



УДК 547.752'292'11 *3.057

© 1993 О. В. Лушкина, Г. В. Сидоров,
Н. Ф. Мясоедов

СИНТЕЗ МЕЧЕННОЙ ТРИТИЕМ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Осуществлен синтез меченной тритием индолил-3-уксусной кислоты тремя различными методами: изотопным обменом с тритиевой водой, изотопным обменом с газообразным тритием и реакцией твердофазной каталитической гидрогенизации. Исследованы влияния различных катализаторов, соотношения компонентов твердой фазы и температуры на выход и величину молярной активности целевого продукта.

Для исследования механизма действия фитогормонов (или регуляторов роста растений) на молекулярном уровне, изучения распределения их по различным частям растений, определения соответствующих участков связывания [1, 2] необходимы фитогормоны, меченные радиоактивным изотопом.

Данная работа посвящена изучению каталитических реакций изотопного обмена с газообразным тритием и тритиевой водой для синтеза меченных тритием ауксинов. Объектом исследования была выбрана индолил-3-уксусная кислота (IAA) как наиболее распространенный представитель природных ауксинов. Изучали влияние условий проведения реакций твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ), изотопного обмена с тритиевой водой и газообразным тритием на выход и молярную активность ($A_{\text{мол}}$) целевого соединения. Все реакции проводили в присутствии катализаторов — палладий на различных носителях.

При изучении реакции ТКГ исследовали влияние различных катализаторов, соотношения компонентов твердой фазы и температуры на выход и молярную радиоактивность целевого соединения.

Как видно из табл. 1, степень включения трития в реакции ТКГ в значительной мере определяется природой носителя палладиевого катализатора. Наибольшая деградация IAA, по данным ВЭЖХ-анализа, происходит на катализаторе, приготовленном на оксиде алюминия. Применение катализатора Pd/CaCO₃ в данном случае предпочтительнее, так как при сравнимых выходах его использование приводит к продукту с более высокой величиной $A_{\text{мол}}$.

Зависимость молярной радиоактивности и выхода $[^3\text{H}]IAA$ от температуры реакции приведена на рисунке. При повышении температуры возрастает степень включения трития в IAA, но при этом выход продукта снижается.

Исследовано влияние состава твердой фазы на радиоактивность и выход продукта изучаемой реакции (табл. 2). Найдено, что увеличение соотношения катализатор/исходное вещество приводит к возрастанию степени включения трития при одновременном снижении выхода целевого продукта. Эффективным способом увеличения выхода и включения метки в IAA оказалось применение

Сокращения: IAA — индолил-3-уксусная кислота; ТКГ — твердофазная каталитическая гидрогенизация.

Таблица 1

Влияние различных катализаторов на реакцию ТКГ индолил-3-уксусной кислоты (150° С, соотношение катализатор/IAA 3 : 1)

Катализатор	Целевое соединение	
	$A_{\text{мол}}, \%$ *	Выход, %
Pd/Al ₂ O ₃	—	Следы
Pd/BaSO ₄	17,8	0,3
Pd/CaCO ₃	40,0	0,3

* Приведена величина молярной активности в процентах от теоретической.

Таблица 2

Влияние состава твердой фазы и температуры на реакцию ТКГ индолил-3-уксусной кислоты

Катализатор	Соотношение катализатор/IAA мг/мкмоль	Носитель, мг/мг IAA	$t, ^\circ\text{C}$	$[^3\text{H}]$ IAA	
				$A_{\text{мол}}, \%$	Выход, %
Pd/CaCO ₃	5 : 1	—	150	12,8	1,9
»	10 : 1	—	150	30,0	0,7
»	20 : 1	—	150	40,0	0,4
»	50 : 1	—	150	50,0	0,2
Pd/BaSO ₄	5 : 1	CaCO ₃ , 10 : 1	200	63,3	3,2
»	5 : 1	CaCO ₃ , 50 : 1	200	—	Следы
»	5 : 1	Al ₂ O ₃ , 10 : 1	200	63,0	10,2
»	5 : 1	Al ₂ O ₃ , 50 : 1	200	33,0	6,0
Pd/CaCO ₃	5 : 1	Al ₂ O ₃ , 10 : 1	200	75,0	12,5
Pd/Al ₂ O ₃	5 : 1	Al ₂ O ₃ , 10 : 1	200	41,7	5,3
Pd/Al ₂ O ₃	5 : 1	Al ₂ O ₃ , 50 : 1	200	42,0	1,9

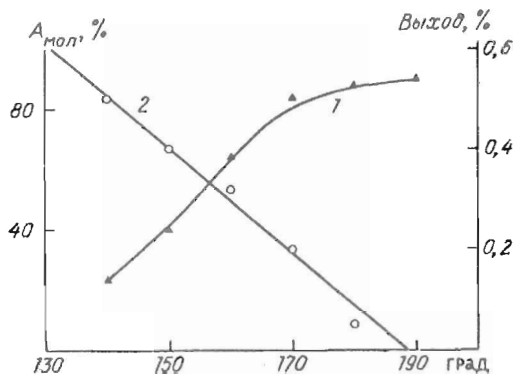
в реакции инертных носителей, в данном случае отличающихся от уже использованных для приготовления катализатора. Например, сочетание Pd/CaCO₃ с окисью алюминия в соотношении IAA/Al₂O₃ (мг/мг) 1 : 10 позволяет повысить выход продукта ТКГ до 12,5%, причем $A_{\text{мол}}$ достигает 75% от теоретического значения.

Таким образом, варьирование температуры и состава твердой фазы позволяет в широком диапазоне изменять выход и молярную радиоактивность [³H]IAA.

Каталитический изотопный обмен с тритиевой водой проводили в безводном органическом растворителе. Предварительные эксперименты показали, что оптимальная концентрация тритиевой воды в растворителе составляет 5 об.%. Дальнейшее увеличение содержания тритиевой воды приводит к незначительному росту включения трития в целевое соединение. Результаты изучения реакции изотопного обмена IAA подтверждают (табл. 3, 4), что применение апротонного растворителя (диоксана) способствует включению трития в IAA. Добавление в реакционную смесь основания (триэтиламина), облегчающего отрыв протона, увеличивает выход и молярную активность целевого соединения.

Реакцию каталитического изотопного гетерогенного обмена с газообразным тритием проводили в обычных условиях (катализатор на основе палладия, щелочная среда) [3]. Дальнейшее изучение данной реакции не проводилось из-за низкой удельной радиоактивности полученного препарата.

Проведенные исследования позволили осуществить синтез меченной тритием



Влияние температуры реакции на $A_{\text{мол}}$ (1) и выход $[^3\text{H}]$ ИАА (2) в реакции ТКГ. Катализатор — 5% Pd/CaCO₃, соотношение катализатор/ИАА 3 : 1

ИАА с высокопроцентным тритием тремя различными способами, в том числе ТКГ, приводящей к продукту с высокой молярной активностью (табл. 5).

Данными спектра ^3H -ЯМР установлено, что в случае твердофазного синтеза метка распределена равномерно по всем стабильным С—Н-связям ИАА. При введении метки методом изотопного обмена с газообразным тритием тритий включается в метиленовую группу остатка уксусной кислоты, причем образуется мономеченый препарат.

Экспериментальная часть

В работе использовали ИАА (Serva), палладиевые катализаторы: 5% Pd/CaCO₃; 5% Pd/BaSO₄; 5% Pd/Al₂O₃; 5% PdO/Al₂O₃ (Fluka), пластинки Silufol (ЧСФР), колонки Zorbax ODS C18, 5 мкм; 4,6×250 мм (США).

Растворители очищали по стандартным методикам. Этанол и диоксан абсолютировали и хранили над молекулярными ситами 4 Å.

Полученные соединения анализировали ТСХ на пластинках Silufol в системе растворителей: хлороформ — метанол (3 : 1), R_f 0,45 (ИАА) и ВЭЖХ (Zorbax), подвижная фаза — 10% ацетонитрила в 0,1 М ТЕАВ, рН 7,0, 1 мл/мин (время удерживания ИАА 12,45 мин). Preparативную очистку осуществляли в этих же условиях.

Радиоактивность определяли с использованием сцинтилляционного счетчика. Спектр ^3H -ЯМР регистрировали на спектрометре AC 250 Bruker в CD₃OD.

Реакция ТКГ. Твердую смесь ИАА (1—3 мкмоль), катализатора и, когда необходимо, носителя помещали в ампулу из стекла объемом 7—10 см³, вакуумировали и заполняли газообразным тритием (300 мм рт. ст.). При исследовании факторов, определяющих выход продукта и молярную радиоактивность, применяли тритий-противовую (1 : 1000) смесь. Для получения меченной тритием ИАА использовали 95% тритий. Реакционную смесь термостатировали 40 мин при выбранной температуре. По окончании реакции удаляли из ампулы газ и ампулу вакуумировали.

Реакция изотопного обмена с тритиевой водой. В реакционную ампулу из стекла помещали высушенные в вакуумном эксикаторе навески ИАА (1—3 мкмоль) и катализатора. Далее следовало:

а. **Изучение реакции с низкоактивной тритиевой водой.** В ампулу добавляли 100 мкл растворителя (диоксан или этанол) и тритиевую воду (2,0 Ки/мл, 5 об.%), закрывали и перемешивали 3 ч на магнитной мешалке.

б. **Реакция с высокоактивной тритиевой водой.** Тритиевую воду получали окислением газообразного трития (95%) на оксиде палладия в среде органического растворителя (этанол, диоксан). Полученный раствор тритиевой воды перемора-

Таблица 3

Изотопный обмен IAA с тритиевой водой (35 Ки/ммоль; 5 об.%) в диоксане (3 ч, 5 об.% триэтиламина)

Катализатор	Соотношение катализатор/IAA, мг/мкмоль	$A_{\text{мол}}$, %	Выход, %
Pd/Al ₂ O ₃	3 : 1	0,55	32
Pd/BaSO ₄	3 : 1	0,60	34
PdO	15 : 1	0,60	35

Таблица 4

Изотопный обмен IAA с тритиевой водой (35 Ки/ммоль, 5 об.%) в этаноле (3 ч, 5% PdO/Al₂O₃)

Соотношение катализатор/IAA, мг/мкмоль	$A_{\text{мол}}$, %	Выход, %
4 : 1	0,14	11,2
8 : 1	0,19	14,0
16 : 21	0,60	16,8

Таблица 5

Синтез меченной тритием индолил-3-уксусной кислоты

Метод введения метки	$A_{\text{мол}}$, Ки/ммоль	Выход, %
ТКГ газообразным тритием (200° С, 40 мин, Pd/CaCO ₃)	150	12,5
Изотопный обмен с тритиевой водой в диоксане (PdO, 3 ч)	1,2	35,0
Изотопный обмен с газообразным тритием в растворе (1 н. NH ₄ OH, Pd/CaCO ₃ , 3 ч)	3,5	30,0

живали в вакууме в реакционную ампулу, содержащую IAA (1—3 мкмоль) и катализатор, ампулу закрывали и перемешивали 3 ч на магнитной мешалке.

Реакция изотопного обмена с газообразным тритием. В реакционную ампулу из стекла объемом 7 см³ помещали навеску IAA (1—3 мкмоль), катализатора (Pd/CaCO₃) и добавляли 0,5 мл 1 н. NH₄OH. Раствор в ампуле замораживали в жидком азоте, ампулу вакуумировали и заполняли газообразным тритием (300 мм рт. ст.). После размораживания реакционную смесь перемешивали 3 ч на магнитной мешалке, раствор вновь замораживали и удаляли из ампулы газообразный тритий, ампулу вакуумировали, остаток смывали метанолом, отделяли катализатор фильтрованием или центрифугированием. Метанольный раствор упаривали, а остаток еще дважды упаривали с метанолом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авлянов Х. Г., Сидоров Г. В., Вешкурова О. Н., Таканаев А. А., Салихов Ш. И. // Химия природных соединений. 1988. Т. 5. № 5. С. 684—689.
2. Romanov G. A., Taran V. Ya., Kulajeva O. N., Choyka L., Venis M. A. // Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development, Proceed. of Symp. of the 14th Biochem. Congr. (Prague, Czechoslovakia, 10—15 July 1988), 1990. P. 213.

Поступила в редакцию
22.VI.1992

O. V. LUSHKINA, G. V. SIDOROV, N. F. MYASOEDOV

SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED INDOLYL-3-ACETIC ACID

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

[³H]Indolyl-3-acetic acid has been synthesized by three different methods: isotopic exchange with tritium water or with gaseous tritium, and solid state catalytic hydrogenation reaction. Effects of various palladium catalysts, ratio of solid phase components and temperature on the yield and specific activity of the product have been investigated.