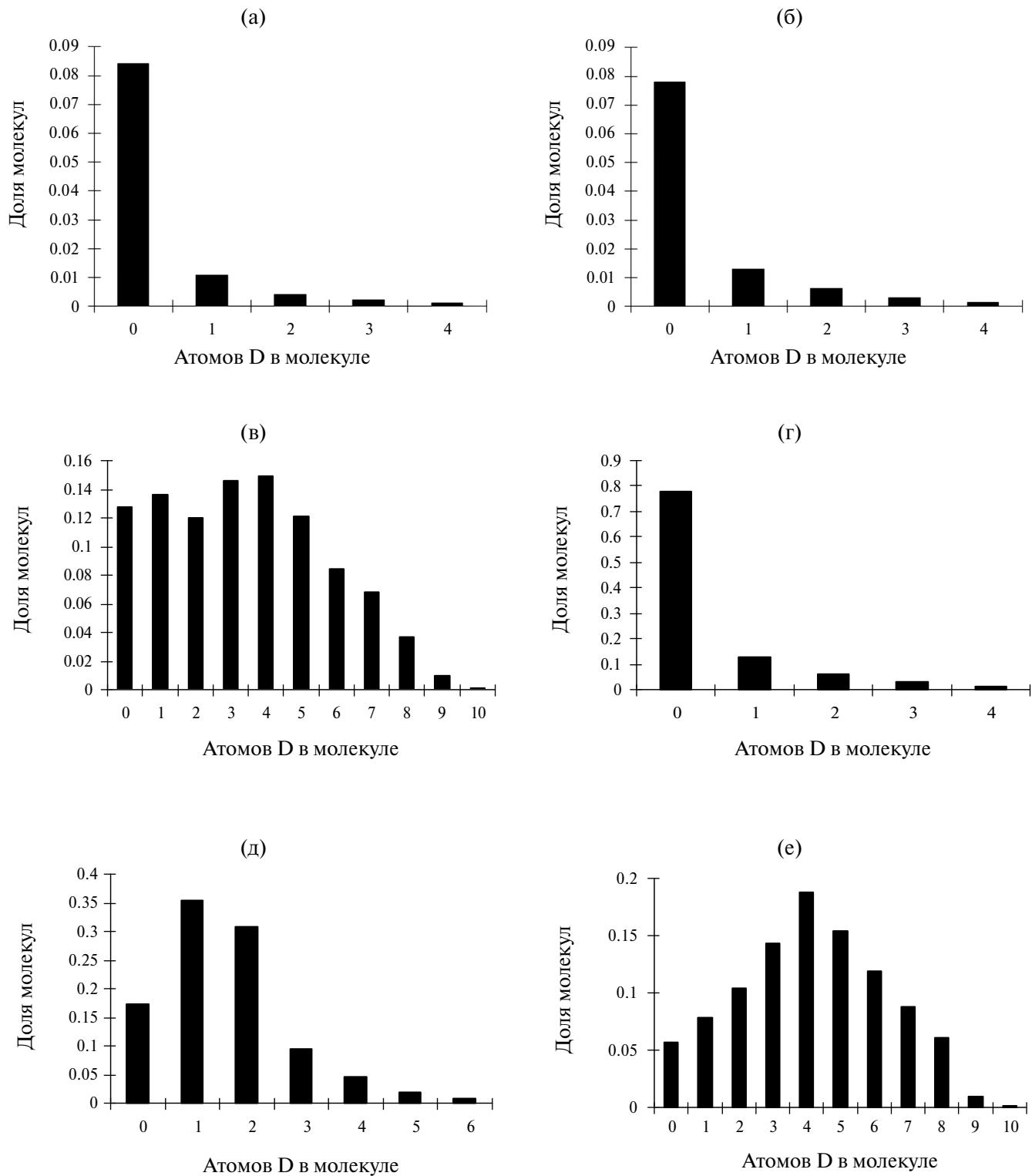


Рис. 7. Изотопный состав фрагментов Pro—Gly—Pro после реакции с D_2O : а, г —дейтерий в С-концевом пролине; б, д —дейтерий во фрагменте Gly—Pro; в, е —дейтерий во фрагменте Pro—Gly. Условия реакции: а—в — 5% Pd/ Al_2O_3 , D_2 , 10 мин, 200°C, затем пептид в D_2O , 150°C, 30 мин; г—е — смесь 5% Pd/ Al_2O_3 — Al_2O_3 —пептид, D_2 , 1 час, комнатная температура, затем 150°C, D_2O , 30 мин.

доступных фрагментах молекулы пептида. В результате увеличивается влияние стерических факторов. Распределение метки становится менее равномерным, а за счет радикальных процессов общий выход падает (табл. 3).

При изотопном обмене с D₂O использование той или иной методики зависит от устойчивости органического соединения. Для введения дейтерия в лабильные соединения более приемлемой является прежняя методика. При введении дейтерия в более устойчивые соединения можно использовать катализаторы, активированные при нагревании в атмосфере D₂ при более высокой температуре. В первом случае, как уже отмечалось во Введении, активация изотопного обмена с D₂O идет в основном за счет катионов дейтерия, во втором — вклад в этот процесс вносит атомарный дейтерий, который одновременно способствует заметной деградации вещества.

Кроме прикладного значения этого исследования, имеет смысл более подробно рассмотреть процессы, которые происходят при введении изотопов водорода с использованием данных, полученных при сравнении этих методик. При использовании обеих методик на носителе образуются связанные электроны и катионы изотопа водорода [10, 14, 29, 30]. В зависимости от эффективности взаимодействия ё и D⁺ с молекулами вещества и атомами носителя при смешивании раствора вещества в D₂O с активированным катализатором происходит перераспределение этих частиц между ними. Таким образом, эффективность изотопного обмена и распределение дейтерия между фрагментами вещества определяются вероятностью захвата активированных частиц дейтерия, связанных с носителем, молекулами вещества. По-видимому, активированные частицы дейтерия, образовавшиеся в объеме носителя, диффундируют на его поверхность постепенно. Поэтому D⁺ и ё могут активировать изотопный обмен продолжительное время. По крайней мере, после выдерживания смеси катализатор—вещество в атмосфере дейтерия при комнатной температуре изотопный обмен D₂O с 3-(N-салицил)пропаноил-L-гистидином эффективно шел при 190°C в течение 30 мин [10].

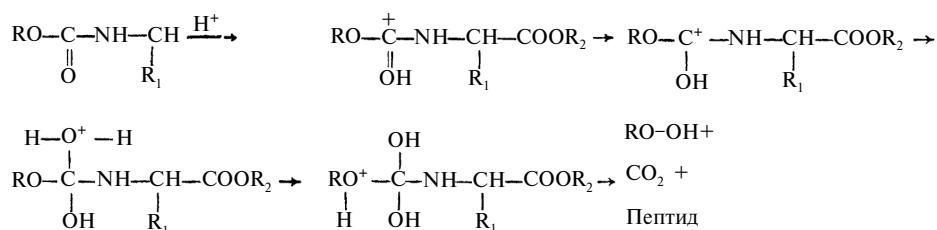
При активации катализатора при более высоких температурах на нем образуются кластеры

с большим содержанием D⁺ и ё, при взаимодействии этих активированных частиц образуется атомарный дейтерий. Появление атомарного дейтерия зафиксировано при восстановлении ФБкNa. При использовании соответствующих стандартов показано, что при восстановлении ФБкNa преимущественно образуется n-C₆H₅C₆H₁₀COONa (ФЦГCOONa) (табл. 2).

Очевидно, что если электрон в одном из фрагментов молекулы вещества может быть более эффективно локализован, то участие этого электрона в активации включения дейтерия в этот фрагмент будет предпочтительнее [31]. В ФБкNa таким фрагментом является бензойная кислота. Поэтому образование ФЦГCOONa свидетельствует о гомолитическом характере такой реакции.

Удаление Вос-защиты при нагревании в D₂O смеси (Вос—Trp—Pro—Pro—Trp)—5% Pd/Al₂O₃—Al₂O₃, насыщенной дейтерием, — еще один факт, указывающий на процессы, которые происходят в системе катализатор—органическое соединение—изотоп водорода [14]. Ожидаемо, что если на поверхности носителя образуются катионы изотопов водорода, то при контакте с D₂O Вос-защита может быть удалена, но при комнатной температуре этого не происходит. Однако при 135°C отношение Trp—Pro—Pro—Trp к Вос—Trp—Pro—Pro—Trp составило практически 1 : 1, при 150°C — 5 : 1, при 175°C Вос—Trp—Pro—Pro—Trp обнаружено не было [14]. По-видимому, для разрушения Вос-защиты требуется перенос электрона с носителя на молекулу вещества, который будет нарастать при повышении температуры. Электрон атакует атом дейтерия в D₂O, адсорбированной на карбокатионе, с образованием атомарного дейтерия. В результате *трет*-бутоксикарбонильная группа разрушается с образованием углекислого газа. Один атом водорода связывается с аминогруппой, другой участвует в образовании *трет*-бутинала.

Таким образом, удаление Вос-защиты происходит по более сложному бимолекулярному механизму [32]. Протонирование кетогруппы приводило к образованию карбокатиона, который взаимодействовал с молекулой воды, что приводило к образованию неустойчивого промежуточного соединения, которое быстро распадается:



Таким образом в отличие от классической методики, когда удаление Вос-защиты происходило при комнатной температуре, удаление Вос-защиты за счет катионов водорода, образующихся на поверхности носителя, требует более высоких температур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arns S., Moreau A., Young R.N. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2010. Vol. 53. N 4. P. 205–207.
<https://doi.org/10.1002/jlcr.1753>
2. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шапошников А.И., Шевченко К.В., Белимов А.А., Баташева С.Н. и др. // Докл. АН. 2018. Т. 483. № 3. С. 274–278.
<https://doi.org/10.31857/S086956520003247-4>
3. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шапошников А.И., Шевченко К.В., Белимов А.А., Юзихин О.С. и др. // Докл. РАН. Химия, науки о материалах. 2020. Т. 491. № 1. С. 5–9.
<https://doi.org/10.31857/S2686953520020107>
4. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.
5. Stack D.E., Eastman R. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2016. Vol. 59. N 12. P. 500–505.
<https://doi.org/10.1002/jlcr.3440>
6. Pajak M., Palka K., Winnicka E., Kanska M. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2016. Vol. 59. N 1. P. 4–8.
<https://doi.org/10.1002/jlcr.3357>
7. Filer C.N. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2017. Vol. 60. N 2. P. 96–109.
<https://doi.org/10.1002/jlcr.3480>
8. Pajak M., Palka K., Winnicka E., Kanska M. // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2018. Vol. 317. P. 643–666.
<https://doi.org/10.1007/s10967-018-5932-z>
9. Kasumov T., Willard B., Li L., Sadygov R.G., Previs S. Proteome dynamics with heavy water—instrumentations, data analysis, and biological applications // Recent Advances in Proteomics Research / Ed. S. Magdeldin. Japan: IntechOpen, 2015. 166 p.
<https://doi.org/10.5772/61776>
10. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2023. Т. 65. № 4. С. 349–354.
<https://doi.org/10.31857/S0033831123040068>
11. Chiesa M., Paganini M.C., Spoto G., Giamello E., di Valentin C., del Vitto A., Paccioni G. // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109. N 15. P. 7314–7322.
<https://doi.org/10.1021/jp044783c>
12. McKenna K.P. // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135. N 50. P. 18859–18865.
<https://doi.org/10.1021/ja408342z>
13. Zhao J., Li B., Onda K., Feng M., Petek H. // Chem. Rev. 2006. Vol. 106. N 10. P. 4402–4427.
<https://doi.org/10.1021/cr050173c>
14. Shevchenko V.P., Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A. // Radiochemistry. 2024. Vol. 66. N 3. P. 377–382.
<https://doi.org/10.1134/S1066362224030123>
15. Шевченко В.П., Бадун Г.А., Разживина И.А., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2015. Т. 463. N 6. С. 678–683.
<https://doi.org/10.7868/S0869565215240135>
16. Шевченко В.П., Разживина И.А., Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2015. Т. 57. № 3. С. 264–271.
17. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2015. Т. 57. № 4. С. 366–372.
18. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Микулин В.А., Лопачев А.В., Хуторова А.В., Куликова О.И. и др. Патент RU 2777391. 03.08.2022 // Б.И. 2022. № 22.
19. Baltazar M.T., Dinis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Bastos M.L., Carvalho F. // Curr. Med. Chem. 2011. Vol. 18. N 21. P. 3252–3264.
<https://doi.org/10.2174/092986711796391552>
20. Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S., Sharma P. // RSC Adv. 2015. Vol. 5. P. 15233–15266.
<https://doi.org/10.1039/C4RA15710A>
21. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А. // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1. С. 128–131.
22. Шур В.Ю., Самотруева М.А., Мажитова М.В., Тризно Н.Н., Файзиев Р.М., Петренко Л.В., Шур Ю.В. // Фундаментальные исследования. 2014. № 7–3. С. 621–629.
23. Ubbelohde A.R. // J. Chem. Soc. 1950. P. 1143–1146.
24. Gibb T.R. // Adv. Chem. Ser. 1963. Vol. 39. N 1. P. 99–110.
25. Семененко К.Н., Бурнашева В.В., Яковлева Н.А., Ганич Е.А. // Изв. АН. Сер. хим. 1998. № 2. С. 214–217.
26. Carley A.F., Edwards H.A., Mile B., Roberts M.W., Rowlands C.C., Hancock F.E., Jackson S.D. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1994. Vol. 90. N 21. P. 3341–3346.
<https://doi.org/10.1039/FT9949003341>
27. Carley A.F., Edwards H.A., Mile B., Roberts M.W., Rowlands C.C., Jackson S.D., Hancock F.E. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. N 12. P. 1407–1408.
<https://doi.org/10.1039/C39940001407>

28. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2018. Т. 60. № 2. С. 97–127.
29. Шевченко В.П., Шевченко К.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2024. Т. 66. № 1. С. 81–87.
<https://doi.org/10.31857/S0033831124010138>
30. Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. // Radiochemistry. 2024. Vol. 66. N 3. P. 372–376.
<https://doi.org/10.1134/S1066362224030111>
31. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2010. Т. 52. № 1. С. 84–86.
32. Гершкович А.А., Кибиров В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992. 360 с.

Effect of Temperature during Preactivation of 5% Pd/C and 5% Pd/Al₂O₃ with Deuterium Gas on Isotope Exchange between Deuterium Water and an Organic Compound

V. P. Shevchenko*, I. Yu. Nagaev, K. V. Shevchenko, L. A. Andreeva, and N. F. Myasoedov

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

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

Received October 7, 2024; revised December 17, 2024; accepted December 20, 2024

It was demonstrated by the example of serotonin, 3-(*N*-pyrrolyl)propanoyl-L-histidine, sodium *p*-phenylbenzoate, and Pro–Gly–Pro that activation of isotope exchange with D₂O also occurred when a solution of an organic compound in D₂O was mixed with 5% Pd/Al₂O₃ or 5% Pd/C (after preliminary treatment of catalysts with deuterium gas on heating). When implementing this technique, 2–3 atoms of deuterium were incorporated in serotonin, 4–5 atoms, in Pro–Gly–Pro, 7–8 atoms, in 3-(*N*-pyrrolyl)propanoyl-L-histidine, and 3–4 atoms, in sodium *p*-phenylbenzoate. In the latter case, as judged from the composition of the reaction products, atomic deuterium takes part in the activation of isotope exchange with D₂O. The participation of atomic deuterium in these reactions follows from the intensification of the degradation of the compounds during deuteration. When using compounds that do not contain labile fragments, isotope exchange with D₂O can be activated by keeping the catalyst at room temperature and heating.

Keywords: deuterium, 3-(*N*-pyrrolyl)-propanoyl-L-histidine, sodium *p*-phenylbenzoate, Pro–Gly–Pro, serotonin, isotope exchange, catalysis