



УДК 541.124:546.11.2

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН СО СПИЛЛОВЕР-ВОДОРОДОМ В АМИНОКИСЛОТАХ, ПЕПТИДАХ И БЕЛКАХ© 2005 г. Ю. А. Золотарев^{*,#}, А. К. Дадаян^{*}, Ю. А. Борисов^{**}^{*}Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2;^{**}Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Поступила в редакцию 11.03.2004 г. Принята к печати 20.04.2004 г.

В обзоре обобщены последние данные по теоретическому и экспериментальному исследованию реакции высокотемпературного (150–200°C) твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО), происходящей в аминокислотах, пептидах и белках под действием спилловер-водорода (СВ). Обсуждаются основные особенности реакции ВТКИО, данные по исследованию механизма и использованию этой реакции для исследования пространственного взаимодействия в полипептидах. Практически полное отсутствие рацемизации делает эту реакцию ценным препаративным методом. Выяснены основные закономерности реакции ВТКИО пептидов и белков с участием спилловер-трития. Показана зависимость реакционной способности фрагментов полипептидов от пространственной организации молекул. Важной особенностью этой реакции является то, что ее механизм обеспечивает высокую степень сохранения конфигурации асимметрических атомов углерода в аминокислотах и пептидах. Реакция ВТКИО может быть представлена как одноцентровое синхронное замещение при насыщенном углеродном атоме, характеризующееся образованием в переходном состоянии пятикоординированного углерода и трехцентровой связи с участием приходящего и уходящего водородных атомов.

Ключевые слова: аминокислоты; пептиды; белки; изотопный обмен водорода; спилловер-водород; квантово-химические расчеты; твердофазные реакции.

Содержание

Вступление

О природе спилловера водорода

Реакция ВТКИО с использованием газообразного дейтерия и трития

Исследование механизма твердофазных реакций с использованием квантово-химического моделирования

ВСТУПЛЕНИЕ

Твердофазные реакции органических соединений (или реакции без растворителя) активно исследуются и получают практическое применение. Разрабатываются новые реакции и новое, твердофазное исполнение получают старые, давно известные реакции. Несомненным преимуществом твердофазных реакций является простота исполнения, пониженное загрязнение продукта и окружающей среды. Твердофазное гидрирование алкенов и алкинов на нанесенных Pd-катализаторах

в отсутствие растворителя при 20°C происходит более гладко, чем в тетрагидрофуране [1]. Проведение в твердой фазе реакций восстановления кетонов под действием NaBH_4 [2, 3] и гидрирования дигидроксибензолов [4] обеспечивало больший выход и большую селективность в образовании продуктов реакции по сравнению с результатами этих же реакций в органических растворителях.

В гетерогенном катализе спилловером называют транспорт активных частиц, сорбированных или образованных на одной фазе, на другую фазу, которая в данных условиях не сорбирует или не образует эти частицы [5]. Так, водородные атомы, связанные с поверхностными атомами платиновых металлов, могут мигрировать на неорганический носитель, например на окись алюминия, сульфат бария и подобные. Такие активированные атомы получили название спилловер-водорода (СВ) [6]. В ранней работе Ламартина [7] был сделан вывод о том, что твердофазное гидрирование тимола в ментолы и ментоны происходит с участием СВ. До сих пор механизмы твердофазных реакций исследованы значительно меньше, чем для реакций в традиционном жидкофазном исполнении. В данном обзоре обобщены данные по исследованию механизма твердофазной реакции СВ с органическими соединениями.

Сокращения: СВ – спилловер-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; StxGI – α -конотоксин; Zrv II – зервамицин II; КЦБ – кислотные центры Бренстедовского типа.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 196-02-13; факс: (095) 196-02-21; эл. почта: zolya@img.ras.ru).

О ПРИРОДЕ СПИЛЛОВЕРА ВОДОРОДА

Первые непосредственные доказательства спилловера водорода были получены при восстановлении трехокси вольфрама до вольфрамовой бронзы при комнатной температуре [8]. Эта реакция происходит в механической смеси 0.5% Pt/Al₂O₃ с WO₃. Было предположено, что водород диссоциирует на платине и мигрирует через Al₂O₃ на WO₃ в виде атомов или протонов. Несмотря на то что процессы, протекающие с участием СВ, известны уже много лет (см. напр., [9–11]), природа этого явления до настоящего времени однозначно не установлена. Согласно различным гипотезам, водород мигрирует либо в форме сольватированного протона [8, 12], либо в виде протон-электронной пары [13, 14], либо в виде атомарного водорода [15, 16]. Феномен процесса спилловера водорода заключается в том, что концентрация СВ слишком мала, чтобы провести прямое инструментальное обнаружение его присутствия современными спектроскопическими методами, в то время как его значение для гетерогенного катализа настолько значительно, что его трудно переоценить. Количество публикаций, посвященных спилловеру водорода, превысило 10000. Однако характер диффузии активированных водородных частиц и их природа, все еще продолжают вызывать интерес [17, 18].

Известно, что на первоначально неактивных окисных поверхностях под действием СВ происходит формирование каталитически активных центров [19]. Так, силикагель преобразуется в кислотный катализатор, способный осуществлять, например, гидрогенолиз и пиролиз бензола в ацетилен, не наблюдаемые в отсутствие СВ [20]. Ключевым моментом в понимании механизма реакций, происходящих под действием СВ, является описание этих новых каталитических центров. Каталитическая активность водородсодержащих окисных катализаторов связана с наличием на их поверхности кислотных центров Бренстедовского типа (КЦБ) [21]. Под действием СВ возникают новые КЦБ, на которых происходят с высокой селективностью реакции гидроизомеризации и гидрокрекинга [22–24]. Селективность реакции изомеризации углеводородов может увеличиться до 95–99% при добавлении в газовую фазу нескольких процентов водорода [25, 26].

В многочисленных публикациях механизм реакции изомеризации на кислотных центрах исследуется кинетическими методами и делаются предположения о возникновении при этом разных форм активированного водорода. Показано, что реакция изомеризации *n*-бутана на КЦБ происходит по мономолекулярному механизму и не связана с промежуточным образованием бутена [27]. Данные, полученные при изучении реакции гидроизомеризации *n*-пентана и гидропиролиза ку-

мола на сульфированной окиси циркония и на цеолите Н-бета, позволили заключить, что под действием СВ возникают новые КЦБ с большей кислотностью, чем у исходно существовавших на этих катализаторах [28]. При гидрокрекинге дифенилметана на алюмосиликатном катализаторе [29] и сульфированной окиси циркония [30, 31] под действием СВ также происходит образование дополнительных КЦБ.

Представление об одновременном образовании ионов Н⁺ и Н⁻ при спилловере водорода лежит в основе интерпретации экспериментальных данных по бифункциональному катализу конверсии углеводородов [32, 33]. В пользу представлений о том, что при спилловере водорода возникают положительно заряженные частицы свидетельствует то, что на металле платиновой группы возникает отрицательный заряд и на неорганический носитель переносится протон [34, 35], а также то, что реакции, происходящие под действием СВ, ускоряются в присутствии H₂O [24, 36]. В основе кинетической модели бифункционального катализа лежит представление о том, что на окисной подложке существует равновесие между заряженной (Н⁺) и атомарной формой (Н) СВ [37]. Частицы СВ могут быть представлены как электронный донор, локализованный на поверхности [38]. Образование дополнительных ионов Н⁺ под действием СВ детектируется с помощью высокочастотного спектра сопротивления [39]. Ускоряющее влияние воды на спилловер водорода также объясняется тем, что диффузия СВ происходит в виде сольватированного протона. В пользу того, что СВ представляет собой частицу, несущую заряд, свидетельствует замедление диффузии СВ по поверхности двухкомпонентных образцов цеолитов Pt/NaY–HNaY под действием гомогенного магнитного поля, направленного перпендикулярно направлению спилловера водорода [40].

Перемещение протона по поверхности, содержащей связанную воду и гидроксильные группы, может происходить по эстафетному механизму с энергией активации около 5 ккал/моль [41]. В транспорте СВ могут принимать участие адсорбированные на поверхности молекулы воды; получающиеся при этом кислотные центры могут вступать в реакцию изотопного обмена. Спектроскопическими методами было показано, что сильно кислые КЦБ в обводненных цеолитах являются ионами H₃O⁺, связанными водородными связями с алюмосиликатным каркасом [42].

Дейтерирование поверхностных гидроксильных групп в Al₂O₃, SiO₂ и цеолитах широко используется в качестве модельной реакции для исследования спилловера дейтерия, потому что этот процесс легко контролируется ИК-спектроскопически. Для H–D-обмена на цеолитах была показана корреляция между кислотностью OH- и OD-

групп и реакционной способностью, что может быть свидетельством ионной природы СВ [43].

Обычно реакции обмена водорода на дейтерий в органических соединениях проводят при очень высокой температуре (400–500°C), однако на КЦБ эти реакции могут идти с достаточной скоростью и при значительно меньшей температуре. Оказалось, что если катализатор Pd/Al₂O₃ последовательно подвергнуть окислению и восстановлению при невысокой температуре, то его каталитическая активность резко возрастает. На таком катализаторе со значительной скоростью может происходить реакция изотопного обмена водорода на дейтерий в циклогексане при 25–55°C [44]. С помощью кинетических исследований было показано, что такое значительное повышение каталитических свойств связано с образованием на поверхности катализатора добавочных молекул воды, превращающихся под действием СВ в новые КЦБ. На катализаторах, полученных традиционным способом, таких активных кислотных центров не образуется, и они значительно менее активны в реакции изотопного обмена водорода при температуре ниже 200°C.

Только сравнительно недавно было проведено первое теоретическое квантово-химическое исследование преобразования под действием СВ одних каталитических центров в другие, которое и лежит в основе явления “удаленного контроля” [45]. Однако теоретического описания реакции гидроизомеризации и гидрокрекинга, происходящие на КЦБ, до сих пор не получили.

РЕАКЦИЯ ВТКИО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗООБРАЗНОГО ДЕЙТЕРИЯ И ТРИТИЯ

В твердой смеси, образованной органическим веществом, нанесенным на неорганический носитель, высокодисперсным металлом платиновой группы и газообразным тритием или дейтерием, при повышенной температуре происходит реакция ВТКИО. Для ряда аминокислот с использованием этой реакции удалось практически полностью заменить водород на дейтерий или тритий [46, 47]. Для получения таких предельно меченых тритием аминокислот реакция ВТКИО остается до настоящего времени единственной экспериментальной возможностью. Высокая степень замещения протия на тритий при ВТКИО достигается при осуществлении предварительного нанесения аминокислот, биогенных аминов, пептидов, углеводов, нуклеозидов, гетероциклических кислот на инертные неорганические носители [48, 49]. Такое пространственное разнесение органического соединения и металла катализатора позволило повысить температуру реакции изотопного обмена на 40–50°C и уменьшить влияние нежелательных реакций гидрогенолиза.

Таблица 1. Характеристики реакции ВТКИО аминокислот с газообразным дейтерием (200°C, 1 ч, 30 кПа ²H₂, 5% Pd/CaCO₃) [47]

Аминокислота	Na _{ат} *	Степень замещения, %	Оптическая чистота, %	Выход, %
Ala	2.71	68	90	80
βAla	3.05	76	****	85
Abu	4.77	79	90	80
Gly	1.67	84	****	75
Ser	1.71	57	85	70
Thr	3.14	63	85	70
Val**	7.70	96	98	69
Val	4.40	55	98	75
Pro	5.47	78	99	90
Ile	5.06	51	90	80
His***	4.00	80	70	50

* N_{ат} – общее включение ²H₂ в соединение.

** Смена газовой фазы каждые 20 мин.

*** Реакция при 220°C, 40 мин.

**** Отсутствуют асимметрические атомы.

Важной особенностью реакции ВТКИО является то, что изотопный обмен в аминокислотах и пептидах при 150–200°C происходит с высокой степенью сохранения конфигурации асимметрических атомов углерода [50, 51]. Практически полное отсутствие рацемизации при ВТКИО делает эту реакцию ценным препаративным методом. Для анализа и препаративного выделения изотопно замещенных энантиомеров аминокислот использовали лигандообменную хроматографию [52–54]. При температуре 180–200°C и выше изотопный обмен происходит равномерно по всем Н–С-связям с образованием равномерно меченных соединений. Данные о способности спилловер-дейтерия замещать водород в аминокислотах приведены в [46, 55] и показаны в табл. 1.

Для приведенного в табл. 1 гистидина было показано, что степень замещения водорода на дейтерий при 220°C оказывается близкой для различных положений молекулы. Водородные атомы Н–С2 и Н–С5 в имидазольной группировке [²H]His замещены на 90%, а Н–С α и Н–С β алифатической цепи на 80 и 70%. При ВТКИО было впервые экспериментально обнаружено явление изотопного уравнивания газообразного водорода и водородных атомов твердого органического соединения. При изотопном уравнивании степень замещения водородных атомов в органическом соединении определяется только общим соотношением протия и изотопа, взятых в реакцию. Последовательная замена реакционной газовой смеси на исходный дейтерий или тритий оказывается особенно эффективной для увеличения сте-

Таблица 2. Кинетика реакции ВТКИО *L*-валина с дейтерием при 200°C по результатам хроматомасс-спектрометрии [47]

Показатель	Время, мин						Модель со степенью замещения Н-С на 68%
	10	20	40	55	80	160	
Степень замещения (общая), %	13	27	49	53	57	68	68
Доля молекул (%) с числом атомов ² H:	12	23	41	45	50	65	68
0	60	39	18	17	10	2.1	0
1	15	15	8.6	7.0	4.9	1.7	0.3
2	7.4	8.2	7.3	6.1	5.8	1.8	2
3	10	7.5	9.1	8.1	9.0	2.4	6
4	2.4	7.3	6.6	7.1	8.9	12	16
5	2.8	9.4	11	12	17	25	25
6	2.1	7.8	15	18	21	30	31
7	0.9	4.8	16	17	18	19	17
8	0.3	1.3	7.8	8.3	5.6	5.5	4
Общее количество ² H	1.04	2.21	3.59	4.24	4.58	5.44	5.44

пени замещения атомов водорода в органическом соединении на изотопы. На примере валина показано, что степень замещения водорода на дейтерий можно увеличить с 55 до 96% без изменения общей длительности реакции, за счет двукратной смены дейтерия. ВТКИО в условиях изотопного уравнивания обеспечивает получение равномерно меченных аминокислот с сохранением высокой оптической чистоты, составляющей 80–97% [47, 56]. Данные по распределению изотопомеров [²H_{*n*}]Val, полученных изотопным уравнива-

нием водорода в *L*-валине на дейтерий, показаны в табл. 2.

Изотопное уравнивание при температуре 200°C приводит к равномерному замещению по всем С–Н-связям аминокислот [47, 57]. Рассчитанное распределение изотопомеров в аминокислотах находится в согласии с экспериментальными данными для ВТКИО в условиях изотопного уравнивания. Кинетика установления изотопного уравнивания при температуре 200 и 245°C хорошо описывается математической моделью, основанной на предположении равновероятностного замещения водорода Н-С твердой фазы на изотопы водорода газовой фазы (рис. 1).

Особенностью реакции ВТКИО является то, что она в интервале температур 100–150°C происходит региоселективно с образованием селективно меченных соединений [58, 59]. Анализ распределения изотопомеров – эффективный инструмент в исследовании твердофазных реакций. В работе [60] распределение изотопомеров по метильной группировке *O*-метилсерина определяли экспериментально с помощью тритиевого ЯМР. Влияние температуры на результаты ВТКИО в *O*-метилсерине показаны в табл. 3.

Определение соотношения изотопомеров позволило оценить долю вещества в зоне реакции при конкретной температуре. Распределение изотопомеров в меченном тритием *L*-Ser(OMe), полученном при 135°C, показывает, что средняя степень замещения водорода на тритий в метильной группе составляет 6%. Расчет распределения изотопомеров СТ₃, СТ₂H, СТН₂ дает при равновероятностном замещении в метильной группе 0.13,

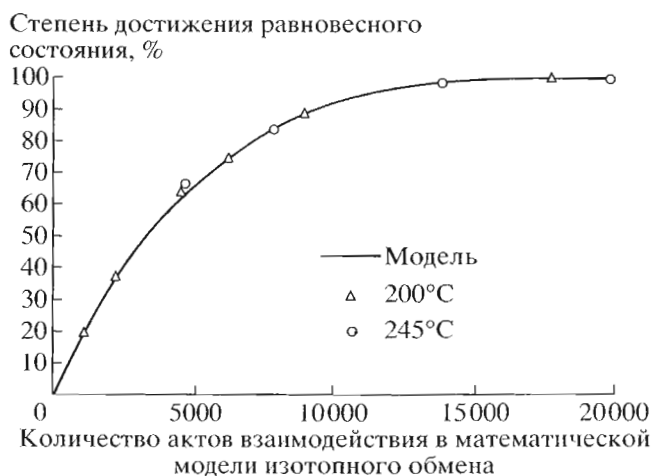


Рис. 1. Кинетика установления изотопного уравнивания между Н-С молекулы валина твердой фазы и газообразным ²H₂. Результаты расчета модели при равновероятностном обмене и экспериментальные данные при ВТКИО валина при 200 и 245°C [47].

6.1 и 93.8% соответственно при вероятности замещения, равной 0.06 [60]. Из данных табл. 3 следует, что содержание высоко замещенных форм CT_3 и CT_2H в $Ser(OMe)$ при температуре $135^\circ C$ в несколько раз превышает рассчитанное для равновероятностного замещения при средней степени замещения в 6%. Причиной такого отклонения в сторону образования высоко замещенных форм может быть то, что только часть молекул в твердофазной смеси доступна для спилловер-трития. В предположении того, что водородные атомы в метильной группировке химически эквивалентны, на основании данных по распределению изотопмеров и данных о средней степени замещения $H-C$ в метильной группировке, была рассчитана доля аминокислоты в твердой фазе, участвующая в реакции [60]. Было показано, что экспериментально наблюдаемое распределение изотопмеров при $135^\circ C$ соответствует рассчитанному при условии того, что в реакции принимают участие 25% молекул, а 75% не доступны для нее. Анализ распределения изотопмеров при $150^\circ C$ показал увеличение доли молекул аминокислоты, доступной для реакции до 40%, а при $170^\circ C$ все молекулы доступны для СВ. Увеличение температуры реакции сопровождается значительным увеличением молярной радиоактивности и увеличением доли метки, находящейся при $C\alpha$. При температуре $180^\circ C$ и выше региоселективность реакции ВТКИО в аминокислотах уменьшается, и изотопный обмен происходит равномерно по всем $H-C$ связям с образованием равномерно меченных соединений, причем глубина такого замещения определяется только соотношением водородных и изотопных атомов в системе.

Для анализа распределения трития в ряде меченых аминокислот и пептидов, полученных реакцией ВТКИО, был использован 3H -ЯМР [61, 62]. Некоторые результаты этого исследования в аминокислотах, полученных при $150^\circ C$, приведены в табл. 4.

В алифатических аминокислотах, не содержащих дополнительных функциональных группировок, таких, как Ala, Val, Leu и Ile, изотопный обмен происходит преимущественно в метильных группировках с близкой специфичностью. Водородные атомы при вторичных и третичных углеродных атомах проявляют при ВТКИО значительно меньшую реакционную способность. Причина такого различия в реакционной способности будет обсуждена ниже с использованием квантово-химических расчетов [63]. Для метильных группировок в этих аминокислотах происходит снижение энергии активации для реакции обмена водорода за счет участия электронодонорных кислородных атомов карбоксильной группировки в стабилизации переходного состояния. В ряде аминокислот, например, таких, как Ser, Thr, Asp и Asn, среднее включение трития в $H-C\alpha$ ($C2$) зна-

Таблица 3. Характеристика реакции ВТКИО *O*-метилсерина с тритием при разной температуре реакции (5% Pd/CaCO₃ в присутствии PdCl₂) по данным работы [60]

Характеристика	Температура реакции, °C			
	135	150	170	200
Среднее включение трития (атом)	0.31	0.81	2.39	4.40
Распределение трития во фрагменте (атом)				
H-C α	0.11	0.23	0.53	0.75
H-C β	0.015	0.06	0.48	1.37
OMe	0.18	0.52	1.38	2.28
Распределение изотопмеров в OMe, %				
CTH ₂	70	51	46	15
CT ₂ H	26	39	41	42
CT ₃	4	10	13	43
Доля аминокислоты в зоне реакции, %	25	40	100	100

Таблица 4. Распределение трития и его среднее включение в аминокислотах для реакции ВТКИО при $150^\circ C$, 40 мин [59]

Аминокислота	Среднее включение трития (атом)	Распределение трития по атомам аминокислоты, %				
		C α	C β	C γ	C δ	C ϵ
Ala	0.45	4	96			
Asn	0.66	40	60			
Asp	0.21	40	60			
Arg	2.17	19	23	14	44	
Gly	0.21	100				
Hyp	0.52	6	7	5	83	
Pro	0.55	9	6	4	81	
Met	0.17	75	0	4	21	
Met(O)	0.34	14	0	25	61	
Met(O ₂)	0.48	0	0	40	60	
Ser	0.52	70	30			
Ser(OMe)	0.72	29	7	64		
Thr	0.66	18	9	73		
Leu	0.90	4	5	5	86	
Lys	1.76	31	10	12	18	29
Val	0.86	4	4	92		

чительно увеличивается, что может быть связано с участием электронодонорных атомов при C β (C3) в стабилизации переходного состояния. Общая реакционная способность аспарагиновой кислоты ниже, а основных аминокислот лизина и

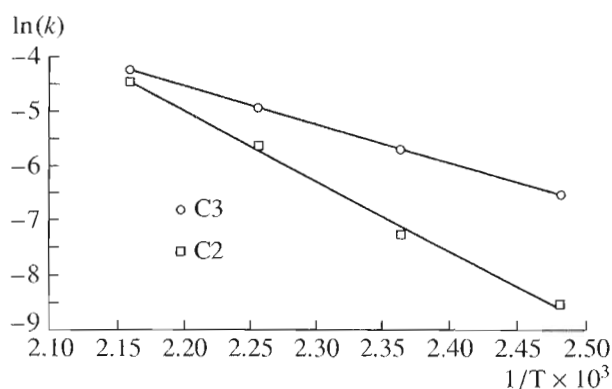


Рис. 2. Зависимость $\ln k$ от T^{-1} для реакции ВТКИО водородных атомов при C2 и C3 в аланине [64].

аргинина выше, чем для алифатических аминокислот, не содержащих дополнительных функциональных группировок (табл. 4). Более подробно наблюдаемая региоселективность ВТКИО будет обсуждена ниже с использованием квантово-химического моделирования этой реакции.

В работе [64] энергию активации реакции ВТКИО для различных положений аминокислот экспериментально определяли с привлечением ^3H -ЯМР. Показано, что $E_{\text{акт}}$ составляет для $\text{H}-\text{C}\beta$ и $\text{H}-\text{C}\alpha$ *L*-аланина 14 и 25 ккал/моль соответственно. Зависимость скорости реакции от температуры для реакции ВТКИО водорода на тритий при углеродных атомах C2 и C3 аланина показана на рис. 2. При 130°C скорость замещения $\text{H}-\text{C}\beta$ на тритий выше, чем $\text{H}-\text{C}\alpha$, в 7.5 раз. При увеличении температуры реакции скорость изотопного обмена увеличивается, причем для $\text{H}-\text{C}\alpha$ это увеличение происходит в большей степени. При температуре 130°C изотопная метка селективно включается в метильную группу, в то время как при 190°C можно говорить о равномерном заме-

щении водорода на тритий по всем $\text{C}-\text{H}$ -связям молекулы *L*-аланина.

Известно, что энергия активации ($E_{\text{акт}}$) определяется лимитирующей стадией. Для реакций с участием $\text{C}\beta$ лимитирующей стадией может быть стадия перехода активированного водорода с поверхности платинового металла, или миграция по неорганической поверхности, или реакция между $\text{C}\beta$ и нанесенным веществом [38]. Для частиц спилловер-водорода, участвующих во взаимодействии с различными положениями молекулы аланина, стадии перехода активированного водорода с поверхности платинового металла и миграции по неорганической поверхности являются общими. То, что реакция изотопного обмена в различных положениях молекулы происходит с различной $E_{\text{акт}}$, свидетельствует о том, что лимитирующей стадией ВТКИО является взаимодействие спилловер-третия с органическим соединением. Анализ замещения в ароматических аминокислотах позволил выяснить важные особенности реакции ВТКИО (табл. 5).

В гистидине 76% метки включается в имидазольную группировку. Для фенилаланина, тирозина и триптофана высокой способностью к обмену обладают $\text{H}-\text{C}\beta$ боковой цепи. В тирозине ВТКИО происходит наиболее активно для атомов водорода при C3 и C5, находящихся в *орто*-положениях по отношению к гидроксильной группе. Как следует из квантово-химических расчетов, это положение несет наибольший отрицательный заряд на углероде и обладает наибольшим сродством к протону [59]. Такая реакционная способность $\text{C}\beta$ находится в соответствии с электрофильным характером реакции ВТКИО [60]. Также показано, что $\text{H}-\text{C}2$ в гетероароматической группировке триптофана наиболее реакционно способны по отношению к $\text{C}\beta$. В 5-гидрокситриптаминe легче всего обменивается водород в C4 положении индольного фрагмента, находящийся в *орто*-положении по отношению к гидроксильной группе при C5. Следует отметить, реакционная способность водорода при C6, также находящегося в *орто*-положении к этому гидроксилу, примерно в 6 раз меньшая, чем для $\text{H}-\text{C}4$. Такое различие в реакционной способности связано с особенностями электронного строения 5-гидрокситриптамина.

Таблица 5. Распределение изотопной метки в ароматических аминокислотах и 5-гидрокситриптаминe при ВТКИО с тритием при 150°C, 40 мин по данным работы [59]

Аминокислота	Распределение трития в аминокислоте, %							
	C α	C β	C2	C3	C4	C5	C6	C7
His	20	4	55	–	–	21		
Phe	13	40	4.5	16	6	16	4.5	
Tyr	11	35	6	21	–	21	6	
Trp	11	24	25	–	5	10	10	15
5-Гидрокситриптамин	35	7	10	–	35	–	6	7

Примечание. Данные ^3H -ЯМР [61, 62].

Реакция изотопного обмена вносит существенный вклад в распределение изотопной метки при твердофазном гидрировании кратных связей в ненасыщенных предшественниках аминокислот при температуре 80–120°C [65, 66]. При твердофазном гидрировании количество включаемого трития превышает стехиометрическое за счет обмена в аллильных положениях ненасыщенных предшественников аминокислот. С ростом температуры реакции включение трития значительно увеличивается. Твердофазное гидрирование позволяет

Таблица 6. Распределение изотопной метки (%) в [³H]энкефалинах, полученных реакцией ВТКИО при температуре 180°C, 20 мин по данным ³H-ЯМР* работы [70]

Аминокислотный остаток	Доля трития, %		Положение метки в остатке	DALG		LENK	
	DALG	LENK		δ, м.д.	доля ³ H, %	δ, м.д.	доля ³ H, %
Tyr1	27.1	28.0	Cα	4.15	4.6	4.20	0.5
			Cβ	3.09	1.3	3.08	1.8
			C2	7.17	1.5	7.20	2.5
			C3	6.87	19.7	6.91	23.1
Gly2	–	30.5	Cα			3.85	30.5
Gly3	30.5	31.8	Cα	3.80	30.5	3.78	31.8
Phe4	20.0	9.1	Cα	4.60	14.3	4.60	1.5
			Cβ	3.08; 2.95	2.0	3.12; 2.96	2.9
			C2	7.29	1.0	7.29	1.3
			C3	7.40	2.0	7.40	2.4
Leu5	6.3	0.6	Cα	7.35	0.7	7.35	1.0
			Cβ	4.30	6.3	4.19	0.6
Arg6	16.1	–	Cα	4.29	14.8		
			Cβ	3.10	1.3		

* 640 МГц в D₂O при pH 7.0, Varian UNITY-600.LENK – [Leu⁵]энкефалин, DALG – даларгин с молярной радиоактивностью 120 и 138 Ки/ммоль соответственно.

получить меченые аминокислоты с большим включением трития, чем при традиционном жидкофазном гидрировании. Особенностью твердофазных реакций является то, что реакцию изотопного обмена можно провести, не затрагивая кратных связей [67]. Реакцией ВТКИО была получена 3,3-диметил-2-бензоиламиноакриловая кислота с молярной радиоактивностью 8 Ки/ммоль, содержащая всю изотопную метку в метильных группировках. В присутствии же растворителя активированный на катализаторе водород вступает значительно быстрее в реакцию гидрирования, чем изотопного обмена. Твердофазное гидрирование может происходить стереоселективно [68]. Реакция (*R*)-4-*трет*-бутокси-1-пирролин-2-карбоновой кислоты с тритием позволила получить 4-гидроксипролин с 6-кратным превышением *L*-формы.

Региоселективность ВТКИО исследовалась также в сложных полимерных молекулах, таких, как пептиды и белки. Влияние строения пептида на реакционную способность Н–С исследовалось на примере Gly-содержащих пептидов: GGV, GVG, VGG, GGH, GHG, HGG [60, 62]. Показано, что все остатки Gly, находящиеся в средней части исследованных трипептидов, обнаруживают практически одинаковое замещение водорода на тритий. Из данных по распределению изотопмеров следует, что ВТКИО при 150°C происходит с равной доступностью всех молекул пептида для СВ, а изотопный обмен осуществляется по наиболее активным положениям молекул. Для пептида HGG наиболее активными ока-

зались имидазольные группировки гистидина. При температуре 135°C около 56% изотопной метки включается в гистидиновый фрагмент пептида HGG. Увеличение температуры реакции до 150°C приводит к росту включения трития от 1.72 до 3.79 атомов на молекулу, а при 170°C в среднем включается 5.86 атомов. При 170°C достигается распределение метки в этом пептиде, близкое к равномерному. При 180°C был получен пептид VGG с молярной радиоактивностью 208 Ки/ммоль и равномерным замещением водорода на тритий. Общее замещение водорода на тритий составляет около 70%, при этом рацемизация асимметрического Cα в молекуле валина не превышает 1%. Подтверждение тому, что рацемизация в пептидах при ВТКИО не происходит, было получено также на примере гептапептида Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala [69].

Важной особенностью ВТКИО в пептидах является возможность изменения реакционной способности пептидных фрагментов при изменении строения и конформации пептидной цепи [70]. Это показано на примере близких по строению энкефалинов: эндогенного опиоидного пептида [Leu⁵]энкефалина (LENK, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) и его синтетического аналога даларгина (DALG, Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg). При 180°C исследуемые меченные тритием пептиды были получены с близкими величинами молярной радиоактивности, составляющими для LENK и DALG 120 и 138 Ки/ммоль соответственно. Распределение трития в [³H]DALG и [³H]LENK показано в табл. 6.

Как видно из приведенных данных, у исследуемых пептидов наблюдается значительное сходство в реакционной способности их фрагментов. В остатках Tug1 обмен легче всего происходит в *орто*-положении к ОН-группе ароматического кольца. Это положение характеризуется, по данным квантово-химических расчетов, наибольшим сродством к протону ($C3 - 140$ ккал/моль, $C2 - 132$ ккал/моль) [59]. Для Н-С3 облегчено взаимодействие с электрофильным кислотным каталитическим центром, возникающим при ВТКИО под действием СВ. Для Н-С2, Н-С3 и Н-Сβ в Tug1 в исследованных энкефалинах наблюдается близкая реакционная способность, в то время как для Н-Сα наблюдается значительное различие. Такая же повышенная реакционная способность Н-Сα в DALG по сравнению с LENK наблюдается и в остатках Phe4 и Leu5. Реакционная способность Н-Сβ и ароматической части остатка Phe4 для LENK и DALG близки, и значительное различие в количестве трития, включенного в остаток Phe4 этих пептидов, связано с различной реакционной способностью Н-Сα. В остатке Phe4 DALG замещение Н-Сα на тритий составляет почти 70%, а степень замещения Н-Сα в том же остатке в LENK составляет лишь около 6%. Авторы этой работы связывают причину такого резкого увеличения реакционной способности Н-Сα во всех аминокислотных остатках DALG с наличием дополнительного заряда, имеющегося на гуанидиновой группировке Arg6 в DALG, который приводит к изменению конформации пептидной цепи. Остатки Gly3 в DALG и LENK проявляют высокую реакционную способность. При выбранных условиях ВТКИО степень замещения водорода на тритий в этих остатках составляла от 65 до 70%. Реакция ВТКИО позволяет получать высоко меченные тритием образцы, которые используются для исследования рецепторного связывания пептидов и для определения путей их пептидазной биодegradации *in vivo* и *in vitro* [71–73].

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ТВЕРДОФАЗНЫХ РЕАКЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАНТОВО- ХИМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Теоретическому изучению реакции твердофазного изотопного обмена предшествовало экспериментальное исследование региоселективности замещения протия на тритий и расчет энергий активации изотопного обмена для различных положений аминокислот. Данные по замещению протия на тритий в аминокислотах при ВТКИО были впервые получены с помощью ^3H -ЯМР [74, 75]. Результаты экспериментального исследования реакции ВТКИО в аминокислотах при 150°C приведены в табл. 4 и 5. При реакции ВТКИО в молекулах аланина и валина в скорость обмена Н-С

на тритий значительно выше для метильных групп, чем для водородных атомов, связанных с вторичными и третичными атомами углерода. Такое соотношение реакционной способности Н-С в аминокислотах является необычным, так как в большинстве жидкофазных реакций в первую очередь затрагивается наиболее подвижный Н-Сα.

На момент начала данного исследования в литературе отсутствовали однозначные данные о природе находящегося на неорганической подложке СВ. Известно, что в твердой фазе водородные атомы в аминокислотах могут быть замещены на изотопные под действием термически атомизированного трития [76, 77]. Этот метод был с успехом использован для исследования пространственного взаимодействия белков, находящихся в составе белок-белковых комплексов и вирусных частиц [78, 79]. Тритий при этом реагирует как радикальная частица с промежуточным образованием радикала аминокислоты. Способность водорода в аминокислоте к замещению при этом находится в соответствии со стабильностью образующегося радикала аминокислоты. В отличие от реакции ВТКИО, под действием атомизированного трития замещение происходит легче всего по третичным Н-Сα. В аланине, лейцине, изолейцине и валине метильные группировки оказываются наименее реакционноспособными [80]. При этом замещение водорода под действием атомизированного трития происходит с глубокой рацемизацией асимметрических Сα-атомов [81]. В реакции обмена водорода под действием спилловер-трита и с атомизированным тритием наблюдается противоположное соотношение реакционной способности Н-Сα и Н-С в метильных группировках аланина и валина. В работе [63] на основании экспериментальных данных о региоселективности и стереоселективности реакции ВТКИО в аминокислотах было сделано заключение о том, что активированный тритий в реакции ВТКИО реагирует не как атомизированная частица.

Для выяснения механизма реакции ВТКИО с участием СВ в качестве первого шага была рассмотрена корреляция между электронным строением свободных молекул аминокислот и их реакционной способностью. Были выполнены квантово-химические расчеты геометрического и электронного строения α-аминокислот [59]. Распределение зарядов в молекулах аминокислот приведено в табл. 7.

В молекулах аланина и валина наибольшие отрицательные заряды несут С-атомы метильных групп. Согласно экспериментальным данным, атомы водорода этих групп в наибольшей степени обмениваются на тритий. Та же закономерность наблюдается для треонина. Для этих аминокислот прослеживается общая закономерность — чем выше отрицательный заряд на С-атоме, тем

Таблица 7. Данные квантово-химических расчетов эффективных зарядов (q/e в единицах заряда электрона) и сродство к протону (РА, ккал/моль) на атомах аминокислот, приведенные в работе [59]

Аминокислота	C2		C3		C4		C5	
	РА	q/e	РА	q/e	РА	q/e	РА	q/e
Ala	83.0	-0.06	88.5	-0.23				
Val	87.9	-0.01	90.9	-0.10	99.9	-0.22		
Ser	74.5	-0.05	80.8	-0.01				
Thr	80.8	0.07	82.2	0.01	93.5	-0.26		
Pro	78.1	-0.07	85.5	-0.17	77.7	-0.17	88.6	-0.08

легче происходит обмен связанного с ним атома водорода [59, 60]. Таким образом, наличие корреляции между величиной отрицательных зарядов на С-атомах и реакционной способностью было сделано заключение о электрофильном характере СВ в реакции ВТКИО.

Вместе с тем было отмечено, что взаимосвязь между зарядом и реакционной способностью носит более сложный характер. Как было показано на примере молекул пролина, метионина и некоторых других аминокислот, преимущественное замещение водорода на тритий происходит на тех углеродных атомах, которые не несут существенного отрицательного заряда, но находятся рядом с атомом С, связанным с электронодонорными атомами N или O. Приведенные ниже результаты работ по квантово-химическим расчетам взаимодействия между СВ и аминокислотой позволили объяснить причины отклонений от простых корреляций между зарядами на С-атомах и реакционной способностью в реакции ВТКИО.

В работе [82] проведено квантово-химическое моделирование спилловера водорода по графитоподобной поверхности методом Хартри-Фока в базе HF/6-31G* (HF/6-31G*) [83]. В этой работе был рассмотрен перенос водорода между соседними атомами С каронена с целью выбора предпочтительной гипотезы о природе СВ. Энергия активации переноса протона между соседними С-атомами составила 10.0 ккал/моль (HF/6-31G*), что довольно близко к экспериментально определенной величине $E_{\text{акт}}$ для СВ по углеродной поверхности, составляющей 15.5 ккал/моль [84]. Взаимодействие же атомизированного водорода в виде радикальной частицы с С1 каронена термодинамически не выгодно. Энтальпия такой реакции составляет 36.3 ккал/моль (HF/6-31G*) [82]. Полученные данные позволили сделать выбор в пользу положительно заряженных частиц при спилловере водорода по углеродной поверхности. В пользу такого представления свидетельствует то, что СВ сопровождается возникновением одновременно электронной и ионной проводимости [13].

В работе [68] были проведены квантово-химические расчеты взаимодействия протона с аминокис-

лотами и определена энергия образования комплексов аминокислот с протоном. В комплексах протон присоединен к насыщенному углеродному атому, при этом возникает структура с пятикоординированным атомом углерода. Для таких расчетов за основу была взята структура существующего в газовой фазе иона метония CH_5^+ [85, 86]. Показано, что наибольшим сродством к протону обладают, как и следовало ожидать, электроотрицательные атомы азота и кислорода групп $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ [87]. Это согласуется с тем, что лабильный водород, содержащийся в этих положениях, в условиях твердофазной реакции легко обменивается на тритий уже при комнатной температуре. Изотопный же обмен в группе Н-С происходит со значительной скоростью лишь при температуре, превышающей 100°C. При последующем взаимодействии твердой фазы с растворителем (для извлечения меченой аминокислоты) изотопная метка из лабильных положений легко вымывается. Поэтому для поиска корреляций между региоселективностью изотопного обмена Н-С и сродством к протону рассматривалась лишь энтальпия образования комплексов протона с С-атомами в различных положениях аминокислот.

Во всех комплексах при насыщенных углеродных атомах присутствует фрагмент, содержащий пятикоординированный атом углерода и связь Н-Н, подобную связи в ионе метония CH_5^+ [86]. Наиболее прочными, как правило, оказываются те комплексы, в которых присоединенный протон может дополнительно взаимодействовать с атомом O, N или S аминокислоты. Примером такой структуры является комплекс аланина с протоном в β -положении. Подобные структуры найдены и для других аминокислот. Из сопоставления данных, приведенных в табл. 4 и 7, видно, что тритий включается преимущественно в те положения молекул аланина, валина, серина и треонина, которые обладают наибольшим вычисленным сродством к протону. На основании сравнения региоселективности замещения водородных атомов при реакции ВТКИО и квантово-химических расчетов стабильности комплексов с прото-

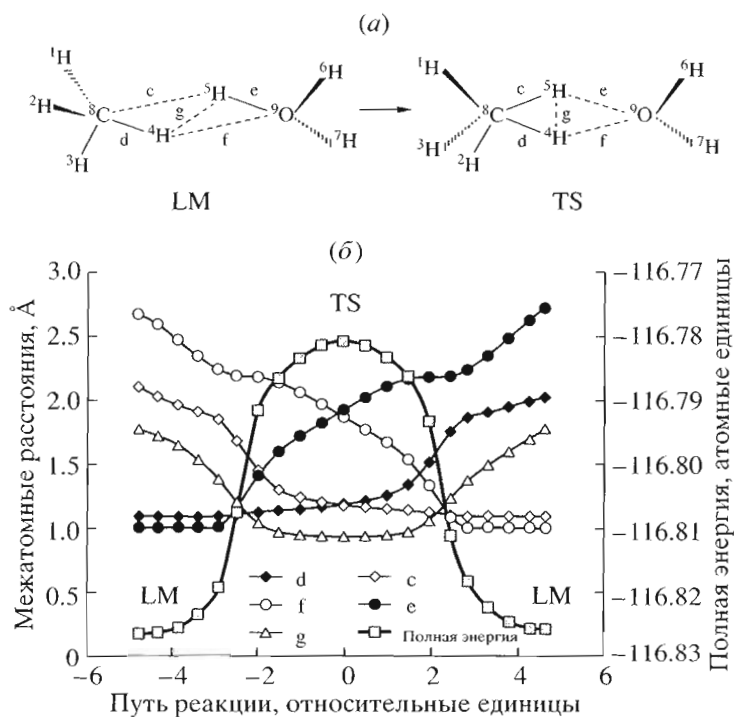


Рис. 3. *Ab initio*-квантово-химический расчет обмена водорода между метаном и модельным кислотным центром. (а) Переходное состояние реакции между CH_4 и H_3O^+ (TS) и межмолекулярный комплекс этих соединений (LM). (б) Реакционный путь взаимодействия между CH_4 и H_3O^+ . Изменение длин связей c, d, e, f, g и полной энергии реакции методом MP2/6-31G* [89].

ном было сделано заключение о том, что взаимодействие протона с алифатическими C-атомами аминокислот качественно верно отражает наблюдаемую реакционную способность H–C по отношению к СВ. В работе [59] был сделан вывод о том, что реакция ВТКИО является реакцией электрофильного замещения, и СВ реагирует как частица, имеющая положительный заряд.

При обычных температурах протон всегда связан с одним из атомов, являющимся донором электронов. Комплекс протона с электронодонорным атомом является КЦБ, простейший представитель которого ион H_3O^+ . В работе [88] были выполнены квантово-химические расчеты взаимодействия метана с ионом гидроксония H_3O^+ с участием двух молекул воды. Этот двуцентровый механизм предполагает синхронный перенос водорода с H_3O^+ на CH_4 и от CH_4 на H_2O . При этом происходит обращение конфигурации углеродного атома. Изотопный обмен водорода в реакции ВТКИО происходит с сохранением конфигурации асимметрических углеродных атомов, что не позволяет использовать этот двуцентровый механизм для расчета реакции ВТКИО. В работе [89] был исследован новый путь для реакции замещения водорода в метане под действием H_3O^+ , основанный на участии в реакции обмена водорода лишь одной молекулы воды. Этот путь реакции осуществляется с сохранением конфигурации уг-

леродного атома по синхронному одноцентровому механизму. Расчеты реакции обмена водорода были выполнены методом теории возмущения Меллера-Плессета второго порядка с использованием базиса 6-31G* (MP2/6-31G*) [90] и корреляционного базиса Даннинга (MP2/aug-cc-pVDZ) [91] (рис. 3).

В работе [89] было показано, что при взаимодействии CH_4 и H_3O^+ образуется прочный молекулярный комплекс (LM). Энтальпия образования этого комплекса составляет 11.4 ккал/моль (MP2/aug-cc-pVDZ). Фрагмент CH_5 в этом комплексе несет эффективный заряд +0.58161 (по Малликену). Из характера изменения длин связей и полной энергии реакции можно видеть, что обмен водорода происходит по синхронному механизму. При этом образуется переходное состояние (TS) с пятикоординированным углеродом (рис. 3). Обменивающиеся водородные атомы сближены и между ними имеется химическое взаимодействие, которое может быть описано как трехцентровая связь.

С помощью *ab initio*-расчетов были исследованы термодинамические параметры и энергия отрыва протона от кислотных центров, представленных кластерами $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ [92]. Показано, что в ряду $n = 1, 2, 3$ уменьшается как сила кислотного центра, так и прочность комплексов этих КЦБ с бензолом и этиленом. Установлена линейная зависимость между энергией отрыва протона от

КЦБ и энергией образования комплекса КЦБ с бензолом и этиленом. В работе [89] были проведены квантово-химические расчеты взаимодействия аланина с КЦБ, представленным H_3O^+ . Вычисленная энергия активации реакции замещения $\text{H}-\text{C}\alpha$ и $\text{H}-\text{C}\beta$ аланина составляет 27 и 17 ккал/моль ($\text{HF}/6\text{-}31\text{G}^*$) соответственно. Строение образующихся переходных состояний для этой реакции показано на рис. 4.

Экспериментально определенные энергии активации реакции ВТКИО для этих же положений молекулы аланина хорошо согласуются с теоретическими и составляют: для $\text{H}-\text{C}\alpha$ – 25, а для $\text{H}-\text{C}\beta$ – 14 ккал/моль [64]. На основании квантово-химического расчета реакции ВТКИО был сделан вывод о том, что наиболее вероятной причиной высокой реакционной способности метильной группировки в аланине является взаимодействие между $\text{H}-\text{C}\beta$ и карбонильным кислородом, приводящее к стабилизации переходного состояния и снижению энергии активации реакции.

В работе [93] были проведены квантово-химические расчеты реакции обмена водорода между *L*-гидроксипролином и КЦБ, представленным H_3O^+ . Энергия активации этой реакции была определена *ab initio* $\text{HF}/6\text{-}31\text{G}^*$ -методом. Результаты экспериментального исследования изотопного обмена в *L*-гидроксипролине и теоретического расчета способности $\text{H}-\text{C}$ в этой аминокислоте к обмену приведены в табл. 8. Строение образующихся при этом переходных состояний реакции ВТКИО в *L*-Нур показано на рис. 5.

Из данных табл. 8 следует, что существует корреляция между способностью к обмену $\text{H}-\text{C}$ аминокислоты и рассчитанной энергией активации для реакции обмена водорода. Степень замещения водорода на тритий тем больше, чем меньше вычисленная с помощью *ab initio*-расчетов $E_{\text{акт}}$. Способность $\text{H}-\text{C}$ к замещению повышается при наличии дополнительной стабилизации переходного состояния. Электронное взаимодействие между участвующими в реакции водородными атомами и электронодонорными гетероатомами является причиной такой стабилизации и снижения энергии активации. Наибольшей реакционной способностью обладает $\text{H}_\alpha-\text{C}5$ гидроксипролина (стереохимическое отнесение $\text{H}_\alpha-\text{C}$ такое же, что и $\text{H}-\text{C}\alpha$). При этом в переходном состоянии обменивающиеся водородные атомы оказываются сближенными с атомами O_6 и N_1 . Для $\text{H}_\beta-\text{C}5$ взаимодействие с гидроксильной группой при $\text{C}4$ становится невозможным, а стабилизация TS происходит только на N_1 . Для $\text{H}_\alpha-\text{C}3$ в TS имеется взаимодействие только с O_6 , а для $\text{H}_\beta-\text{C}3$ все гетероатомы расположены слишком далеко, чтобы стабилизировать это переходное состояние. Данные, подтверждающие эти представления о механизме реакции твердофазного изотопного

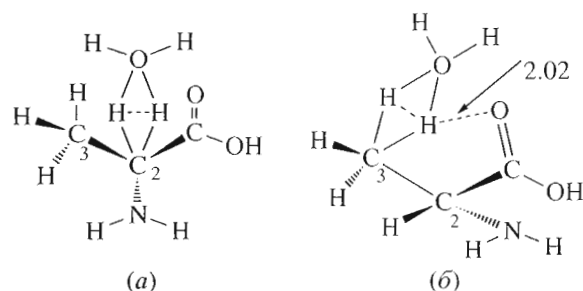


Рис. 4. Переходные состояния для реакции ВТКИО между кислотным центром H_3O^+ и $\text{H}-\text{C}2$ (а) и $\text{H}-\text{C}3$ аланина (б). Показано взаимодействие обменивающихся водородных атомов с карбонильным кислородом [64].

обмена, получены также при *ab initio*-расчете взаимодействия Val, Pro и Thr с H_3O^+ [94].

Проведение реакции твердофазного изотопного обмена при повышенной температуре оказалось эффективным не только для введения изотопов в такие стабильные соединения, как аминокислоты, но и для пептидов и белков [95–97]. На примере даларгина и α -конотоксина (CtxG1) показано, что высоко меченные тритием пептиды полностью сохраняют биологическую активность [98, 99]. При теоретическом исследовании обмена водорода в полипептидах на примере

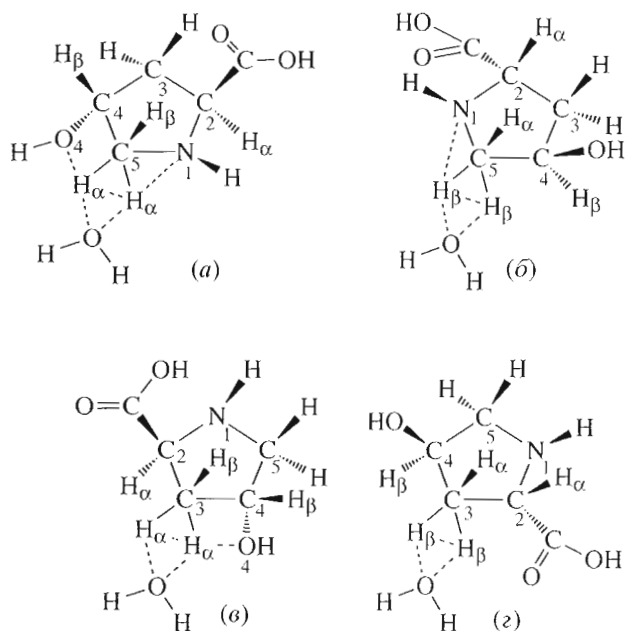


Рис. 5. Переходные состояния при реакции *L*-Нур с кислотным центром H_3O^+ , где R означает расстояние между атомами в Å. Обмен водорода при углеродных атомах: (а) – TS для $\text{H}_\alpha-\text{C}5$, $R(\text{H}_\alpha-\text{N}_1) = 2.11$, $R(\text{H}_\alpha-\text{O}_4) = 1.82$ Å; (б) – TS для $\text{H}_\beta-\text{C}5$, $R(\text{H}_\beta-\text{N}_1) = 2.10$, $R(\text{H}_\beta-\text{O}_4) = 3.14$ Å; (в) – TS для $\text{H}_\alpha-\text{C}3$, $R(\text{H}_\alpha-\text{N}_1) = 3.27$, $R(\text{H}_\alpha-\text{O}_4) = 1.96$ Å; (г) – TS для $\text{H}_\beta-\text{C}3$, $R(\text{H}_\beta-\text{N}_1) = 2.26$, $R(\text{H}_\beta-\text{O}_4) = 3.47$ Å [89].

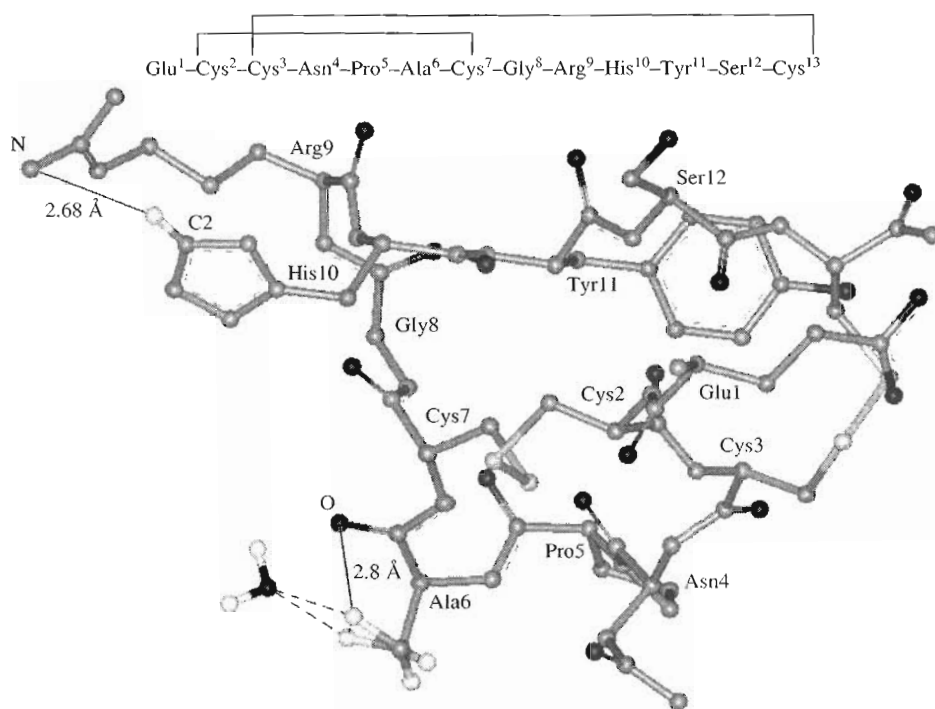


Рис. 6. Пространственная структура конотоксина CtxG1 и переходных состояний для реакции ВТКИО в Ala6 и His10 в CtxG1 [99].

CtxG1 удалось выяснить важные особенности протекания реакции ВТКИО, связанные с влиянием подвижности полипептидной цепи на реакционную способность аминокислот (рис. 6, табл. 9).

Известно, что ВТКИО в ряду свободных аминокислот происходит с сопоставимой интенсивностью [59]. Поэтому можно было ожидать, что тритий окажется во всех остатках CtxG1. Однако из табл. 9 можно видеть, что изотопный обмен не происходит во фрагменте Asn4-Pro5-Ala6. Распределение изотопной метки в пептидной цепи определяется реакционной способностью Н-С в

Таблица 8. Распределение трития в гидроксипролине, полученном реакцией ВТКИО при 150°C, и *ab initio*-расчет энергии активации реакции обмена водорода методом Хартри-Фока по данным работы [93]

Замменяемый водород	Включение трития, %	$E_{\text{акт}}$, ккал/моль
H-C2	9	23.6
H $_{\alpha}$ -C3	6	23.7
H $_{\beta}$ -C3	1	26.2
H-C4	4	25.6
H $_{\alpha}$ -C5	59	18.1
H $_{\beta}$ -C5	21	22.0

$E_{\text{акт}}$ реакции обмена Н-С в метане 27.7 ккал/моль (HF/6-31G*) [63].

отдельных аминокислотных остатках и их доступностью для СВ. Доступность Н-С в CtxG1 оценивали по доле ван-дер-ваальсовой поверхности, доступной для взаимодействия с H₂O. Этот показатель определяли с помощью программы MOLMOL [100]. Для анализа реакционной способности С-Н-связей в CtxG1 проводился *ab initio*-квантово-химический расчет переходного состояния реакции ВТКИО во фрагментах CtxG1 с использованием метода Хартри-Фока [83].

Отсутствие ³Н в остатках Pro5 и Asn4 может быть связано с низкой пространственной доступностью наиболее реакционных положений этих аминокислот. Было показано, что CδН для Pro5, а также CαН и CβН для Asn4 в CtxG1 обладают низкой доступностью. Однако метильная группа Ala6 открыта полностью и, тем не менее, тритий не включается в эту часть молекулы (табл. 9). Это означает, что доступность того или другого участка пептида необходимое, но не достаточное условие для ВТКИО. К особенностям строения Ala6 можно отнести то, что эта аминокислота находится на фрагменте Asn4-Cys7 с более жесткой конформацией, чем остальная часть молекулы CtxG1, в результате чего остаток Ala6 имеет конформацию, характерную для аминокислотных остатков в α-спирали [101].

В работе [99] был проведен квантово-химический расчет пути реакции изотопного обмена в остатке аланина из модельного фрагмента CH₃-C(O)-NH-CαH(CH₃)-C(O)-NH₂. Геометрия

тяжелых атомов главной цепи этого модельного фрагмента была зафиксирована в соответствии с конформацией фрагмента Pro5–Ala6–Cys7 из CtxG1 (рис. 6). В результате расчета было получено, что энергия активации ($E_{\text{акт}}$), рассчитанная для реакции обмена Н–С β -атома Ala6, равнялась 33.7 ккал/моль (HF/6-31G*). Для сравнения: рассчитанная $E_{\text{акт}}$ изотопного обмена Н–С β в свободном аланине составляет 17 ккал/моль (HF/6-31G*). Снижение $E_{\text{акт}}$ реакции ВТКИО для Н–С β в свободном аланине объясняется участием карбонильного кислорода в переходном состоянии; в этом случае расстояние между карбонильным O атомом и обменивающимися атомами Н–С β составляет лишь 2.16 Å [64]. В случае с CtxG1, высокая энергия активации водородного обмена в метильной группе Ala6 связана с жесткой конформацией этого участка пептида, который мешает взаимодействию карбонильного O с Н–С β в переходном состоянии (расстояние между O и Н–С β равно 2.8 Å). Таким образом, на примере CtxG1 в работе [99] было впервые показано, что ограниченная подвижность пептидного фрагмента может вызывать значительное снижение скорости реакции твердофазного изотопного обмена водорода под действием СВ.

Из данных, приведенных в работе [99], следует, что в [^3H]CtxG1 Н–С2 His10 замещено тритием на 57%. Из табл. 9 видно, что имидазол His10 оказывается самым активным в реакции ВТКИО CtxG1. Высокая реакционная способность имидазольной группировки была обнаружена при ВТКИО свободного гистидина и его трипептидов [60]. Однако, если в гистидине и его трипептидах реакционная способность водородных атомов при С2 и С4 в имидазольном кольце оказывается близкой, то в α -конотоксине G1 изотопный обмен происходит исключительно при С2. На основании квантово-химического расчета было показано, что причиной высокой реакционной способности Н–С2 His10 является участие Arg9 в стабилизации переходного состояния, образующегося при ВТКИО. Расстояние между обменивающимся атомом Н–С2 His10 и атомом N в гуанидине Arg9 в переходном состоянии, согласно этим расчетам, было равно 2.68 Å (рис. 6). Энергия активации этой реакции оказалась очень низкой (7 ккал/моль, HF/6-31G*). Поэтому именно сближение имидазольной группировки His10 и гуанидина Arg9 является причиной включения около половины трития при Н–С2 имидазольного кольца His10.

Теоретические и экспериментальные исследования реакции ВТКИО водорода на тритий были проведены с зернамицином IIВ (Zrv IIВ: Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Leu-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Phe, где Aib – это 2-аминоизомаляновая кислота) [70]. Молярная радиоактивность [^3H]зернамицина IIВ составила 70 Ки/ммоль. Распределение трития в [^3H]Zrv IIВ показано в табл. 10. Этот пептид

Таблица 9. Распределение изотопной метки в меченом тритием α -конотоксине G1, полученном реакцией ВТКИО с тритием при 140°C, по данным ^3H -ЯМР-спектра (640 МГц) в D₂O при pH 7.5 и 30°C, спектрометр Varian UNITY-600 (США) [99]

Аминокислотный остаток	Доля трития в остатке, %	Положение метки в остатке	δ , м.д.	Доля трития в положении, %
Glu1	3.6	C γ	2.18	3.6
Cys2	7.0	C α	4.60	7.0
Cys3	9.2	C α	4.65	9.2
Asn4	0	–	–	–
Pro5	0	–	–	–
Ala6	0	–	–	–
Cys7	8.0	C α	4.48	8.0
Gly8	2.8	C α	3.78; 4.03	2.8
Arg9	1.8	C γ	1.25	1.8
His10	50.6	C2	7.70	46.6
		C α	4.73	4.0
Tyr11	4.1	C3	6.77	1.4
		C β	2.88	2.7
Ser12	3.7	C α	4.34	3.7
Cys13	9.2	C α	4.63	9.2

Таблица 10. Химические сдвиги сигналов в ^3H -ЯМР-спектре меченого тритием зернамицином, их относительная интегральная интенсивность и отнесение. ^1H - и ^3H -ЯМР-спектры были получены в CD₃OD при 30°C на спектрометре Varian UNITY-600 (США) при рабочей частоте 600 и 640 МГц для протонов и тритонов, соответственно по данным [103]

Аминокислотный остаток	Доля трития в остатке, %	Положение метки в остатке	δ , м.д.	Доля трития в положении, %
Trp1	2.0	C7	7.55	0.5
		C2	7.42	1.5
Ile2	1.9	C α	3.85	1.9
Gln3	38.8	H α -C β *	2.40	18.9
		H β -C β *	2.15	16.7
		H α -C γ *	3.50	3.2
Leu8	0.8	C α	4.42	0.8
Hyp10	10.8	H α -C β *	2.12	1.9
		H β -C β *	2.55	8.9
Hyp13	11.8	H β -C β *	2.54	9.3
		C γ	4.58	2.5
Pro15	33.9	H β -C β *	2.23	25.3
		H α -C δ *	4.02	8.6

* Стереохимическое отнесение Н–С по данным работы [102].

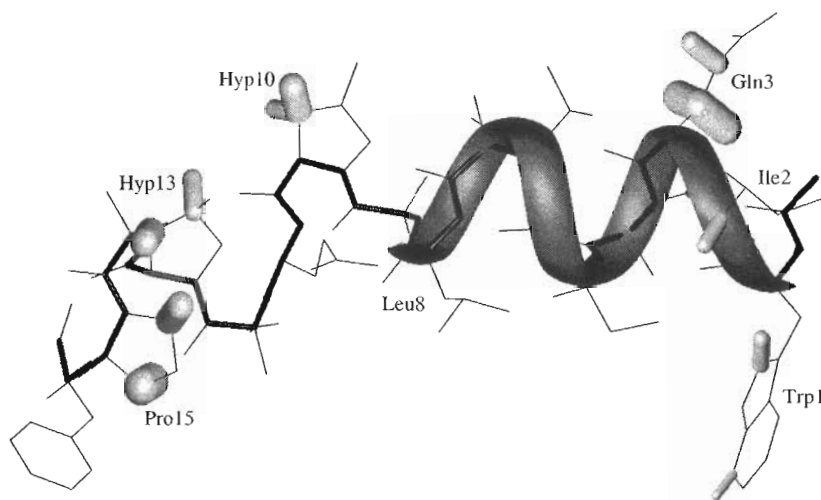


Рис. 7. Пространственное строение зервамицина IIВ. Ширина линий C–H-связей пропорциональна логарифму от содержания трития в H–C по данным табл. 10 [103].

интересен тем, что содержит фрагмент Trp1–Leu8, имеющий конформацию α -спирали [102] (рис. 7).

В Zgv IIВ высокую реакционную способность обнаруживают Hyp10, Hyp13 и Pro15. В этих аминокислотах включение трития происходит с высокой региоселективностью и стереоселективностью. Стереохимическое отнесение H_{α} -C и H_{β} -C в этих аминокислотных фрагментах было проведено относительно H-C α [102]. Конфигурация H_{α} -C совпадает с H-C α , а для H_{β} -C является противоположной. Кроме того, как видно из рис. 7, твердофазная реакция изотопного обмена водорода происходит преимущественно на “одной стороне” молекулы Zgv IIВ. Замещению подвергается H_{β} -водород в C β -положении, который расположен с той же стороны пирролидиновой группировки, что и карбонил этого аминокислот-

ного фрагмента. Такой характер распределения изотопной метки в этом полипептиде авторы связывают с ориентацией Zgv IIВ при сорбции на неорганической подложке при ВТКИО.

В работе [70] было сделано заключение о том, что низкая реакционная способность аминокислотных остатков α -спирального фрагмента Trp1–Leu8 связана с пространственными ограничениями, обусловленными его конформационной жесткостью. Причиной же высокой реакционной способности H-C β в Gln3 является благоприятное взаимное расположение атома кислорода карбонила боковой цепи Gln3 и азота аминогруппы пептидной цепи, которое способствует протеканию реакции ВТКИО. Энергия активации, рассчитанная для реакции обмена H-C β в Gln3, равнялась 26.2 ккал/моль (MP2/6-31G*), тогда как для H-C α и H-C γ значение $E_{\text{акт}}$ составило 30.9 и 35.3 ккал/моль (MP2/6-31G*) соответственно. Энергия активации реакции обмена водорода для H-C β в Gln3 оказывается наименьшей, чему и соответствует наибольшая степень замещения водорода на тритий. Таким образом, участие карбонильной группы боковой цепи Gln3 и амидного азота пептидной цепи во взаимодействии с H-C β в Gln3 приводит к значительному увеличению реакционной способности этого положения при ВТКИО (рис. 8).

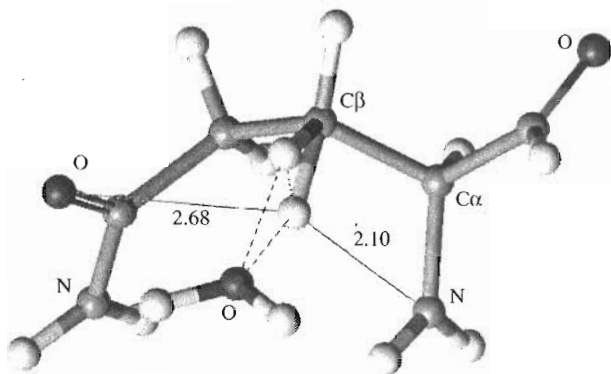


Рис. 8. Структура переходного состояния, рассчитанная для реакции изотопного обмена при H-C β в Gln3 зервамицина IIВ (MP2/6-31G*). Расстояние между обменивающимся водородом и амидным N пептидной связи равно 2.1 Å [103].

Результаты, полученные для CtxG1 и Zgv IIВ, позволяют утверждать, что участие электронодонорных атомов O и N в стабилизации переходного состояния является необходимым условием для протекания реакции ВТКИО в полипептидах. При этом электронодонорные атомы могут принадлежать как остатку, в котором происходит обмен, так и другим, пространственно сближенным, аминокислотным остаткам. Таким образом, в отличие от изотопного обмена в свободных аминокис-

Таблица 11. Результат анализа пептидных фрагментов β -галактозидазы *Thermoanaerobacter ethanolicus* по данным работы [103]

№	Пептидный фрагмент*	Масса пептида, Да	Положение в полипептидной цепи	Нормированная реакционная способность в ВТКИО	Доступная для H_2O поверхность в субъединице**, %
1	KEMQKE	791.93	215–220	151.5	21.4
2	EIGMLVFEEI $\alpha\alpha$ β β β β	1179.40	338–347	43.3	13.7
3	DHDFYKE α α α α α	952.97	392–398	50.5	18.2
4	YLRDSE !	781.80	417–422	1	15.1
5	YNTTSAFGS α α α α	946.96	501–509	60.6	13.8

* Под первичной структурой пептидов приведены особенности расположения аминокислотных остатков в пространственной структуре белка: α – α -спираль, β – β -слой, ! – область контакта субъединиц.

** Рассчитана с помощью программы MOLMOL.

кислотах, в полипептидах важную роль играет пространственная доступность обмениваемых протонов для взаимодействия с КЦБ и конформационная жесткость пептидного фрагмента, которая может способствовать или препятствовать электронодонорным атомам участвовать в образовании переходного состояния.

Теоретическое исследование влияния образования α -спиральных фрагментов в полипептидах на реакционную способность образующих их аминокислот было исследовано на примере белка β -галактозидазы из *Escherichia coli* [103]. Были

проведены квантово-химические расчеты реакции обмена водорода в трипептидном фрагменте Gly–Ala470–Gly, находящемся на α -спиральном участке β -галактозидазы. Было показано, что пространственные ограничения, связанные с образованием α -спирального участка, привели к увеличению $E_{акт}$ для Н-С β в Ala470 по сравнению со свободным Ala от 16.6 ккал/моль до 21.4 ккал/моль (MP2/6-31G*). Расчет реакции обмена водорода между остатком серина и КЦБ H_3O^+ также показал, что образование α -спиральных участков в полипептидах приводит к значительному снижению их реакционной способности при ВТКИО.

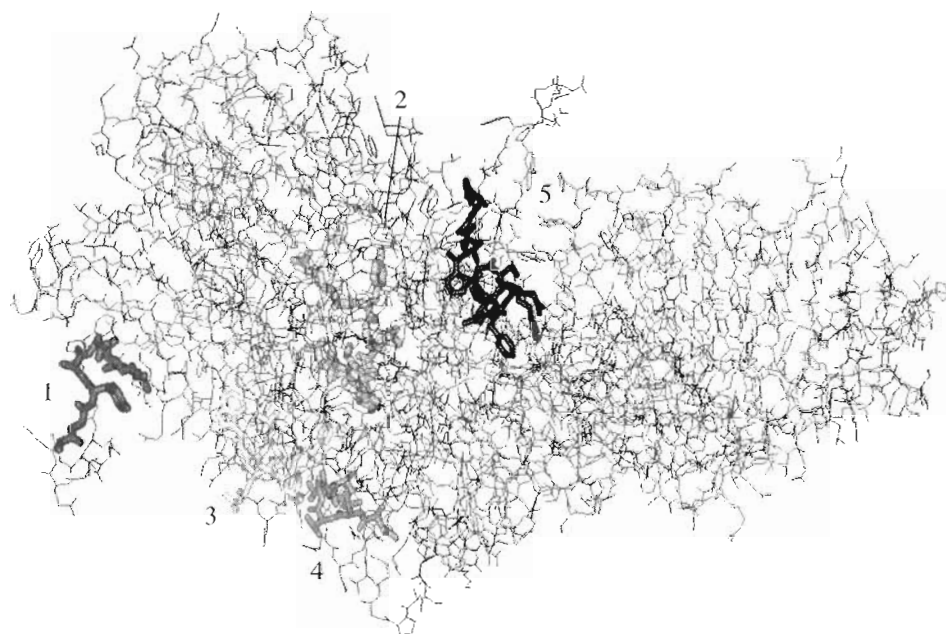


Рис. 9. Расположение фрагментов β -галактозидазы из *Thermoanaerobacter ethanolicus* (табл. 11) на белковой глобуле β -галактозидазы из *Escherichia coli* [103]. Цифры 1–5 соответствуют номеру фрагмента в табл. 11.

В работе [103] изучена реакция ВТКИО в термofilной β -галактозидазе из *Thermoanaerobacter ethanolicus*, являющейся гомодимером с молекулярной массой субъединицы 83 кДа, и в мезофильной β -глюкозидазе из миндаля (КФ 3.2.1.21, Sigma), представляющей собой гетеродимер, состоящий из субъединиц 117 и 66.5 кДа. Определена зависимость между молярной радиоактивностью меченого фермента и сохранением им ферментативной активности от условий проведения ВТКИО. При 120°C и длительности реакции ВТКИО 10 мин были получены меченые белки с молярной радиоактивностью около 1400 Ки/ммоль. Термофильная β -галактозидаза и мезофильная β -глюкозидаза ведут себя в условиях ВТКИО сходным образом, хотя по термостабильности в растворе они различаются на несколько десятков градусов. В эти белки удается ввести до 50 атомов трития при полном сохранении ферментативной активности. Было исследовано влияние пространственного положения пептидных фрагментов белка β -галактозидазы из *T. ethanolicus* на их реакционную способность при ВТКИО (табл. 11, рис. 9).

Показано, что участок КЕМQКЕ(215–220) β -галактозидазы, находящийся на поверхности белковой глобулы и не участвующий в образовании вторичной структуры, имеет наибольшую относительную реакционную способность, тогда как внутренний участок EIGMLVFEEI(338–347) в белковой глобуле имеет в 3.5 раза меньшую реакционную способность. Из приведенных данных для фрагментов DHDFYKE(392–398) и YNTTSAFGS(501–509) β -галактозидазы следует, что участие пептидных фрагментов в образовании α -спиралей и β -слоев приводит к снижению реакционной способности по отношению к СВ. Эта закономерность наблюдалась и для α -спирали зернамицина IIB. Также заметным различием в реакционной способности обладает фрагмент YLRDSE(417–422), расположенный в области контакта субъединиц. Его реакционная способность снизилась более чем в 150 раз. Таким образом, образование межмолекулярного контакта резко снижает возможность протекания реакции твердофазного изотопного обмена с участием СВ.

В заключение можно отметить то, что в аминокислотах использование реакции ВТКИО позволяет практически полностью заменить водород на дейтерий или тритий при сохранении конфигурации асимметрических углеродных атомов. Изотопный обмен в твердой фазе происходит на кислотном центре Бренстедовского типа по синхронному одноцентровому механизму.

Высоко меченные тритием пептиды, содержащие изотопную метку во всех аминокислотах, могут быть получены с использованием реакции ВТКИО. На основе квантово-химических расчетов показано, что участие доноров электронов

(атомов O и N) в стабилизации переходного состояния реакции изотопного обмена является необходимым условием для протекания реакции ВТКИО в пептидах. Эти атомы могут принадлежать как аминокислоте, в которой происходит обмен, так и другим пространственно близким аминокислотам.

Высоко меченные тритием белки, полностью сохраняющие ферментативную активность, можно получить с использованием реакции ВТКИО. Изотопная метка при ВТКИО преимущественно включается в пептидные фрагменты, расположенные на поверхности белковой глобулы. В области контакта субъединиц белка наблюдается резкое снижение включения трития, что может быть использовано для определения участков белковой глобулы, принимающих участие во взаимодействии с другими макромолекулами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nozoe T., Tanimoto K., Takemitsu T., Kitamura T., Harada T., Osawa T., Takayasu O. // Solid State Ionics. 2001. V. 141–142. P. 695–700.
2. Toda F., Kiyoshige K., Yagi M. // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 1989. V. 28. P. 320–324.
3. Toda F., Mori K.J. // Chem. Soc. Chem. Commun. 1989. P. 1245–1251.
4. Sabra F., Bassus J., Lamartine R. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1990. V. 186. P. 69–73.
5. Boudart M., Vannice M.A., Benson J.E. // Z. Phys. Chem. NF. 1969. V. 64. P. 171–177.
6. Conner W.C., Falconer J.L. // Chem. Rev. 1995. V. 95. P. 759–788.
7. Lamartine R., Perrin R. // Spillover of Absorbed Species / Eds Pajonk G.M., Teichner S.J., Germain J.E.Z. Amsterdam: Elsevier, 1983. P. 251–255.
8. Khoohiar S.J. // J. Phys. Chem. 1964. V. 68. P. 411–413.
9. Sinfelt J.H., Luchesi P.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. P. 3365–3367.
10. Миначев Х.М., Детьюк А.Н., Дмитриев Р.В., Слюняев П.И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 12. С. 2678–2682.
11. Лунин В.В., Асхабова Х.Н., Романовский Б.В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 250. С. 896–898.
12. Levy R.B., Boudart M. // J. Catal. 1974. V. 32. P. 304–314.
13. Keren E., Soffer A. // J. Catal. 1977. V. 50. P. 43–55.
14. Braunschweig Th., Roland U., Winkler H. // Stud. Surf. Sci. Catal. 1993. V. 17. P. 53–62.
15. Sotoni N., Eda K., Kunitomo M. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1990. V. 86. P. 1583–1588.
16. Fleisch T., Aberman R. // J. Catal. 1977. V. 50. P. 268–278.
17. Розанов В.В., Крылов О.В. // Успехи химии. 1997. Т. 66. С. 1–27.
18. Conner W.C. // Stud. Surf. Sci. Catal. 1993. V. 77. P. 61–68.

19. Teichner S.J. // Appl. Catal. 1990. V. 62. P. 1–10.
20. Willey R.J., Teichner S.J., Pajonk G.M. // J. Mol. Catal. 1992. V. 77. P. 201–214.
21. Corma A. // Chem. Rev. 1995. V. 95. P. 559–614.
22. Stumbo A.M., Grande P., Delmon B. // Studies in Surface Science and Catalysis. 1997. V. 112. P. 211–220.
23. Roessner F., Roland U., Braunschweig T. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1995. V. 91. P. 1536–1545.
24. Stumbo A.M., Grande P., Delmon B. // Stud. Surf. Sci. and Catalysis. 1997. V. 112. P. 211–220.
25. Yang M., Nakamura I., Fujimoto K. // J. Applied Catal. General. 1996. V. 144. P. 221–235.
26. Yanyong Liu, Gaku Koyano, Makoto Misono // Topics in Catalysis. 2000. V. 11/12. P. 239–246.
27. Fujimoto K., Tomishige K., Okabe A. // Applied Catalysis A: General. 2000. V. 194–195. P. 383–393.
28. Kusakari T., Tomishige K., Fujimoto K. // Applied Catalysis A: General. 2002. V. 224. P. 219–228.
29. Stumbo A.M., Grange P., Delmon B. // Stud. Surf. Sci. Catal. 1996. V. 101. P. 97–106.
30. Ebitani K., Tsuji J., Hattori H., Kita H. // J. Catal. 1992. V. 135. P. 609–617.
31. Tanaka T., Ehilani K., Hattori H., Yoshida S. // Stud. Surf. Sci. And Catalysis. 1993. V. 77. P. 285–288.
32. Aimoto K., Fujimoto K., Maeda K. // Stud. Surf. Sci. Catal. 1993. V. 77. P. 165–169.
33. Kikuchi E., Matsuda T. // Stud. Surf. Sci. Catal. 1993. V. 77. P. 53–60.
34. Gutsze A., Roland U., Karger H.G. // Stud. Surf. Sci. and Catalysis. 1997. V. 112. P. 417–424.
35. Holmberg M., Lundström I. // J. Appl. Surf. Sci. 1996. V. 93. P. 67–76.
36. Stoica M., Caldararu M., Capritza A., Ionescu N.I. // J. React. Kinet. Catal. Lett. 1996. V. 57. P. 81–86.
37. Roessner F., Roland U. // J. Mol. Catal. A: Chem. 1996. V. 112. P. 401–412.
38. Roland U., Braunschweig T., Roessner F. // J. Mol. Catal. A: Chem. 1997. V. 127. P. 61–84.
39. Franke M.E., Simon U., Roessner F., Roland U. // Applied Catalysis A: General. 2000. V. 202. P. 179–182.
40. Roland U., Winkler H., Bauch H., Steinberg K.H. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1991. V. 87. P. 3921–3924.
41. Ярославцев А.Б. // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 449–455.
42. Кошелева Л.С. // Изв. АН. Сер. хим. 1995. № 2. С. 236–240.
43. Roland U., Salzer R., Stolle S. // Stud. Surf. Sci. and Catalysis. 1994. V. 84. P. 1231–1238.
44. Dariusz Lomot, Zbigniew Karpinski // Catalysis Lett. 2000. V. 69. P. 133–138.
45. Pang Y.-W., Dalmond B. // J. Molec. Catal. 2001. V. 169. P. 259–268.
46. Золотарев Ю.А., Козик В.С., Зайцев Д.А., Дорохова Е.М., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. С. 1146–1151.
47. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Zaitsev D.A., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // J. Radioanal. Nucl. Chem. Art. 1992. V. 162. P. 3–14.
48. Zolotarev Yu.A., Tatur V.Yu., Zaitsev D.A., Myasoedov N.F. / US Pat. 5026909. 1988.
49. Золотарев Ю.А., Зайцев Д.А., Мясоедов Н.Ф. // Авт. свид. СССР № 4306114/31–04 19.04, 1988.
50. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Dorokhova E.M., Zaitsev D.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // Proceedings of the Fours Intern. Symp. “Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds” / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Amsterdam: Elsevier, 1992. P. 687–692.
51. Zolotarev Yu.A., Myasoedov N.F., Zaitsev D.A., Lubnin M.Yu., Tatur V.Yu., Kozic V.S., Dorochova E.M., Rozenberg S.G. // Radioisotopy. 1990. V. 31. P. 110–115.
52. Zolotarev Yu.A., Davankov V.A. // J. Chromatogr. 1978. V. 155. P. 285–293.
53. Zolotarev Yu.A., Myasoedov N.F., Penkina V.I., Petrenik O.V., Davankov V.A. // J. Chromatogr. 1981. V. 207. P. 231–236.
54. Zolotarev Yu.A., Zaitsev D.A., Dorochova E.M., Myasoedov N.F. // J. Radioanal Nucl. Chem. Art. 1988. V. 121. P. 469–478.
55. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Zaitsev D.A., Myasoedov N.F. // Proceedings of the Fours Intern. Symp. “Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds” / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Amsterdam: Elsevier, 1992. P. 494–497.
56. Rozenberg S.G., Zaloznikh V.M., Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Myasoedov N.F. // J. Radioanal Nucl. Chem. Lett. 1991. V. 149. P. 247–253.
57. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Dorochova E.M., Myasoedov N.F. // J. Labelled Comp. 1992. V. 31. P. 71–75.
58. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Zaitsev D.A., Dorochova E.M., Myasoedov N.F. // J. Labelled Comp. 1991. V. 29. P. 507–517.
59. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Розенберг С.Г., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 9. С. 1611–1617.
60. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Velikodvorskaia G.A., Neumivakin L.V., Zverlov V.V., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1995. V. 8. P. 353–365.
61. Rozenberg S.G., Zolotarev Yu.A., Myasoedov N.F. // Proceedings of the Fours Intern. Symp. “Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds” / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Amsterdam: Elsevier, 1992. P. 506–509.
62. Rosenberg S.G., Zolotarev Yu.A., Myasoedov N.F. // J. Amino Acid. 1992. V. 3. P. 95–104.
63. Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1996. № 7. С. 1852–1854.
64. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Козик В.С., Дорохова Е.М., Розенберг С.Г., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 4. С. 757–762.

65. *Kozic V.S., Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F.* // Proceedings of the Third Intern. Symp. "Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds" / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Amsterdam: Elsevier, 1989. P. 513–516.
66. *Zolotarev Yu.A., Kozik V.S., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F.* // Proceedings of the Fourth Intern. Symp. "Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds" / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Amsterdam: Elsevier, 1992. P. 498–501.
67. *Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F.* // J. Labelled Comp. 1991. V. 29. P. 997–1007.
68. *Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Козик В.С., Дорохова Е.М., Розенберг С.Г., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф.* // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 10. С. 1820–1823.
69. *Eller M., Zaitsev D., Fransson B., Jarv J., Myasoedov N., Ragnarsson U.* // Bioorg. Chem. 1992. V. 20. P. 245–250.
70. *Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F.* // Amino Acids. 2003. V. 24. P. 325–333.
71. *Navolotskaya E.V., Kovalitskaya Yu.A., Zolotarev Yu.A., Kudryashova N.Yu., Goncharenko E.N., Kolobov A.A., Kampe-Nemm E.A., Malkova N.V., Yurovsky V.V., Lipkin V.M.* // Peptides. 2003. V. 24. P. 1941–1946.
72. *Золотарев Ю.А., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Васильковский Б.В., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А.* // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 234–240.
73. *Долотов О.В., Золотарев Ю.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 241–246.
74. *Розенберг С.Г., Залозных В.М., Золотарев Ю.А., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 715–717.
75. *Розенберг С.Г., Залозных В.М., Золотарев Ю.А., Зайцев Д.А., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 858–861.
76. *Шишков А.В., Филатов Э.С., Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Гольданский В.И., Несмеянов А.Н.* // Докл. АН СССР. 1976. Т. 228. С. 1237–1239.
77. *Шишков А.В., Баратова Л.А.* // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 825–841.
78. *Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 12892–12897.
79. *Shishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Zhirnov O.P., Galkin A.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 7827–7830.
80. *Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Филатов Э.С., Шишков А.В.* // Химия выс. энергий. 1978. Т. 12. С. 8–10.
81. *Баратова Л.А., Румянцев Ю.М., Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Цырякин В.А., Шишков А.В.* // Химия выс. энергий. 1981. Т. 15. С. 370–373.
82. *Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Мясоедов Н.Ф.* // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 3. С. 407–409.
83. *Roothaan C.C.J.* // Rev. Mod. Phys. 1951. V. 23. P. 69–78.
84. *Fleisch T., Aberman R.* // J. Catal. 1977. V. 50. P. 268–278.
85. *Yamabe S., Osamura Y., Minato T.* // J. Amer. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 2268–2273.
86. *Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 1999. № 8. С. 1448–1452.
87. *Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Мясоедов Н.Ф.* // Изв. АН. Сер. хим. 1998. № 8. С. 1487–1490.
88. *Evleth E.M., Kassab E., Sierra L.R.* // J. Phys. Chem. 1994. V. 98. P. 1421–1426.
89. *Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F.* // J. Phys. Chemistry A. 1999. V. 103. P. 4861–4864.
90. *Frisch M.J., Head-Gordon M., Pople P.v.R.* // Chem. Phys. Lett. 1990. V. 166. P. 275–282.
91. *Woon D.E., Dunning T.H.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 1358–1371.
92. *Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А.* // Журн. физ. химии. 2002. Т. 76. С. 727–731.
93. *Золотарев Ю.А., Борисов Ю.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 1999. № 6. С. 1051–1055.
94. *Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F.* // Proceedings of the Sixth Intern. Symp. "Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds" / Eds J.R. Heys, D.G. Melillo. New York: Wiley, 1997. P. 653–656.
95. *Зайцев Д.А., Золотарев Ю.А., Мясоедов Н.Ф.* // Докл. АН. 1990. Т. 313. С. 619–622.
96. *Klimova O.A., Zolotarev Yu.A., Chebotarev V.Yu.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 195. P. 758–761.
97. *Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Dorokhova E.M., Vtyurin N.N., Kozik V.S., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F.* // Proceedings of the Eighth Intern. Symp. "Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds". Boston, USA. 2003 (in press).
98. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Васильковский Б.В., Кост Н.В., Гаранин С.К., Макаренкова В.П., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 512–515.
99. *Золотарев Ю.А., Бочаров Э.В., Дадаян А.К., Кашеверов И.Е., Жмак М.Н., Масленников И.В., Борисов Ю.А., Арсеньев А.С., Мясоедов Н.Ф., Цетлин В.И.* // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 587–592.
100. *Koradi R., Billeter M., Wuthrich K.* // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
101. *Maslennikov I.V., Sobol A.G., Gladky K.V., Lugovskoy A.A., Ostrovsky A.G., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Arseniev A.S.* // Eur. J. Biochem. 1998. V. 254. P. 238–247.
102. *Balashova T.A., Shenkarev Z.O., Tagaev A.A., Ovchinnikova T.V., Raap J., Arseniev A.S.* // FEBS Lett. 2000. V. 466. P. 333–336.
103. *Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Dorokhova E.M., Kozik V.S., Vtyurin N.N., Bocharov E.V., Ziganshin R.N., Lunina N.A., Kostrov S.V., Ovchinnikova T.V., Myasoedov N.F.* // Bioorg. Chem. 2003. V. 31. P. 453–463.

Solid Phase Isotope Exchange with Spillover Hydrogen in Amino Acids, Peptides, and Proteins

Yu. A. Zolotarev^{##}, A. K. Dadayan^{*}, and Yu. A. Borisov^{**}

[#]Phone: +7 (095) 196-0213; fax: +7 (095) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru

^{*}Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

^{**}Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

We summarize here information on the theoretical and experimental study of high-temperature (150–200°C) solid phase catalytic isotope exchange (HTSPCIE) carried out with amino acids, peptides, and proteins under the action of spillover hydrogen. Main specific features of the HTSPCIE reaction, its mechanism, and its use for studying spatial interactions in polypeptides are discussed. A virtually complete absence of racemization makes this reaction a valuable preparative method. The main regularities of the HTSPCIE reaction with the participation of spillover tritium have been revealed in the case of peptides and proteins, and the dependence of reactivity of peptide fragments on the spatial organization of their molecules has been studied. An important peculiarity of this reaction is that HTSPCIE proceeds at 150–200°C with a high degree of chirality retention in amino acids and peptides. This is provided by its reaction mechanism, which consists in a synchronous one-center substitution at the saturated carbon atom characterized by the formation of pentacoordinated carbon and a three-center bond between the carbon and the incoming and outgoing hydrogen atoms. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: amino acids, isotope hydrogen exchange, peptides, proteins, quantum chemical calculations, solid phase reactions, spillover hydrogen