



УДК 547.29:546.11.3

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПИДОВ, МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ,
ГЕТЕРОГЕННЫМ КАТАЛИТИЧЕСКИМ ИЗОТОПНЫМ ОБМЕНОМ
С ГАЗООБРАЗНЫМ ТРИТИЕМ В РАСТВОРЕ

I. ВКЛЮЧЕНИЕ [³H] МЕТКИ В МЕТИЛОВЫЕ ЭФИРЫ НАСЫЩЕННЫХ
ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Бергельсон Л. Д.

*Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Оптимальными условиями для введения тритиевой метки в метиловые эфиры насыщенных жирных кислот являются: использование в качестве катализатора палладия на сульфате бария при молярном отношении вещество — палладий (1:2) в диоксиде при возможно высоком давлении газообразного трития, при 37° в течение 4–6 ч.

Меченные тритием липиды находят все более широкое применение в исследованиях биологических мембран и липидного метаболизма. В последнее время потребность в меченых липидных препаратах еще больше возросла в связи с попытками использовать фосфолипидные липосомы в качестве носителей для введения в организм различных фармацевтических и ферментных препаратов и генетического материала. Ввиду сложной структуры и лабильности молекул липидов целесообразно проводить получение меченых липидных препаратов в два этапа: сначала ввести требуемую метку в молекулу жирной кислоты химическим путем, а затем использовать их в качестве исходных соединений для построения молекул соответствующих липидов химическими, ферментативными или биосинтетическими методами.

В литературе имеется ряд работ, посвященных препаративному синтезу радиоактивно меченых жирных кислот и алифатических спиртов [1–9]. Для получения ³H-меченых жирных кислот с достаточно высокой удельной активностью наиболее целесообразным, на наш взгляд, является метод гетерогенного каталитического изотопного обмена в растворе. При использовании этого метода удельная радиоактивность продуктов сильно зависит от условий проведения реакции изотопного обмена. В настоящем сообщении приведены данные, полученные при отработке оптимальных условий введения тритиевой метки в метиловые эфиры насыщенных жирных кислот.

Введение ³H-метки в метиловые эфиры жирных кислот проводили в диоксиде, так как ранее было отмечено [10], что водородные атомы насы-

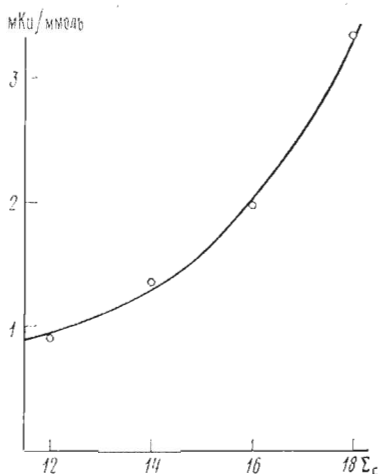


Рис. 1

Рис. 1. Влияние длины жирнокислотной цепи на изотопный обмен

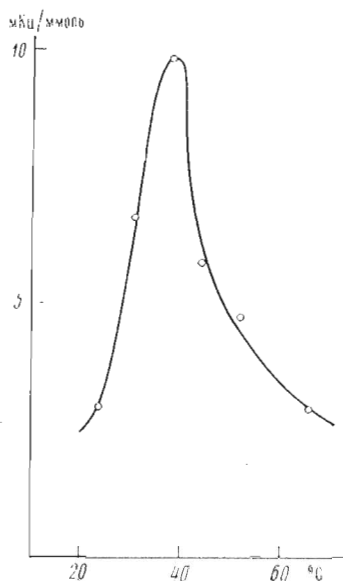


Рис. 2

Рис. 2. Влияние температуры на изотопный обмен в метилом эфире стеариновой кислоты

ценных алифатических цепей относительно мало обмениваются в условиях гетерогенного каталитического изотопного обмена с газообразным тритием. Для реакции изотопного обмена были использованы метиловые эфиры стеариновой (C_{18}), пальмитиновой (C_{16}), миристиновой (C_{14}) и лауриновой (C_{12}) кислот.

Как видно из рис. 1, наибольшее включение наблюдалось в случае метилстеарата, что, по-видимому, связано с вероятностным характером процесса обмена. В дальнейшем оптимальные условия реакции отработывали именно на этом соединении. Как показали предварительные кинетические исследования, время установления стационарного состояния колеблется в зависимости от температуры проведения эксперимента от 2 до 4 ч. Поэтому все последующие опыты по изучению зависимости удельной активности от условий эксперимента проводили в течение 5 ч. При этом было исследовано влияние на изотопный обмен ряда факторов.

Природа катализатора. Обмен проводили с палладиевыми, родиевыми, рутениевыми и платиновыми катализаторами на различных носителях (табл. 1). Наиболее эффективным оказался палладий на сульфате бария. Высокие значения удельной активности были получены также при использовании рутения и родия на угле.

Молярное соотношение катализатор — вещество. Кривая зависимости степени изотопного обмена от количества палладиевого катализатора носит S-образный характер: до соотношения палладий — вещество $\sim 0,61$ выход радиоактивного соединения медленно увеличивался, далее при соотношении от 0,6 до 1,0 следовало резкое увеличение включения трития, при дальнейшем увеличении количества катализатора включение замедлилось и при соотношении около 2,0 наблюдалось насыщение.

Природа растворителя. Обмен проводили в гидроксилсодержащих и апротонных растворителях (табл. 2). Максимальный обмен наблюдался в диоксане.

Таблица 1

| Катализатор | | Уд. акт. препарата, мКи/ммоль | Катализатор | | Уд. акт. препарата, мКи/ммоль |
|--------------------------------------|-------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------------|
| тип | навеска, мг | | тип | навеска, мг | |
| 5% Pd/BaSO ₄ | 12,9 | 3,17 | 5% Ru/C | 13,4 | 2,05 |
| 10% Pd/CaCO ₃ | 7,1 | 1,79 | 5% Ru/Al ₂ O ₃ | 13,0 | 0,21 |
| 5% Rh/Al ₂ O ₃ | 12,4 | 0,54 | 5% Pt/BaSO ₄ | 25,4 | 0,26 |
| 5% Rh/C | 13,7 | 2,80 | PtO ₂ | 1,3 | 0,39 |
| 5% Pd/C | 13,7 | 1,12 | | | |

Таблица 2

| Навеска, мг 5% Pd/BaSO ₄ | Растворитель | Уд. акт. препарата, мКи/ммоль |
|--|--|-------------------------------|
| 12,9 | MeOH | 1,56 |
| 13,7 | MeOH-NH ₄ OH (10:1) | 1,55 |
| 13,3 | CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH (65:25:4) | 0,39 |
| 12,9 | Диоксан | 2,86 |

Таблица 3

| Навеска, мг 5% Pd/BaSO ₄ | Давление тритий-водородной смеси, мм рт. ст. | Уд. акт. (τ 8 ч), мКи/ммоль |
|--|--|-----------------------------|
| 12,7 | 600 | 3,78 |
| 11,8 | 300 | 3,09 |
| 11,5 | 150 | 1,28 |

Температура и давление. При увеличении давления удельная активность возрастает (табл. 3); как видно из рис. 2, кривая зависимости удельной активности от температуры имеет максимум в интервале 36—38°.

Результаты настоящей работы позволяют рекомендовать следующие оптимальные условия для введения тритиевой метки в метилстеарат: использование в качестве катализатора палладия на сульфате бария, в диоксане в течение 4—6 ч при 37° и возможно более высоком давлении газообразного трития.

Экспериментальная часть

Все опыты с газообразной смесью трития и водорода (отношение 1:1000) проводились на установке, изображенной на схеме, в диапазоне рабочих давлений от 0 до 600 мм рт. ст. (если в условиях эксперимента давление не оговорено, опыты проводились при 300 мм рт. ст.). Реакционные сосуды снабжены магнитной мешалкой, использованы ампулы двух типов: для снятия кинетических кривых с силиконовой прокладкой и без нее. Пробы по 3 мкл отбирали микрошприцем, наносили на пластинку (Silufol, СССР). Для удаления лабильного трития образовавшиеся пятна обрабатывали 5 мкл метилового спирта, после чего пластинки высушивали в течение 1 ч и проявляли в бензоле. После высушивания (1 ч) вырезали полосу, содержащую радиоактивное вещество (R_f 0,8—0,9), переносили ее во флакон, заполненный сцинтилляционной жидкостью, оставляли на 1 ч и проводили измерение радиоактивности. Катализаторы, растворители и метиловые эфиры жирных кислот приготавливали и очищали обычными методами; чистоту метиловых эфиров жирных кислот контролировали с помощью газожидкостной хроматографии (хроматограф Pye-Unicam (Анг-

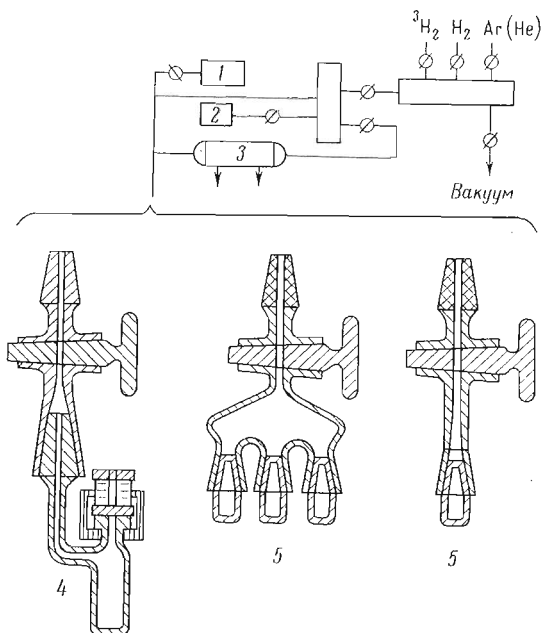


Схема установки для работы с разбавленным тритием. 1 — манометрическая лампа (ВТ-2), 2 — шильфонный насос, 3 — датчик давления, 4 — ампула для кинетических исследований изотопного обмена, 5 — ампулы для проведения процесса

лия), 5% SE=30 на хромосорбе N-AW (75—90 меш); 215°; газ-носитель — гелий (60 мл/мин)).

Реакцию изотопного обмена проводили следующим образом: в ампулу помещали 0,1 мл раствора, содержащего 3,8 мкмоль соответствующего метилового эфира жирной кислоты (в ампулу для кинетических исследований вводили 0,2 мл раствора), вносили необходимое количество соответствующего катализатора (сведения о количестве и природе применяемых катализаторов приведены в таблицах), ампулу замораживали в жидком азоте, откачивали до 0,05 мм рт. ст. и заполняли тритий-водородной смесью до заданного давления, размораживали ампулу и устанавливали ее на магнитную мешалку, помещенную в термостатированный шкаф. За исключением кинетических исследований, опыты проводились в течение 5 ч при 23°, что обеспечивало установление стационарного состояния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dutton H. J., Jones E. P., Scholfield C. R., Chorney W., Scully N. J. (1961) *J. Lipid Res.*, 2, 63—67.
2. Hulanicka D., Erwin J., Bloch K. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2778—2787.
3. Pothoheld S. (1966) *Advan. Tracer Methodology*, 3, 28—241.
4. Stoffel W., Wolf G. D. (1966) *Z. Phys. Chem.*, 347, 94—101.
5. Tenny K. S., Gupta S. C., Nystrom R. F., Kummer F. A. (1963) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40, 172—177.
6. Stoffel W., Kahlke W. (1965) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 19, 33—37.
7. Osbond J. M. (1966) *Progr. Chem. Fats Other Lipids*, 9, 119—123.
8. Stoffel W. (1964) *Proceedings of the Conference on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules. EUR*, 1625, 843—855.
9. Snyder F., Piantadosi C. (1966) *Advan. Lipid Res.*, 4, 257—273.
10. Hanus J., Gerny B., Benea J. (1974) *J. Label. Compounds*, 10, 523—531.

Поступила в редакцию
10.XI.1978

PREPARATION OF TRITIUM-LABELED LIPIDS BY HETEROGENIC CATALYTIC
ISOTOPE EXCHANGE WITH GASEOUS TRITIUM IN SOLUTION
I. [³H]LABELING OF SATURATED FATTY ACID METHYL ESTERS

SHEVCHENKO V. P., MYASOEDOV N. P., BERGELSON L. D.

*Institute of Molecular Genetics and M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The optimal conditions for the [³H]labeling of the saturated fatty acid methyl esters are the following: use of palladium on barium sulphate as a catalyst at a compound/palladium mole ratio of 1:2, dioxane, 4-6 hr at 37°, and at maximally possible pressure of gaseous tritium.
