



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.466'11*3.06: 543.42.25

© 1990 г.

С. Г. Розенберг, В. М. Залозных, Ю. А. Золотарев**,
В. С. Козик**, Н. Ф. Мясоєдов***

АНАЛИЗ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ГЛИЦИНА И АЛАНИНА С ПОМОЩЬЮ ^3H -ЯМР

Институт фармакологии АМН СССР, Москва;

** Институт геохимии и аналитической химии АН СССР, Москва;*

*** Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва*

В настоящее время интерес к органическим соединениям, меченым изотопами водорода (дейтерием, тритием), значительно возрос в связи с их широким использованием в исследованиях. Наиболее важная реакция препаративного получения меченных тритием соединений — каталитический гидрогенолиз газообразным тритием [1].

Использование высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена [2] позволяет повысить степень включения изотопных атомов в молекулу и получать многократно меченные тритием (дейтерием) препараты. Введение в органические соединения вместо водорода дейтерия или трития может давать значительные изотопные эффекты. Учет первичных и вторичных изотопных эффектов особенно актуален при использовании многократно меченных тритием соединений. Поэтому для интерпретации результатов биологических исследований полезно знать не только распределение метки по молекуле меченого соединения, но и конкретный набор молекул, различающихся содержанием изотопных атомов в различных группировках молекулы.

Распределение изотопной метки в молекуле дейтерозамещенных аминокислот, полученных твердофазной каталитической гидрогенизацией, изучали методом ^1H -ЯМР, измеряя относительное уменьшение интегральной интенсивности сигналов соответствующих протонов [3].

Целью данного исследования была разработка метода анализа полиморфности меченных тритием аминокислот.

Эту задачу не удастся решить с помощью спектров ^1H -ЯМР из-за помех, связанных с интенсивными сигналами растворителя или смеси растворителей, при работе с малыми концентрациями меченных тритием веществ. ЯМР-спектроскопию на ядрах трития используют для анализа распределения изотопов по молекуле меченого соединения [4, 5]. Данные о распределении молекул аминокислот по степени замещения водорода на тритий обычно отсутствуют или носят оценочный характер и требуют уточнения [6]. Настоящее сообщение посвящено методу анализа распределения молекул аминокислот по степени замещения водорода на тритий с использованием спектроскопии ^3H - и ^1H -ЯМР.

Меченные тритием аминокислоты получали твердофазной каталитической гидрогенизацией [3]. $[2\text{-}^3\text{H}]$ Глицин с молярной активностью 440 ТБк/моль синтезирован гидрогенолизом 2-гидроксииминоуксусной кислоты при 100°C . $[3\text{-}^3\text{H}]$ Аланин с молярной активностью 330 ТБк/моль получен твердофазным изотопным обменом на палладиевом катализаторе [2] и очищен с помощью лигандообменной хроматографии на карбоксильном катионите Амберлит СС50(III) в присутствии ионов меди. Аминокисло-

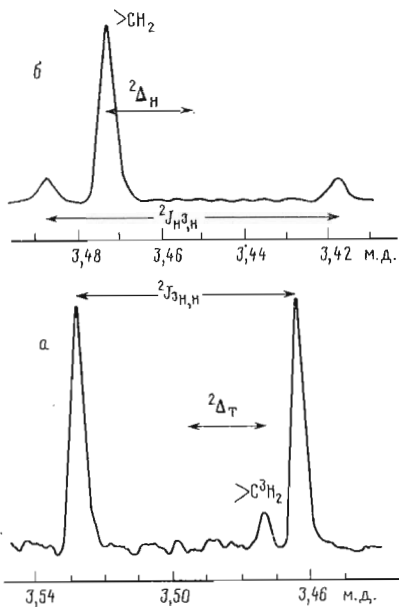


Рис. 1

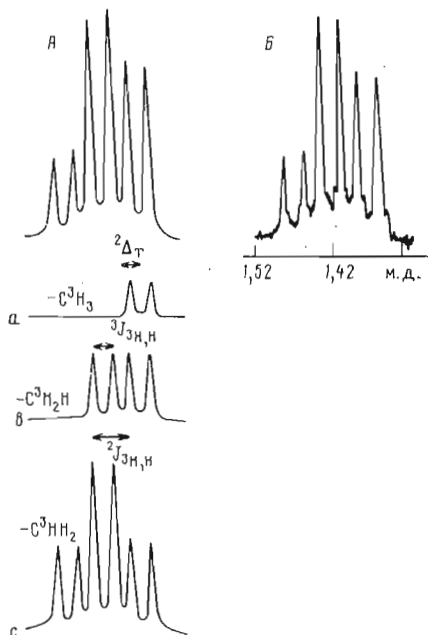


Рис. 2

Рис. 1. Спектры ЯМР высокого разрешения изотопной смеси меченого тритием глицина в D_2O : *a* — спектр 3H -ЯМР (266,8 МГц), *б* — спектр 1H -ЯМР (250 МГц). Символом $^2\Delta$ обозначен изотопный сдвиг первого порядка водорода ($^2\Delta_H$) и трития ($^2\Delta_T$)

Рис. 2. Теоретический (*A*) и экспериментальный (*B*) спектры 3H -ЯМР трехкомпонентной смеси меченого тритием аланина; приведены сигналы метильных групп. *A* (*a*—*c*) — спектры соответствующих компонентов с заданными величинами изотопного сдвига первого порядка для трития ($^2\Delta_T$), КССВ и мольными соотношениями (см. таблицу); *B* — спектр 3H -ЯМР (266,8 МГц) в D_2O

ты с активностью около 100 мКи растворяли в 0,5 мл D_2O . Спектры 3H - и 1H -ЯМР снимали на спектрометре ЯМР AC 250 Bruker с рабочими частотами 266,8 и 250,13 МГц соответственно. Теоретические спектры были получены на мини-компьютере Aspect 3000 с помощью стандартной программы Panic фирмы Bruker. Химические сдвиги протонов измерены относительно DSS (4,4-диметил-4-силапентасульфонат натрия) в качестве внутреннего эталона. Химические сдвиги сигналов трития в полностью замещенных меткой компонентах принимались равными соответствующим значениям для протонов.

На рис. 1 показаны протонный и тритиевый спектры изотопной смеси меченого глицина общей формулы $^2H_2NCH_n^3H_{2-n}COO^2H$, где $n = 0, 1, 2$. Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) и изотопные сдвиги первого порядка для ядер трития приведены в таблице. Сигналы метиленовой группы с большим содержанием тяжелого изотопа оказались сдвинуты в сильное поле. Рассчитанный из протонного спектра глицина изотопный сдвиг атома водорода $^2\Delta_H$ в метиленовой группе оказался равным в пределах ошибки измерения аналогичному сдвигу для трития $^2\Delta_T$. Мольные соотношения *a*, *b* и *c* молекулярных форм для $n = 0, 1$ и 2 соответственно (таблица) определены из интегральных интенсивностей сигналов. На рис. 2 приведена метильная область экспериментального и теоретического спектров 3H -ЯМР селективно меченого тритием аланина, т. е. трехкомпонентной смеси молекул типа $CH_n^3H_{3-n}CHN^2H_2COO^2H$, где $n = 0, 1, 2$ (соответственно *a*, *b*, *c*). Суперпозиция мультиплетов, полученных с помощью программы Panic подбором геминальной КССВ $^2J_{3H,H}$ и изотопного сдвига первого порядка ядер трития в метильной группе при фиксированном значении константы $^3J_{3H,H}$, равном 7,6 Гц, с учетом мольных долей каждой формы дает экспериментально наблюдаемый спектр. Этим способом мы определили долю каждого из изотопнозамещенных компонен-

Спектральные характеристики ^3H -меченых аминокислот

Соединение	$^2J_{\text{H,H}}^{\text{H}}$, Н. Гц	$^3J_{\text{H,H}}$, Н. Гц		Изотопный сдвиг 1-го порядка, м. д.	Мольные соотношения ** a : b : c, %
		теор. *	экспер.		
Глицин	-16,4±0,2	7,8	7,6±0,2	0,021±0,001	1 : 34 : 65
Аланин	-14,0±0,5			0,026±0,001	3 : 15 : 82

* Расчет проведен по стандартной формуле [5]: $^3J_{\text{H,H}}^{\text{теор}} = ^3J_{\text{H,H}}^{\text{эксп}} - 1,6666$, где $^3J_{\text{H,H}}^{\text{эксп}} = 7,3$ Гц.

** Относительная погрешность не более 10%.

тов, присутствующих в смеси (см. таблицу). Отметим, что экспериментальное значение $^3J_{\text{H,H}}$ для аланина в пределах ошибки измерения хорошо соответствует расчетному (о методе расчета см. [5]).

Важно подчеркнуть, что указанная методика определения изотопного состава, примененная нами впервые при анализе тритированных метильных групп, основана на получении спектров ^3H -ЯМР без подавления спин-спинового взаимодействия (ССВ) с протонами. В альтернативном варианте с подавлением ССВ подобный расчет оказался бы малоэффективным из-за сильного уширения и деформации спектральных линий (см. например, [6]).

По результатам ЯМР-спектроскопии в [$2\text{-}^3\text{H}$]глицине, средняя степень замещения водорода при углеродном атоме составляет 18%, что находится в хорошем соответствии с величиной, полученной с использованием хроматографии и жидкостного сцинтилляционного счета, — 21%.

Таким образом, в настоящей работе из спектров ^3H -ЯМР меченых три-тием глицина и аланина получена информация об их изотопном составе; разработана методика (для аланина), с помощью которой определены мольные соотношения изотопнозамещенных форм; измерены vicинальные и рассчитаны gemинальные КССВ, а также изотопные сдвиги первого порядка для ядер трития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нейман Л. А. // Успехи химии. 1981. Т. 50. Вып. 2. С. 196—223.
2. Золотарев Ю. А., Козик В. С., Зайцев Д. А., Дорохова Е. М., Мясоедов Н. Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. № 5. С. 1146—1150.
3. Золотарев Ю. А., Мясоедов Н. Ф., Зайцев Д. А., Козик В. С., Дорохова Е. М., Розенберг С. Г. // Тез. III Междунар. симпоз. по синтезу меченых изотопов органических соединений. Мариинские Лазни: Изд. чехослов. комитета по атомной энергии, 1988. С. 19.
4. Elvidge J. A., Jones J. R., Chambers V. M. A., Evans E. A. // Isotopes in Organic Chemistry. V. 4. N. Y.: Elsevier, 1978. P. 1—49.
5. Evans E. A., Warrell D. C., Elvidge J. A., Jones J. R. // Handbook of Tritium NMR. Spectroscopy and Applications. N. Y.: J. Wiley and Sons, 1985. P.
6. Tang Y. S., Marimoto H., Un S., Rapoport H. // Proc. of the Second Int. Symp. Synthesis and Application of Isotopically Labeled Compounds. Kansas City. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 497—500.

Поступило в редакцию

26.VI.1989

После доработки

8.I.1990

S. G. ROSENBERG, V. M. ZAILOZNYKH*, Yu. A. ZOLOTAREV**,
V. S. KOZIK**, N. F. MYASOEDOV**

^3H NMR ANALYSIS OF TRITIUM-LABELLED GLYCINE AND ALANINE

*Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

* *Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

** *Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A method for analysis of three-component isotopic mixtures of tritium-labelled glycine and alanine in D_2O solutions has been developed on the basis of high resolution ^3H NMR spectra at 266.8 MHz. Determined were composition of the mixtures in molar per cent, as well as geminal and vicinal coupling constants ($^2J_{\text{H,H}}^{\text{Gly}} = -16,4 \pm 0,2$ Hz; $^2J_{\text{H,H}}^{\text{Ala}} = -14,0 \pm 0,5$ Hz; $^3J_{\text{H,H}}^{\text{Ala}} = 7,6 \pm 0,2$ Hz) and isotopic shifts (0,021 \pm 0,001 ppm for glycine; 0,026 \pm 0,001 ppm for alanine).