



УДК 547.466.23'11*3 : 543.42.25

© 1990 г.

С. Г. Розенберг, В. М. Залозных*, Ю. А. Золотарев**,
Д. А. Зайцев**, Н. Ф. Мясоедов**

АНАЛИЗ ВЫСОКОМЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ АЛАНИНА С ПОМОЩЬЮ ^3H - И ^1H -ЯМР

Институт фармакологии АМН СССР, Москва;

* Институт геохимии и аналитической химии АН СССР, Москва;

** Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Изотопы водорода — тритий и дейтерий — нашли широкое применение для решения различных исследовательских задач, особенно в биологии. Такие исследования должны учитывать химические изотопные эффекты, которые для изотопных пар протий/дейтерий и протий/тритий могут быть аномально большими [1]. Это чрезвычайно существенно при высоких степенях замещения всех атомов водорода соединения на его изотопы (тритий, дейтерий), так как именно такие многократно меченные препараты находят все большее применение в исследовательских работах. Совершенство методов введения изотопной метки в органические соединения позволяет синтезировать многократно меченные тритием препараты. Однако разные методы, используемые для введения тритиевой (дейтериевой) метки, обычно приводят к получению препаратов, различающихся замещением водорода на тритий при разных углеродных атомах. При этом основным показателем, характеризующим меченное тритием соединение, — молярная радиоактивность — может быть и одинаковым.

В последние годы для решения этих вопросов используется современная техника ЯМР, позволяющая анализировать сложные изотопные смеси с помощью многоимпульсных экспериментов.

В данной работе с помощью ^3H - и ^1H -ЯМР исследовано распределение тритиевой метки в образцах $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина, полученного разными методами. Растворы образцов $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина в $^2\text{H}_2\text{O}$ представляют смесь, в которой присутствуют все 8 изотопиозамещенных форм молекул аланина, различающихся количеством атомов водорода, замещенных на тритий. Состав смеси может быть представлен в виде $\text{I} + \text{II}$, где $\text{I} - \text{CH}_n^3\text{H}_{3-n}\text{C}^3\text{H}\text{N}^2\text{H}_2\text{COO}^2\text{H}$ при $n = 0, 1, 2, 3$, — a, b, c, d соответственно; $\text{II} - \text{CH}_n^3\text{H}_{3-n}\text{CHN}^2\text{H}_2\text{COO}^2\text{H}$ при $n = 0, 1, 2, 3$ — e, f, g, h соответственно.

Меченные тритием образцы $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина были получены методом твердофазной каталитической гидрогенизации; образец 1 с молярной активностью 2370 ТБк/моль получен гидрогенолизом 2-гидроксиминопропионовой кислоты. Образцы 2 и 3 получены высокотемпературным твердофазным каталитическим изотопным обменом (ВТКИО) [3] при разных экспериментальных условиях с молярными активностями 3100 и 2070 ТБк/моль соответственно.

Спектры ^3H -ЯМР растворов образцов в $^2\text{H}_2\text{O}$ получены на спектрометре ЯМР AC 250 Bruker с 5-мм датчиком $^1\text{H}/^3\text{H}$. Спектр ^1H -ЯМР образца 2 снят на спектрометре WM 500 Bruker. Химические сдвиги сигналов трития в полностью замещенных меткой компонентах приняты равными соответствующим протонным сдвигам. Моделирование мультиплетных сиг-

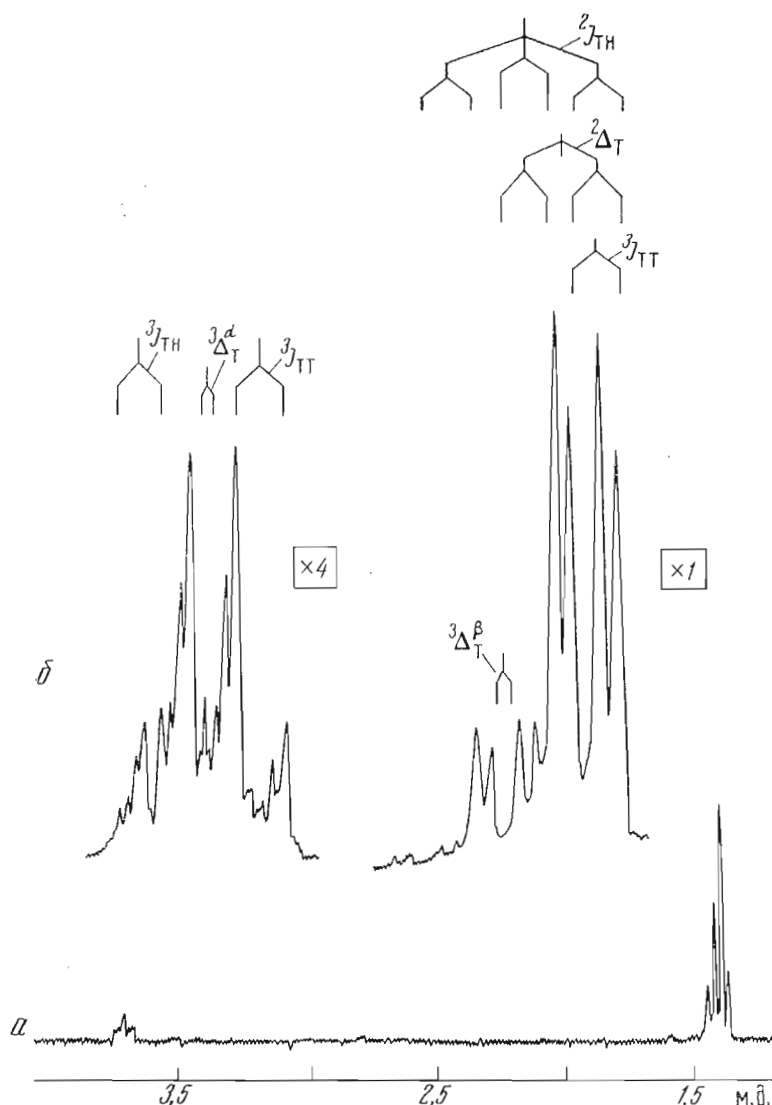


Рис. 1. Спектры ^3H -ЯМР (266,8 МГц) $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина, образец 1 с полным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами (а) и без подавления спин-спинового взаимодействия (б). В спектре присутствуют сигналы семикомпонентной смеси вида I ($\text{CH}_n^3\text{H}_{3-n}\text{C}^3\text{HN}^2\text{HCOO}^2\text{H}$; $n = 0, 1, 2, 3 - a, b, c, d$ соответственно) и II ($\text{CH}_n^3\text{H}_{3-n}\text{CHN}^2\text{HCOO}^2\text{H}$; $n = 0, 1, 2 - e, f, g$ соответственно). Над метильной областью выделена мультиплетность сигналов форм I. $^2\Delta_{\text{T}}$ — изотопный сдвиг 1-го порядка трития, $^3\Delta_{\text{T}}^{\alpha}$ и $^3\Delta_{\text{T}}^{\beta}$ — изотопные сдвиги 2-го порядка ядер трития в α - и β -положениях

назов производилось с помощью стандартной программы Panic фирмы Bruker. Результаты экспериментов представлены на рис. 1, 2 и в табл. 1—3.

На рис. 1 показан спектр ^3H -ЯМР образца 1, полученный в двух вариантах: с широкополосным подавлением спин-спинового взаимодействия (ССВ) ^3H -Н (а) и без подавления (б). В первом случае можно лишь определить относительные интегральные интенсивности атомов трития в α - и β -положениях. Другая информация теряется из-за слияния и перекрывания мультиплетов в спектре. Второй вариант, напротив, позволил рассчитать константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) и изотопные сдвиги. Аналогично ситуации, описанной ранее [4], в метильной области спектра б присутствуют линии, образовавшиеся в результате суперпозиции мультиплетных сигналов нескольких четырехспиновых систем. Наложение

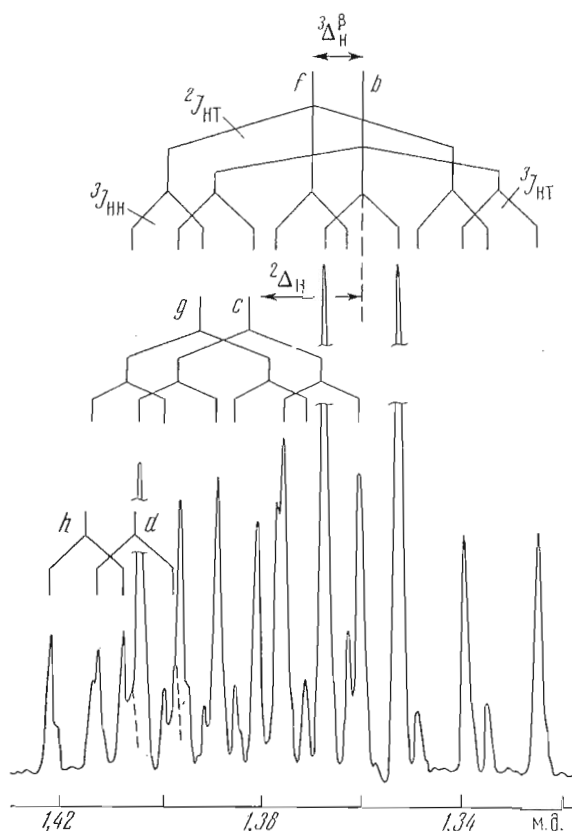


Рис. 2. Спектр ^1H -ЯМР 500 МГц метильной области $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина, образец 2. Представлены мультиплетные сигналы изотопных форм b, c, d для I ($\text{CH}_n\text{-}^3\text{H}_{3-n}\text{C}^3\text{HN}^2\text{HCOO}^2\text{H}$ при $n = 1, 2, 3$ соответственно) и f, g, h для II ($\text{CH}_n\text{-}^3\text{H}_{3-n}\text{CHN}^2\text{HCOO}^2\text{H}$ при $n = 1, 2, 3$ соответственно). $^2\Delta_{\text{H}}$ — изотопный сдвиг 1-го порядка водорода, $^3\Delta_{\text{H}}$ — изотопный сдвиг 2-го порядка метильного водорода

ние произошло с точностью до изотопных сдвигов первого порядка из-за совпадения последних (в Гц) с половиной геминальной КССВ — случайного эффекта, связанного с использованной нами частоты тритиевого резонанса 266,8 МГц. При других, значительно отличающихся от указанной, резонансных частотах подобной суперпозиции не происходит.

Число линий в метильной части спектра ^1H -ЯМР образца 2 (рис. 2) близко к теоретически ожидаемому. Сигналы метильных и метиновых протонов сдвинуты в сильное поле прямо пропорционально числу присутствующих атомов трития. Из расчета мультиплетности сигналов определены геминальные (2J) и вицинальные (3J) КССВ, а также изотопные сдвиги 1-го и 2-го порядков (т. е. смещения химического сдвига сигнала ядра, обусловленные влиянием его изотопа через 2 и 3 связи соответственно) для атомов водорода и трития (табл. 1 и 2). Анализ представленных данных показывает хорошее соответствие экспериментальных и расчетных значений (соответственно 7,8 и 8,3 Гц) КССВ $^3J_{\text{TH}}$ и $^3J_{\text{TT}}$ (нижние индексы означают взаимодействие между ядрами изотопов, в частности ^3H и H , ^3H и ^3H соответственно). Модули изотопных сдвигов 1-го порядка метильных групп у водорода и трития значительно отличаются друг от друга ($\sim$ на 15%), в то время как модули сдвигов 2-го порядка соответственно совпадают. Из анализа спектров ^3H - и ^1H -ЯМР трех образцов получены величины мольных процентов всех изотопных форм $[2,3\text{-}^3\text{H}]$ аланина в смеси (табл. 3). Как видно из табл. 3, указанные образцы меченого аланина различаются набором изотопно-замещенных форм. При этом распределение зависит как от общего включения изотопа (образцы 2 и 3),

Таблица 1

КССВ [2,3-³H]аланина (Гц)

² J _{ТН}	J _{ТТ}	³ J _{ТН}	³ J _{НН}
-14,2±0,3	8,1±0,2	7,6±0,2	7,3±0,2

Таблица 2

Изотопные сдвиги *
[2,3-³H]аланина ** (м.д.)

Изотоп	Положе- ние в мо- лекуле	1-й порядок	2-й порядок
³ H	3	0,026	0,01
	2	—	0,007
¹ H	3	-0,022	-0,01
	2	—	-0,007

* Точность измерения ±0,001 м.д.

** Минус означает смещение сигнала.
в сильное поле.

Таблица 3

Мольное процентное содержание изотопных форм (a — h) [2,3-³H]аланина *

Номер образца	Молекуляр- ная актив- ность, ТБК/ /моль	a	b	c	d	e	f	g	h
1	2370	14	18	9	5	18	23	13	—
2	3100	33	33	10	2	9	9	3	1
3	2070	3	15	22	5	5	17	23	7

* Ошибка измерения — не выше 15%.

так и способа получения меченой аминокислоты (образцы 1 и 3). В образцах 2 и 3, полученных с использованием ВТКИО, происходит изотопное уравнивание [3], что приводит к статистическому равновероятному распределению изотопной метки.

Таким образом, на основании спектров ³H-ЯМР (266,8 МГц) образцов 1—3 и спектра ¹H-ЯМР (500 МГц) образца 2 получены данные об изотопном составе высокомеченого [2,3-³H]аланина, определены терминальные и вицинальные КССВ между ядрами изотопов, рассчитаны изотопные сдвиги 1-го и 2-го порядков метильных, метиновых атомов водорода и трития, вычислены мольные проценты изотопных форм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brazier I. L., Ridon B., Falconnet I. B., Charrah V., Benchekrour Y. // Therapie. 1987. V. 42. № 5. P. 445—450.
2. Williams P. G., Morimoto H., Wemmer D. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 8083—8044.
3. Золотарев Ю. А., Козик В. С., Зайцев Д. А., Дсрохова Е. М., Мясоедов Н. Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. № 5. С. 1146—1150.
4. Розенберг С. Г., Залозных В. М., Золотарев Ю. А., Козик В. С., Мясоедов Н. Ф. // Биорган. химия. 1990. Т. 16. № 5.

Поступило в редакцию
6.VII.1989После доработки
8.I.1990S. G. ROSENBERG, V. M. ZALOZNIKH*, Yu. A. ZOLOTAREV**, D. A. ZAJTSEV**,
N. F. MYASOEDOV**³H NMR ANALYSIS OF HIGHLY TRITIUM-LABELLED ALANINEInstitute 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 has been developed for the analysis of deuterium oxide solutions of tritiated alanine eight-component isotopic mixtures by using high resolution ³H and ¹H NMR spectra at frequencies 266,8 and 500,13 MHz, respectively. Approaches have been worked out for the determination of qualitative composition of the mixtures and spectral parameters.