

УДК 577.15.035

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
ДЕЙСТВИЕМ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ*Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С.*

Рассмотрены методы атомизации газообразного трития с помощью термической диссоциации или под воздействием высокочастотного разряда, реакции атомарного трития и его использование для получения меченых органических соединений. Особое внимание уделено меченым биологически активным соединениям.

Библиография — 114 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1125
II. Получение атомарного трития методом высокочастотной активации	1127
III. Получение атомов трития при термической диссоциации T_2	1129
IV. Реакции атомарного водорода	1131
V. Препаративное получение меченых соединений методами термической и высокочастотной активации газообразного трития	1133

I. ВВЕДЕНИЕ

Использование изотопных методов оказало весьма существенное влияние на развитие целого ряда отраслей науки и техники, причем в химии, биологии и областях, лежащих на стыке этих двух наук — биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии — применение изотопов, безусловно, оказалось особенно плодотворным.

Хотя соединения, меченные изотопами органогенов, являются инструментами изотопного метода как в органической химии, так и в биологических дисциплинах, требования, предъявляемые к ним, в большинстве случаев значительно отличаются. При исследовании механизмов реакций органических соединений интересуются прежде всего положением метки в молекулах исходных и образующихся веществ; концентрации же этих веществ, как правило, достаточно велики. Поэтому здесь используются специфично меченые (т. е. меченные по определенному атому) соединения, молярная радиоактивность которых не слишком велика.

В биохимии, молекулярной биологии и биоорганической химии изотопный метод получил наибольшее распространение как метод качественного и количественного анализа, высокая чувствительность которого особенно важна потому, что она дает возможность надежно определять вещества при концентрациях, близких к тем, при которых проявляется их биологическая активность. Поскольку чувствительность метода однозначно связана с величиной молярной радиоактивности (a) меченого соединения, в последнее время четко обозначилась тенденция использовать тритийсодержащие соединения вместо их аналогов, меченных углеродом-14 (при введении одного атома T в молекулу достигается значение $a \sim 30$ Ки/ммоль по сравнению с 0,064 Ки/ммоль для ^{14}C), а также применять наряду с соединениями, специфично мечеными тритием кратно-меченые (меченные более, чем в одном положении молекулы), неопределенно-меченые (с неизвестным точно распределением атомов T в молекуле) и обще-меченые (меченные по всем возможным положениям) соединения. Все это дает возможность повысить величину a до 100—200 (а иногда и более) Ки/ммоль. Используя некоторые другие радиоактивные изотопы органогенов — ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , можно достичь еще более высоких значений a ; однако эти изотопы, в отличие от T и

^{14}C , не являются универсальными для органических соединений, что, разумеется, сужает сферу их применения.

Другие преимущества трития перед ^{14}C — его более мягкое β -излучение, возможность введения тритиевой метки обменными методами, а также значительно меньшая стоимость меченных тритием соединений.

Таким образом, значение тритийсодержащих соединений в качестве инструментов исследования особенно велико для биологии и смежных дисциплин, и разработка методов введения тритиевой метки в органические соединения (в первую очередь в сложные молекулы биополимеров) чрезвычайно актуальна. Для получения соединений, меченных тритием, используются химические (синтез), биологические (биосинтез, ферментативные реакции) и обменные (изотопный обмен) методы [1, 2]. Следует, однако, иметь в виду, что для целого ряда сложных органических соединений химический синтез либо вообще до настоящего времени не описан, либо его осуществление в изотопном варианте оказывается практически невозможным. Биосинтез также возможен далеко не во всех случаях, часто он не позволяет достичь необходимых величин a и связан со значительными трудностями при выделении и очистке получающихся продуктов.

Важные преимущества обменных методов — их универсальность, одностадийность («экспрессность») и то, что они не требуют наличия соответствующих предшественников и дают возможность вводить тритий непосредственно в «готовую» молекулу. Обменные методы подразделяются на каталитические (см. обзор [3]) и методы, которые можно назвать физическими. Под последними понимается замещение водорода на тритий в результате взаимодействия органических соединений с ионами или атомами трития, обладающими избыточной энергией (горячие атомы трития, атомарные пучки, активация газообразного трития собственным β -излучением или внешними факторами — ультрафиолетом, электрическим высоковольтным разрядом, микроволновым высокочастотным разрядом, термической диссоциацией).

По всей видимости, первый подобный метод — метод Вильцбаха [4], который практически сводится к выдерживанию вещества в атмосфере газообразного трития. Необходимые для заметного включения метки экспозиции были довольно длительными: от нескольких суток до месяцев. Метод Вильцбаха отличается универсальностью, но его применение сопряжено с интенсивно протекающими процессами разложения вещества, образованием большого количества меченых побочных продуктов, низким коэффициентом использования трития. В последующие годы был предложен целый ряд усовершенствований метода Вильцбаха, однако принципиальных улучшений — снижения степени разложения вещества и повышения a — удалось достичь лишь при использовании в качестве основных реакционноспособных частиц активированных атомов трития.

Настоящий обзор посвящен именно этим методам активации газообразного трития — методу термической диссоциации и разрядным методам (в основном микроволновый разряд в ВЧ- и СВЧ-диапазонах), которые будут обозначаться ниже как МТА (метод термической активации) и МВЧА (метод высокочастотной активации). Оба метода весьма интенсивно изучались и совершенствовались за последние годы, но данные, относящиеся к ним, обобщаются впервые. К их преимуществам относятся подлинная экспрессность (продолжительность экспозиции 0,25—60 мин), универсальность и возможность во многих случаях (это, прежде всего, относится к МТА) снизить расход трития в одном эксперименте до нескольких десятков мкюри. Последнее обстоятельство весьма важно, так как позволяет проводить работу в радиоизотопных лабораториях III класса, не требующих специального сложного защитного оборудования.

Тенденция же развития при использовании радиоизотопных методов в биологических дисциплинах может быть сформулирована так: требуется все больше разнообразных меченых соединений все более сложной

структуры во все меньших количествах, но с высокой молярной радиоактивностью. Поэтому коммерческое производство таких соединений, включающее разработку индивидуальных методов очистки, хранения и анализа, становится все более сложным и дорогостоящим. Наиболее привлекательный выход из создавшегося положения состоит, очевидно, в создании дешевого, надежного, универсального и экспрессного лабораторного метода введения метки¹; МВЧА и в особенности МТА представляются нам подходящими кандидатами на роль такого лабораторного метода.

Ниже рассмотрены механизмы процессов, приводящих к включению в соединение метки при действии атомарного трития и методические вопросы, связанные с практической реализацией МТА и МВЧА. Метод Вильцбаха и его модификации в настоящий обзор не входят, поскольку они, во-первых, уже подробно рассматривались ранее (см., например, обзоры [1, 5]), а во-вторых, в большинстве случаев участие атомов трития в этих реакциях достоверно не доказывалось. Однако они, а также результаты экспериментов с атомными пучками [6] и данные по химии горячих атомов трития [1, 7], будут использованы в той мере, в какой необходимо для сравнения результатов и анализа теоретических основ МТА и МВЧА.

II. ПОЛУЧЕНИЕ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ АКТИВАЦИИ

Тот факт, что плазма микроволнового разряда содержит высокие концентрации атомарного водорода в различных возбужденных и ионизованных состояниях, известен довольно давно, и на этом основано использование разряда в ВЧ- или СВЧ-диапазоне в качестве источника водородных атомов и ионов в ускорительной технике и в качестве источника резонансного ультрафиолетового излучения.

В 1960 г. появилось, по-видимому, первое сообщение [8] об использовании ВЧ-разряда для получения меченых соединений. Позже было показано [9, 10], что введение метки обусловлено тритий-водородным обменом, протекающим с участием атомов трития. Наилучшие результаты достигаются при возбуждении разряда не в чистом водороде, а при разбавлении водорода гелием: интенсивности молекулярных полос в спектре испускания уменьшаются и возрастает интенсивность линии атомарного водорода при 121,6 нм, которая при частоте 40 МГц становится единственной в смеси, содержащей 99% гелия [11]. Внесение в область разряда металлических электродов приводит к загрязнению плазмы вследствие распыления материала электродов, а кроме того, заметно уменьшает выход атомов водорода за счет их рекомбинации на металлических поверхностях. Этого недостатка лишены источники с безэлектродным разрядом, т. е. установки, в которых разрядная трубка, содержащая рабочий газ (тритий или смеси трития с инертным газом), помещается в высокочастотное поле, создаваемое внешними электродами.

Обычно используются источники двух типов — с возбуждением разряда в области высоких (десятки и сотни МГц) и сверхвысоких (тысячи МГц) частот. Оба разряда отличаются друг от друга как по условиям существования устойчивой плазмы, так и по аппаратному оформлению. В ВЧ-диапазоне разряд возбуждается при относительно низких давлениях (10^{-2} — 10^{-3} мм рт. ст.), его характеристики существенно зависят от чистоты используемых газов и всей аппаратуры, особенно частей, расположенных в зоне разряда; интенсивность получаемого пучка атомов при ВЧ-разряде обычно на два-три порядка ниже, чем при использовании СВЧ-диапазона. Разряд с частотой 2450 МГц возбуждает-

¹ При введении метки в сложные биологические объекты важно обеспечить возможность непосредственного контакта исполнителя с исследователем, знакомым с приемами работы с данным конкретным соединением; это легко реализовать, если процесс получения меченого препарата осуществляется здесь же в лаборатории.

ся при давлении рабочего газа 1—5 мм рт. ст. и получаемый пучок имеет интенсивность $\sim 10^{14}$ — 10^{15} ат/см²·с; характеристики разряда меньше зависят от наличия примесей, однако конструкция установки в этом случае более сложна. На рис. 1 показана принципиальная схема установки для получения атомов водорода (третия) с источником возбуждения в области 40 МГц. На такой установке было продемонстрировано [12], что выход основного меченого продукта — материнского соединения — практически не зависит (для бесконечно толстой мишени) от энергии падающих частиц в диапазоне 0,5—5,0 КэВ.

Введение метки возможно не только с нейтральным атомным пучком, но и с ионами трития T^+ . При этом на первом этапе происходит перезарядка: $T^+ + RH \rightarrow T^* + RH^*$ (звездочкой обозначено возбужденное состояние), и сам процесс включения метки происходит с участием ней-

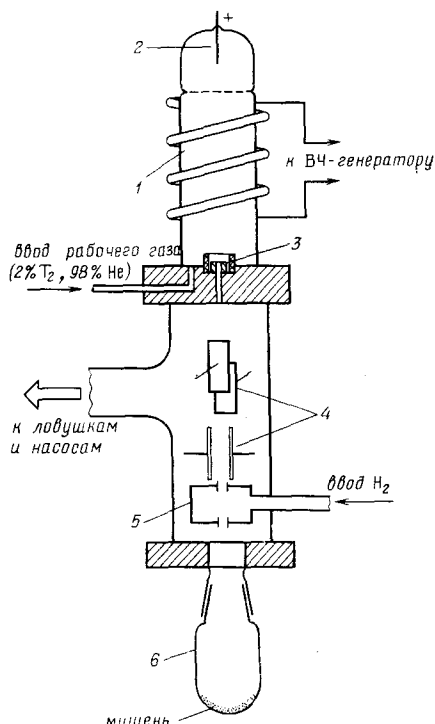


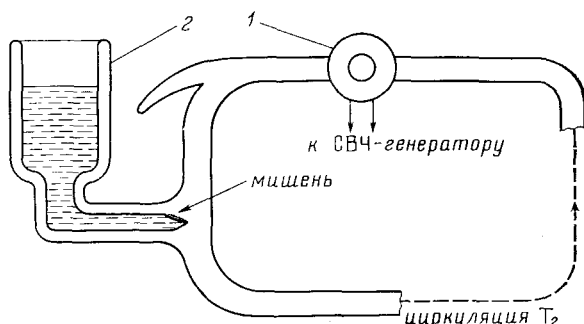
Рис. 1. Установка для получения быстрых атомов трития путем перезарядки атомарных ионов: 1 — ионный источник с кольцевым безэлектродным разрядом (40 МГц); 2 — ускоряющий электрод; 3 — фокусирующий электрод; 4 — отклоняющие пластины; 5 — камера перезарядки, 6 — съемный сосуд для мишени

трального атома. Образование возбужденных состояний обусловлено тем, что условия перезарядки отличны от резонанса. Процессы термализации быстрого иона и перезарядки сопровождаются возбуждением молекул среды, по своему характеру сходным с получающимся при радиационном воздействии. Это может приводить к деструкции вещества, не наблюдаемой в случае нейтральных частиц, как было достаточно убедительно продемонстрировано на примере сравнения воздействия на мишень пучков атомов и ионов гелия с одинаковыми кинетическими энергиями [12]. Для получения меченых соединений установка может быть существенно упрощена [13]: вместо системы фокусирующих пучок электродов и камеры перезарядки используется узкий вытягивающий канал, находящийся под потенциалом земли, который размещается в торце источника и экранирован от воздействия плазмы. Форма вытягивающего электрода-канала подбирается эмпирически так, чтобы обеспечить наилучшую фокусировку пучка; перезарядка атомарных ионов осуществляется, в основном, в самом источнике и в канале электрода. Мишень располагается на небольшом удалении от источника, и интенсивность пучка частиц достаточно велика.

Источник атомарного водорода с СВЧ-возбуждением использовался для получения меченных тритием препаратов [10]. Высокое давление в системе и значительное расстояние между источником и мишенью при-

водили к тому, что энергия вступающих во взаимодействие атомов была невелика и соответствовала температуре стенок. Схема установки представлена на рис. 2: использовался стандартный генератор 2450 МГц и стандартная же микроволновая ячейка. Установка подключалась к насосу, который обеспечивал с регулируемой скоростью непрерывную циркуляцию рабочего газа через зоны разряда и мишени. Мощность, выделяемая в разряде, довольно велика, и разряд сопровождался интенсивным излучением в видимой и ультрафиолетовой области, которое может вызывать фотохимическое разложение вещества; для защиты от последнего мишень располагалась вне поля «видимости» источника. В установках с ВЧ-разрядом интенсивность излучения в видимой области мала, и кроме того, лишь небольшая часть излучения может попадать на мишень, проходя через узкое отверстие (диаметром 1—2 мм) вытягивающего электрода. Как уже отмечалось, для устойчи-

Рис. 2. Принципиальная схема установки для введения метки с помощью атомов трития, генерируемых в СВЧ-разряде (2450 МГц): 1 — микроволновая ячейка; 2 — ловушка с жидким азотом для охлаждения мишени. Насос для циркуляции трития и система датчиков давления на схеме не показаны



вости СВЧ-разряда необходимо довольно значительное давление газа ~ 4 мм рт. ст., что при объеме установки 500 см^3 соответствует 1 Ки трития [10]. Преимуществом ВЧ-разряда является низкое давление (10^{-2} — 10^{-3} мм рт. ст.), что при таком же объеме соответствует всего расходу 1—10 мКи. Высокий коэффициент включения трития в мишень позволяет эксплуатировать установку с ВЧ-разрядом в условиях протока рабочего газа через зону разряда, при этом после насоса достаточно установить устойчиво для окисления трития и ловушку. В установках же с СВЧ-разрядом вследствие незначительного коэффициента включения трития в мишень, обусловленного низкой энергией атомов, приходится применять многократную циркуляцию газа, что требует включения дополнительного насоса и обеспечения лучшей геометричности установки. Кроме того, по мере протекания реакции происходит обогащение рабочего газа протием.

Что касается влияния на величину a различных параметров, то для меченого продукта значение a увеличивается при уменьшении толщины мишени или при увеличении экспозиции до 5 мин и не зависит от мощности разряда [10]. Увеличение расстояния от источника до мишени приводит к уменьшению выхода меченого продукта. Низкие энергии атомов трития обуславливают зависимость степени включения метки от температуры мишени — при переходе от 77 к 300 К величина a возрастает в ~ 5 раз, однако, одновременно увеличивается и степень деструкции вещества.

III. ПОЛУЧЕНИЕ АТОМОВ ТРИТИЯ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ T_2

Для того, чтобы молекулярный водород диссоциировал на атомы с заметной скоростью, необходимы высокие температуры ~ 2000 — 3000 К . Используемые же в технике молекулярных пучков так называемые печные источники позволяют нагревать газ до нескольких сотен градусов и, естественно, непригодны для получения атомарного водорода. Оригинальное и чрезвычайно простое техническое решение было найдено на основе обнаруженного еще Лэнгмюром [14] явления каталитической диссоциации водорода на нагретых металлических нитях. Основанные

на этом принципе источники довольно широко использовались в работах по исследованию реакций атомарного водорода с твердыми органическими веществами [15, 16]. Ряд авторов с целью повышения чувствительности использовал в своих исследованиях радиоактивный изотоп — тритий.

Результаты данных исследований легли в основу метода получения меченых препаратов. Первые эксперименты были проведены с сахарами [17], однако большой выход продуктов деструкции заставил усомниться в практической значимости метода. Основная причина первых неудач заключалась в использовании толстых мишеней, препятствующих отводу тепла из зоны реакции. Поверхность мишени существенно нагревалась как за счет поглощения светового излучения нити и теплопередачи через молекулярный газ, так и в результате реакций атомов трития с веществом. Если обеспечить эффективный теплоотвод, степень сохранения вещества достигает в отдельных случаях 100% [18].

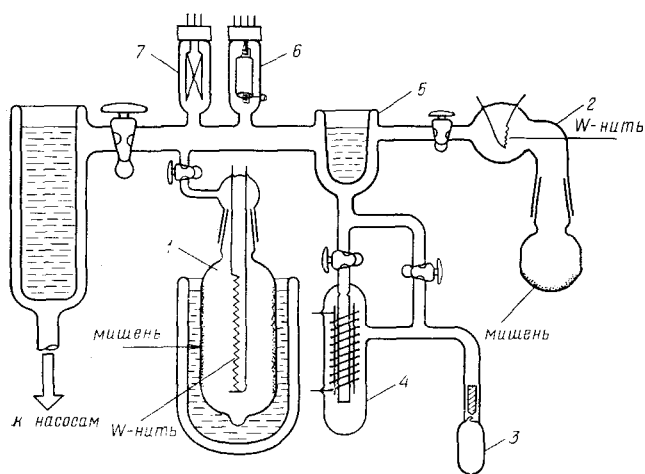


Рис. 3. Установка для получения меченых соединений с помощью термически активированных атомов трития: 1 — сосуд для мишени при введении метки в условиях прямого пролета; 2 — то же для введения метки в вещества, чувствительные к световому излучению; 3 — ампула с тритием, вскрываемая металлическим бойком; 4 — палладиевый натекаль для дозированного напуска трития; 5 — жидкоазотная ловушка для вымораживания конденсирующихся примесей; 6 и 7 — датчики для измерения давления (термопарный и ионизационный)

Используемые в таких экспериментах установки весьма просты (см. рис. 3) и представляют собой стеклянный баллон с впаянными в него электродами, на которых натянута металлическая (вольфрамовая) нить, нагреваемая электрическим током. В баллоне создают высокий вакуум и затем наполняют его тритием до нужного давления. Вещество-мишень наносится на внутренние стенки баллона, охлаждаемые жидким азотом или другими хладагентами, что необходимо для предотвращения попадания паров вещества на нить. Пленка мишени может быть получена испарением растворов или, что более удобно для биополимеров, лиофилизацией. Можно получать и замороженные пленки растворов, при этом надо, однако, учитывать возможное разрушение образца вследствие кристаллизации воды при замораживании. Нежелательных эффектов можно избежать, используя быстрое охлаждение мишени (для этого лучше использовать не жидкий азот, а другие хладагенты) или распыление раствора на предварительно охлажденные стенки. Хорошие результаты получаются при использовании пористых подложек (фильтровальной или хроматографической бумаги и т. п.). При этом значительно упрощается создание однородной пленки, повышаются химический и радиохимический выходы [19].

В большинстве случаев используются реакционные сосуды сравнительно небольшого объема, так как при этом для создания нужного давления (10^{-2} — 10^{-3} мм рт. ст.) требуется немного трития. В таких сосудах расстояние от нити до мишени составляет 3—4 см. В сосудах большего объема для твердых мишеней можно проводить эксперимент при комнатной температуре. Для предотвращения попадания прямого света на образец нить и мишень располагают под углом друг к другу.

В реактор тритий напускают через капилляры, высоковакуумные вентили тонкой регулировки и т. п. Лучше применять так называемые

палладиевые натекатели, в которых молекулярный водород диффундирует через палладиевую фольгу при повышенной температуре. Такой натекатель весьма удобен для дозирования и, кроме того, позволяет дополнительно очищать тритий. При наличии буферной емкости можно вообще обойтись без натекателя.

Условия введения метки мало отличаются для различных веществ. Оптимальные результаты получаются при температуре вольфрамовой нити 2000 К и включении нагрева на короткие промежутки времени (~ 15 с) с интервалами для охлаждения (20—30 с). Давление трития выбирают так, чтобы обеспечить пролет атомов от нити до мишени без столкновений с молекулами. Это связано с зависимостью скорости реакции замещения от энергии взаимодействующих частиц. При температуре нити 2000 К около 25% образующихся атомов имеют энергию, достаточную для вступления в реакцию. Условия свободного пробега для расстояния между нитью и мишенью ~ 3 см выполняются при давлении $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст. При нерекционных столкновениях атомов трития с молекулами мишени также происходит «охлаждение» атомов Т, в результате чего метка оказывается локализованной в тонком поверхностном слое, толщина которого составляет ~ 5 Å [20], и для достижения высоких значений a необходимо либо использовать тонкие пленки вещества, либо неоднократно повторять процесс, заново приготавливая пленку из уже обработанного вещества.

Повышение температуры вольфрамовой нити увеличивает долю реакционноспособных частиц в атомарном пучке. Можно показать, что

$$n_{\epsilon > \epsilon_0} = \frac{2n \sqrt{\epsilon_0}}{\sqrt{\pi} (kT)^{3/2}} \int_{\epsilon_0}^{\infty} e^{-\epsilon/kT} d\epsilon = \frac{2n \sqrt{\epsilon_0}}{\sqrt{\pi kT}} e^{-\epsilon_0/kT}$$

где $n_{\epsilon > \epsilon_0}$ — число атомов в пучке с энергией выше заданного предела ϵ_0 (энергии активации), n — общее число атомов в пучке.

С другой стороны, возрастает и скорость самого процесса образования атомов трития ($T_2 \rightarrow 2T$), для которого (см., например, [21]) было определено значение энергии активации, равное $51,8 \pm 1,0$ ккал/моль, т. е. половине энергии разрыва связи в молекуле водорода. Для практических целей можно пользоваться выражением для скорости атомизации

$$v_{ат} = A(p)^{1/2} \exp(-\epsilon/RT)$$

где $A = (1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{25}$ ат/см²·с·(мм рт. ст.)^{1/2} для вольфрама; $\epsilon = 51,8$ ккал/моль; p — давление водорода (трития), мм рт. ст.

Для более строгих расчетов в величину площади нити, вычисленную из геометрических размеров, следует ввести коэффициент шероховатости, который, согласно большинству оценок для вольфрама [22], равен 1,4. В описанных выше условиях при $T_{\text{нити}} \sim 2000$ К и давлении $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст. величина $v_{ат} = 2,9 \cdot 10^{19}$ ат/см²·с, поток атомов на мишень определяется величиной соответствующего телесного угла.

В установках описанного типа обычно удается в результате одного напуска трития получить препараты с общей активностью 5—10 мкюри, т. е. с $a = 10^3 \div 10^4$ мКи/г для миллиграммовых количеств вещества. Для биополимеров, например, для белков, это весьма высокая величина (~ 10 Ки/ммоль), которая удовлетворяет большинству требований. Важным преимуществом метода является незначительный расход трития, что позволяет проводить работу в радиоизотопных лабораториях любого класса.

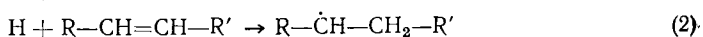
IV. РЕАКЦИИ АТОМАРНОГО ВОДОРОДА

Основной химической реакцией, протекающей при взаимодействии атомов водорода с насыщенными углеводородами, является отрыв атома водорода с образованием свободного радикала:



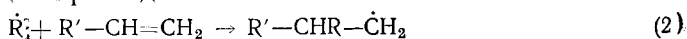
Энергия активации такого процесса составляет 6—8 ккал/моль [23].

Для ненасыщенных соединений с большой эффективностью должно протекать присоединение атомов водорода по кратной связи, также приводящее к образованию радикала:



Энергия активации этой реакции равна 1—2 ккал/моль. Так как в результате реакции выделяется энергия ~ 40 ккал/моль, то образующийся радикал оказывается возбужденным и может претерпевать различные превращения, например, изомеризоваться или распадаться с разрывом C—C- или C—H-связей. В случае функциональных производных углеводов спектр возможных реакций существенно расширяется.

Для получения меченых соединений, очевидно, важны не только первичные процессы, но и последующие превращения, приводящие к образованию меченого продукта. Судьба радикалов, образовавшихся по реакциям (1) или (2), в значительной степени зависит от условий эксперимента: фазового состояния вещества, температуры, химической природы молекул среды. Так, с ненасыщенными соединениями радикал может вступать в реакции присоединения

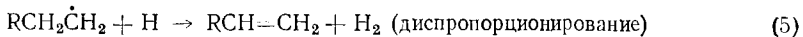
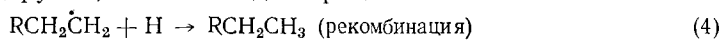


При цепных реакциях данного типа образуются высокомолекулярные продукты. Когда это разрешено энергетически, радикал может отрывать водород или другие атомы и группы атомов от молекул среды.

Все перечисленные реакции осуществляются как в газовой, так и в жидкой фазе, однако в последнем случае необходимо учитывать так называемый эффект клетки, который ограничивает взаимодействие радикалов друг с другом и увеличивает вероятность стабилизации возбужденных радикалов, но мало влияет на скорости реакций с участием легких атомов водорода.

При протекании реакций в твердой фазе различия становятся принципиальными: образовавшиеся радикалы заключены в матрицу, и их дальнейшая судьба зависит от ее свойств. В «мягкой» матрице диффузия радикалов часто лимитирует кинетические параметры всей реакции. В «жесткой» матрице затруднены трансляционные движения радикалов, а в ряде случаев — и вращательные. Это определяет не только количественные характеристики скоростей процессов, но и спектр возможных твердофазных реакций. Так, в «жесткой» матрице относительно велика вероятность стабилизации возбужденных частиц в результате рассеяния энергии, затруднены внутримолекулярные перестройки типа *цис*—*транс*-изомеризации и т. п. Время жизни радикалов и соответственно их стационарная концентрация в «жесткой» матрице, как правило, на несколько порядков выше, чем в жидкой и газовой фазах.

При низких температурах, обычно используемых для получения меченых препаратов, важную роль приобретают вторичные реакции стабильных радикалов с атомами водорода, подвижность которых достаточно велика даже при ~ 100 К. Здесь, как и в случае взаимодействия радикалов друг с другом, возможны два процесса:



Однако вероятности этих процессов отличаются от наблюдаемых для квадратичной гибели радикалов — в целом ряде случаев скорость диспропорционирования равна или больше скорости рекомбинации [24].

В экспериментах по введению метки в органические вещества мишень обычно термостатируется, а температура (энергия) атомов T определяется условиями их генерации. Как правило, энергетический спектр падающего на мишень пучка соответствует относительно высоким температурам (от комнатной до нескольких тысяч или десятков тысяч градусов), и это обуславливает их высокую реакционную способность. Снижение температуры от 300 до 77 К должно уменьшить ско-

рость реакции в $\sim 10^{18}$ раз, т. е. почти до нуля. Оказалось, однако, что даже при температурах, близких к 4 К, скорость реакции весьма велика [25]. Детальное исследование показало, что имеются два механизма замещения водорода на тритий, один из которых реализуется при относительно высоких температурах (300—100 К) и характеризуется энергией активации ~ 8 ккал/моль. При низких температурах (< 100 К) преобладает реакция с нулевой (0,3 ккал/моль) энергией активации, протекающая, по всей видимости, по туннельному механизму [26], т. е. могут иметь место совершенно иные закономерности и образовываться иные продукты. Однако при обычных экспериментах вклад туннельных реакций относительно невелик и его можно не учитывать.

В области повышенных (≥ 1 эВ) энергий наряду с реакциями типа (1) и (2) с заметной скоростью протекает прямое замещение водорода, впервые обнаруженное для атомов отдачи трития [27] и впоследствии детально исследованное [6, 28, 29]:



где H^+ — горячий атом. Сечение процесса быстро возрастает с ростом энергии и достигает максимума при 10 эВ. Использованию реакции (6) для получения меченых соединений препятствует отсутствие подходящих по энергетическому спектру и интенсивности источников атомов водорода. Атомы, способные замещать водород по механизму (6), могут быть получены фотолизом некоторых водородсодержащих соединений (например HI , H_2S) или радиационным воздействием. Возможно и использование высокоэнергетических ($\sim 10^6$ эВ) атомов отдачи, получающихся в результате ядерных превращений (например, ${}^6\text{Li}(n\alpha)\text{T}$, ${}^3\text{He}(np)\text{T}$), а также специальных установок для получения пучков ускоренных атомов и ионов.

Однако все эти методы по существу не применимы для введения метки в биологически активные вещества: воздействие излучений и атомов отдачи сопровождается, как известно, значительной деструкцией исходного соединения, установки же с пучками чрезвычайно сложны, а реальные интенсивности пучков недостаточны для достижения высокой активности. Таким образом, в распоряжении экспериментаторов оказываются в основном источники атомов с умеренной энергией, для которых основным первичным процессом являются реакции (1) и (или) (2).

Подробное описание реакций атомов водорода с органическими соединениями содержится в обзорах [30, 31]. Здесь же мы ограничимся играющим важную роль при получении меченых соединений процессом, который приводит к локализации трития в составе обменоспособных групп типа: COOH , NH , NH_2 , OH , SH и т. п. В такой форме содержится, как правило, большая часть (90—99%) трития, причем эта доля не зависит от химической природы соединения. Естественно, такие препараты практически невозможно использовать без предварительной, часто достаточно трудоемкой очистки. Механизм реакций, приводящих к стабилизации атомов трития в составе обменоспособных групп, в настоящее время неясен. Возможно, что в результате стабилизации на поверхности твердого тела атомы водорода поляризуются и уже в форме полярной частицы преимущественно взаимодействуют с полярными же группами молекул среды. Такая поляризация атомов водорода была показана по спектрам ЭПР [31]. В пользу предложенного механизма свидетельствует и тот факт, что коэффициент введения метки в полярные группы мало зависит от энергии атомов.

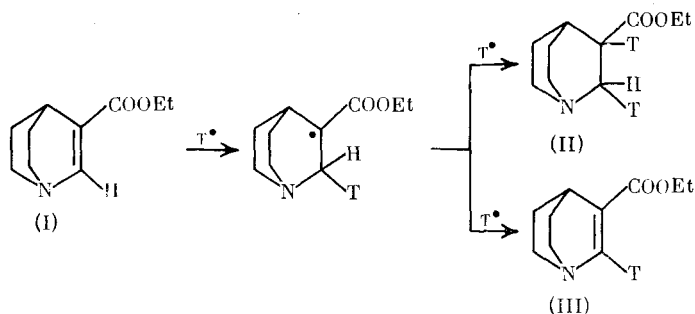
V. ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ ТЕРМИЧЕСКОЙ И ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ АКТИВАЦИИ ГАЗООБРАЗНОГО ТРИТИЯ

Как уже указывалось, МТА и МВЧА относятся к универсальным методам введения тритиевой метки и используются для получения меченых соединений самых различных классов. Однако главное внимание

исследователей привлекали белки (а также их фрагменты — пептиды и аминокислоты), которым и посвящено наибольшее число работ в рассматриваемой области.

Выше уже отмечалось, что при взаимодействии органических соединений с атомами трития, генерируемыми в условиях МТА и МВЧА, наряду с замещением водорода на тритий наблюдаются различные реакции (аналогичное явление отмечено и для других вариантов активации газообразного трития [3, 32, 33]), которые рассматриваются как побочные [34—36]. Соотношение замещения водорода на тритий и побочных реакций сильно зависит не только от метода активации T_2 (например, степень присоединения по Δ -связи при введении метки по методу Вильбаха может быть в 10 раз больше, чем при использовании МВЧА [37]), но и от более тонких изменений условий в рамках одного и того же метода. Так, на выход продуктов присоединения при МТА влияют давление T_2 , температура нити накала, продолжительность экспозиции [38, 39] и даже характер растворителя, используемого при нанесении образца [24]. Еще большее значение имеют структурные факторы: в идентичных условиях при МВЧА соотношение присоединения по двойной связи и замещения H на T составляет 2,6 для олеиновой кислоты, ~12 для ненасыщенных аминокислот и только 0,02 для морфина [37]. Это соотношение может сильно колебаться даже в пределах одного ряда соединений [16, 35], однако для простых алкенов и циклоалкенов насыщение Δ -связи, как правило, протекает легче, чем реакция замещения H на T [16, 35, 36, 39]. В условиях МТА замещение H на T проходит труднее, чем замещение атомов галогена на T как для галогеналканов [40], так и для галогенбензолов [41], причем легкость замещения галогена увеличивается в ряду $Cl \ll Br < I$.

В ряде случаев такие «побочные» реакции, как насыщение Δ -связей и дегалогенирование, могут быть использованы в препаративных целях. Действительно, с помощью МТА 3-карбэтоксид- Δ^2 -дегидрохиноклидин (I) был превращен в соответствующие меченые насыщенное (II) и ненасыщенное (III) соединения с выходами 72 и 5,5% соответственно [42]:



Другими примерами являются получение меченых дигидротестостеронов из тестостерона по МВЧА [43], а также использование ВЧ-разряда (в сочетании с гетерогенным катализом) для получения тритированных нуклеозидмонофосфатов из соответствующих галогенидов [44].

Ниже рассмотрено введение тритиевой метки в различные классы органических соединений.

1. Углеводы жирного ряда

Исследование взаимодействия атомарного трития с углеводородами жирного ряда начато более 20 лет назад, однако основное внимание было сосредоточено не на препаративном получении меченых соединений, а на теоретическом изучении протекающих при этом реакций. Уже в ранних работах было показано, что для алканов (пентан, гексан) степень расщепления углерод-углеродных связей под влиянием атомов T, генерируемых как в условиях МТА [45], так и МВЧА [12], значитель-

но меньше, чем в условиях метода Вильцбаха или при реакциях с горячими атомами трития [46]. Основным процессом является замещение Н на Т, и по МТА (температура W-нити 1750°) [45] гексан-*t* и пентан-*t*, получаются с выходом >80%. Механизм замещения включает, очевидно, отрыв атома водорода от алкана ($RH + T^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + HT$) и рекомбинацию ($R^{\bullet} + T^{\bullet} \rightarrow RT$). Возможен и альтернативный вариант — диспропорционирование алкильных радикалов на алкан и алкен с последующим присоединением атома Т к алкену, но доля этого механизма при низких температурах, по-видимому, невелика, что подтверждается и небольшими выходами (5—10%) высокомолекулярных продуктов [45]. Однако при повышении температуры образца уже до 90 К доля диспропорционирования резко возрастает [47]. Первая стадия — отрыв водорода — у третичного С-атома протекает легче, чем у вторичного и первичного С-атомов [48].

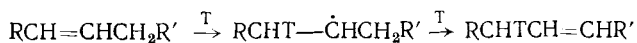
В случае циклоалканов с реакцией отрыва Н конкурирует присоединение Т, приводящее к разрыву углеродного кольца и образованию меченого алкильного радикала. Степень протекания этой реакции определяется прежде всего напряженностью цикла: в одинаковых условиях МТА выход циклогексана-*t* из циклогексана составлял ~80% [45], тогда как циклопропан [49] превращался в циклопропан-*t* лишь с выходом 37%, а остальные меченые продукты представляли собой ациклические углеводороды, образовавшиеся из радикала $ТСН_2СН_2\dot{С}Н_2$. Реакция циклогексана с T_2 в условиях МВЧА также приводит к образованию циклогексана-*t* в качестве главного меченого продукта [12]. Очень существенную роль играет энергия атомов трития [49]: при температуре W-нити, равной 1180°С, из циклопропана образуются только этан-*t* и пропан-*t* (в соотношении 73:27), содержание которых среди продуктов при 1520°С снижается соответственно до 37 и 15% (содержание циклопропана-*t* составляет ~14%), и лишь при 1750°С циклопропан-*t* становится главным продуктом (37%), но и содержание пропана-*t* возрастает до 23%.

При взаимодействии циклогексана с атомами Т в условиях МТА при 1800—2250 К помимо циклогексана-*t* главными мечеными продуктами являются также циклогексен-*t* и бициклогексил-*t* [50]. Таким образом, циклогексильные радикалы, получающиеся в результате отрыва Н от циклогексана (энергия активации $E_a \sim 7$ ккал/моль), вступают во все возможные реакции — рекомбинации, диспропорционирования и димеризации.

Как уже отмечалось, для алкенов и циклоалкенов присоединение атомов трития по двойной связи протекает легче, чем замещение Н на Т. Например, для циклогексена значение E_a для присоединения в 2—4 раза ниже, чем для замещения [36], и главным продуктом (~70%) реакции циклогексена с T_2 в условиях МТА является циклогексан-*t* [36, 45, 51]. Аналогично гекс-1-ен превращается с выходом ~70% в гексан-*t* [45]. Полагают [15], что насыщение Δ -связи протекает в две стадии — тритий последовательно присоединяется сначала к алкену, а затем к образовавшемуся радикалу.

Отмечены [15, 16, 35] значительные различия в легкости насыщения Δ -связей для разных алкенов: особенно быстро реагирует пропен, медленнее — бут-1-ен, изобутен, метилбут-1-ены, еще медленнее — бута-1,3-диен и пент-1-ен и, наконец, гекс-1-ен. Эти различия отражают, очевидно, разницу в значениях E_a при низких температурах [15]. С реакцией насыщения алкенов конкурируют замещение водорода, доля которого для циклогексена и гекс-1-ена составляет ~25% [45], и миграция Δ -связи [24, 34, 35]. Предполагается [16, 24, 34, 50], что сначала тритий присоединяется, образуя меченый алкильный радикал, который затем превращается в меченый алкен в результате потери Н при взаимодействии либо с атомом Т, либо (что менее вероятно) с другим алкильным радикалом. Этот механизм также объясняет изомеризацию алкенов при действии атомов Т, обнаруженную на примерах бут-1-ена [34, 35] и цик-

логексилциклогексена [24]:



Направление изомеризации определяется термодинамическими факторами: бут-2-ен в этих условиях не изомеризуется в бут-1-ен.

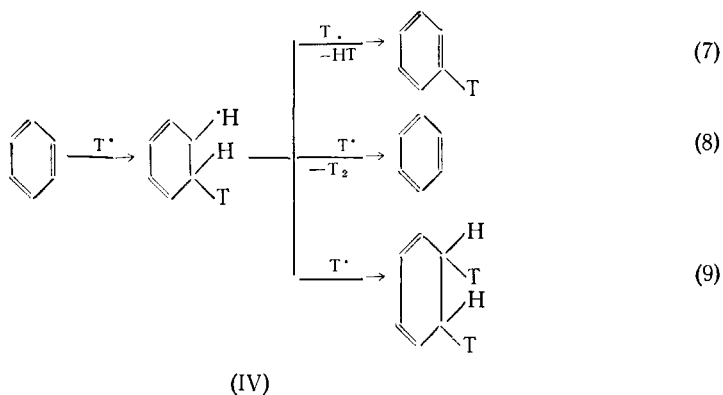
Что касается алкинов, то здесь данные ограничиваются ацетиленом [12], который метится тритием в условиях МВЧА без насыщения тройной связи; при МТА (W-нить, 2000°С) преобладают меченые продукты насыщения — этан и этилен (25—30 и 18% соответственно), а выход $\text{HC}\equiv\text{CT}$ снижается до 18%.

Реакции атомарного трития с функциональными производными углеводородов жирного ряда изучены очень мало. Кроме упоминавшихся уже галогенпентанов, а также жирных кислот, углеводов и аминокислот (выделенных в особые разделы — см. ниже), имеется лишь несколько примеров. Тетрафторборат триэтилоксония $\text{Et}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$ легко обменивается на тритий атомы водорода в условиях МТА (2200°С, давление $\text{T}_2 \sim 0,01$ мм рт. ст.) [19, 52]. Меченый препарат имел высокую величину a (~ 5 Ки/ммоль), не содержал лабильного трития и не нуждался в специальной очистке, поскольку все теоретически возможные продукты расщепления или гидролиза представляют собой легко летучие вещества и удаляются уже в условиях эксперимента.

С помощью МТА получена также меченная тритием Na-соль додецилсульфата ($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$) со значением $a=0,014$ Ки/г, причем бомбардировке подвергали пленку замороженного водного раствора [53]. С помощью МВЧА (импульсный разряд, 800 кГц, 25 Ки T_2) введена метка в дициклогексилмочевину, $a=0,178$ Ки/ммоль, однако только $\sim 20\%$ введенного трития содержалось в циклогексановых кольцах [54].

2. Ароматические соединения

Сильное активирующее влияние разряда на включение трития в ароматические соединения, помещенные в среду T_2 , отмечалось уже сравнительно давно [55—57], причем заметного разложения веществ не наблюдалось. Ароматические соединения не разлагаются также и в условиях МТА (температура W-нити 1460°С, давление 0,001—0,005 мм рт. ст.) [58], однако во многих случаях интенсивно протекает насыщение ароматического кольца. Например, из бензола (температура W-нити 1750°С, давление $\sim 0,01$ мм рт. ст.) получены меченые бензол, циклогексен и циклогексан, радиоактивность которых распределяется в соотношении 21 : 35 : 39 [45]. Очевидно, сначала образуются меченые циклогексадиенильные радикалы (IV)



дальнейшее взаимодействие которых с атомами Т может приводить к образованию меченого бензола, немеченого бензола, либо меченого циклогексадиена, который, присоединяя Т, превращается в меченые циклогексен и циклогексан. Образование циклогексадиенильных радикалов

ТАБЛИЦА 1

Меченые ароматические соединения

Соединение	α , м Ки/ммоль	Ссылки
Акридин	0,045	[10]
<i>n</i> -Аминобензойная кислота (Na-соль)*	35	[66]
<i>n</i> -Аминобензойной кислоты этиловый эфир *	135	[19, 66]
<i>n</i> -Аминосалициловая кислота	0,015	[57]
Антрацен	0,515	[10]
Бензойная кислота	3,8	[10]
Ксантен	0,423	[10]
9-Метилантрацен	0,04	[10]
Нафталин	0,01	[10]

* Вещество наносилось на бумажную подложку; метод получения—МТА, в остальных случаях — МВЧА.

при присоединении возбужденных атомов Н(Т) к ароматическим соединениям подтверждено методом ЭПР [48, 59, 60]. Относительная доля реакции (7) невелика и радиохимический выход бензола-*t* в этих условиях не превышает 5% [58]. В случае алкилбензолов с насыщением ароматического кольца конкурирует замещение Н в боковой цепи. Хотя эта реакция, на первой стадии которой происходит отрыв Н с образованием соответствующих бензильных радикалов, протекает значительно медленнее, чем присоединение к кольцу [61], она является основным процессом, приводящим к образованию меченых алкилбензолов. С увеличением числа алкильных групп конкурентная способность данной реакции повышается (т. е. в ряду бензол < толуол < *o*-ксилол < мезитилен) [58].

Таким образом, в меченых алкилбензолах тритий локализуется главным образом в боковой цепи (55—67% Т для толуола-*t* при МВЧА) [62]. Аналогичное явление наблюдается [63, 64] для меченых ароматических аминокислот (см. ниже). Интересно, что при других вариантах изотопного обмена с алкилбензолами (метод Вильцбаха, реакция с горячими атомами, обмен, инициируемый УФ- или γ -облучением, кислотный катализ в растворе) тритий локализуется преимущественно в ароматическом ядре [62, 65].

Кроме того, заместители затрудняют (под влиянием как электронных, так и пространственных факторов) присоединение Т к ядру [48, 58]. Атом Н(Т) никогда не вступает в то положение ядра, в котором находится заместитель, а атакует только *орто*- или *пара*-положения [48]. Присоединение же в *мета*-положение затруднено, что и объясняет, очевидно, большую склонность к присоединению Н(Т) у 1,3-дизамещенных бензолов по сравнению с 1,2- и 1,4-дизамещенными [48]. Вероятно, поэтому же при введении тритиевой метки по МВЧА в алкалоид морфин не затрагивается ароматическое кольцо [37].

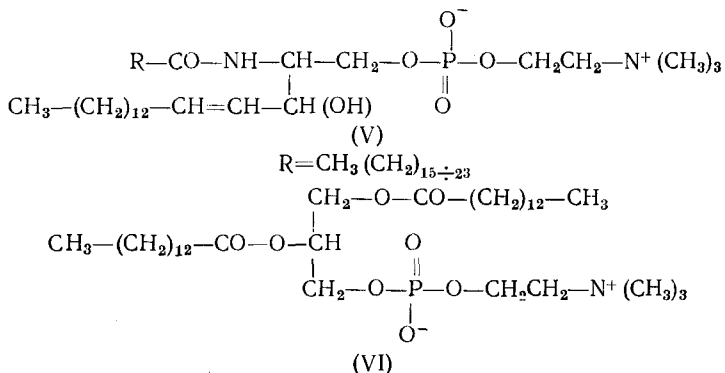
Таким образом, при МВЧА и МТА введение тритиевой метки в ароматические соединения протекает труднее, чем в случае углеводов жирного ряда, и достичь высоких значений α , как правило, не удается. Это подтверждается данными табл. 1, в которую наряду с ароматическими углеводородами включены также ароматические гетероциклы — акридин и ксантен. Существенно, что в условиях, приведенных в табл. 1, для некоторых меченых соединений других классов получались значения α , в 50—100 000 раз (для МВЧА) и в 10—50 (для МТА) большие [10, 19]. Хотя МТА представляется более пригодным для препаративного получения меченых ароматических соединений, строго поставленных сравнительных исследований не проводилось.

В заключение укажем на возможную перспективность получения тритийсодержащих ароматических соединений из галогенпроизводных.

Атомы Т, генерируемые в условиях МТА, замещают атом галогена в галогенбензолах; выход продуктов замещения для иодбензола и бромбензола соответственно в 2,8 и 1,5 раза выше, чем для хлорбензола [41], что согласуется со значениями энергий разрыва связи C—Hal в этом ряду.

3. Липиды и жирные кислоты

Вопрос о введении тритиевой метки в липиды весьма актуален, однако попытки непосредственного введения трития с помощью МТА и МВЧА до настоящего времени особых успехов не имели. По-видимому, это объясняется интенсивным расщеплением липидов в условиях их взаимодействия с возбужденными атомами Т (полное разрушение было обнаружено, например, для яичного лецитина и димиристоилфосфохолина [67]), а также наличием в некоторых липидных молекулах остатков ненасыщенных жирных кислот. Тем не менее с помощью МТА были получены [67] меченые сфингомиелин (V), $a=0,2$ Ки/ммоль, и 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (VI), $a=0,02$ Ки/ммоль. В случае сфингомиелина наличие примеси меченого дигидросфингомиелина, не препятствовавшее дальнейшему использованию препарата, специально не определялось. Эксперимент же с лецитином (VI), несмотря на невысокую величину a , возможно, открывает новые препаративные перспективы: хотя соединение (VI) при нанесении на поверхность стеклянного сосуда полностью разрушилось под действием атомов Т [67], но при нанесении на бумажную подложку выход меченого препарата оказался почти количественным [19].



Другой путь получения меченых липидов состоит в использовании меченых жирных кислот, что позволяет, в частности, получать фосфолипиды, содержащие одновременно радиоактивную метку и фотореактивные группировки [67, 68]. Результаты применения МТА и МВЧА для введения Т в жирные кислоты отражены в табл. 2.

Отмечалось [67, 70] значительное разложение карбоновых кислот в условиях их взаимодействия с атомами трития, что, по-видимому, связано с отрывом H от карбоксильной группы: образовавшиеся ацилоксильные радикалы RCOO^\bullet , как известно, легко расщепляются на CO_2 и R^\bullet . Замена свободных кислот на их соли или эфиры резко уменьшает степень разложения: выход меченого метилового эфира 12-оксистеариновой кислоты составляет 75% в условиях, при которых сама кислота полностью разлагается [67]. Связывание карбоксила позволяет, как видно из табл. 2, на примере 11-аминоундекановой кислоты, которая представляет собой внутреннюю соль, также достичь и более высоких значений a .

Механизм включения Т в углеродную цепь насыщенных жирных кислот такой же, как для алканов. Образование радикалов в результате отрыва H от C-атомов малоновой и метилмалоновой кислот в условиях МВЧА подтверждено с помощью ЭПР [71]. Для ненасыщенных жирных кислот, как и для алканов, присоединение преобладает над замещением. В случае олеиновой кислоты при МВЧА меченые стеариновая

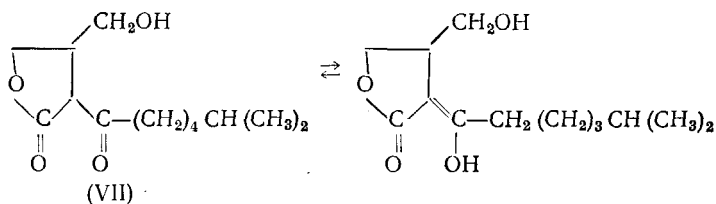
Меченые жирные кислоты

Соединение	Метод	a , мКи/ммоль	Ссылки
11-Аминоундекановая кислота	МТА	300	[67, 68]
Изокапроновая кислота (Na-соль)	МВЧА	19,4	[10]
12-Оксистеариновой кислоты метиловый эфир	МТА	15	[67]
Олеиновая кислота	МВЧА	0,832	[10]
Стеариновая кислота	ЭР	0,026	[69]

Примечание. В методе МТА температура W ишги 2000° С, охлаждение стенок сосуда жидким азотом; в методе МВЧА — 2450 МГц, 20 Вт; ЭР — возбуждение электрическим разрядом (давление 100 мм рт. ст.).

и оленновая кислоты образуются в отношении 2,6:1, однако для метода Вильцбаха это отношение намного больше (24,4:1) [37].

К производным жирных кислот следует отнести и так называемый А-фактор (VII) — вещество, регулирующее биосинтез антибиотика стрептомицина. Меченый А-фактор был получен [19] с выходом ~30% и $a=0,26$ Ки/ммоль (МТА, бумажная подложка), причем продуктов насыщения, которые могли бы образоваться из енольной формы А-фактора, обнаружено не было.



4. Низкомолекулярные биорегуляторы

Введение тритиевой метки в низкомолекулярные биорегуляторы (стероиды, алкалоиды, антибиотики и т. п.) проводилось только с помощью МВЧА. В качестве единственного исключения может рассматриваться меченый А-фактор, получение которого уже описано выше².

Для стероидов (на примере кортикостерона и прогестерона) классический вариант МВЧА (2450 МГц, 0,7 мм рт. ст., 80 мКи T_2 , 5 мин) дал невысокие результаты: хотя химический выход составлял 60—65%, радиохимический выход не превышал 1%, а величина $a=0,0025 \div 0,003$ Ки/ммоль [75]. При использовании МВЧА в случае афлатоксина [76] были достигнуты близкие значения a , которые сильно возрастают при увеличении площади поверхности (использование подложки из стекlobумаги), уменьшении навески вещества и увеличении давления T_2 . Так, с помощью МВЧА меченые 6-азидо-6-дегидродексаметазон и 21-диазо-21-дезоксикортикостерон (0,15 мг, нанесение на стекlobумагу, давление 9 атм) были получены с $a \approx 1$ Ки/ммоль [43]. Очень важно, что в условиях МВЧА чрезвычайно реакционноспособные группы $-N_2$ и $-N_3$ не затрагиваются. В этих же условиях в случае тестостерона изотопный обмен сопровождается присоединением T_2 по $\Delta^{4,5}$ -связи с образованием меченых 5α - и 5β -дигидротестостеронов [43].

Напротив, двойная связь в алкалоиде морфине в условиях МВЧА практически не насыщается и образуется морфин- t с $a=0,0027$ Ки/ммоль (при навеске 1 мг) [37, 77]. Лучших результатов удалось достичь для алкалоида 1-кокаина ($a \sim 0,03$ Ки/ммоль), тогда как местные анестетики, являющиеся его аналогами (карбокаин, ксилокаин, цина-тест, тетракаин, прокаин), метятся менее успешно [78, 79].

² Имеются также сообщения [72—74] об использовании МТА для получения меченных тритием алкалоида аконитина и тетродотоксина (яда из рыбы фугу) с $a \sim 0,5$ Ки/ммоль, однако экспериментальных данных в этих сообщениях не приводится.

5. Углеводы

Немногочисленные попытки препаративного получения меченых углеводов под действием атомарного трития не могут быть признаны вполне удачными, так как α получающихся меченых соединений оказывалась невысокой; однако достигнутые результаты не хуже, чем при методе Вильцбаха. С помощью МТА были помечены [17] глюкоза, сахароза, глюкоза-1-фосфат ($\alpha=0,006\div 0,008$ Ки/г), а также гранулы крахмала [80] (мечеными оказались как амилоза, так и аминопектины); МВЧА был применен для введения Т в метил- β -D-глюкозид (использовалась смесь (99:1) Не и Т₂, кольцевой безэлектродный разряд, 40 МГц), радиохимический выход равен $\sim 2\%$, $\alpha=0,006$ Ки/ммоль [9], и в декстран (0,5—2 Ки трития, 1—4 мм рт. ст. 2450 МГц, $\alpha=0,2$ Ки/ммоль) [76]. В идентичных условиях пептиды и белки метятся в значительно большей степени, чем углеводы [9, 76].

6. Нуклеиновые основания, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты

Непосредственное введение Т в нуклеиновые кислоты и нуклеотиды весьма важно в связи с той ролью, которую играют эти соединения в биологических процессах, и с многочисленностью исследований, в которых они используются. Было показано [75], что МВЧА для этой цели значительно более удобен, чем метод Вильцбаха, и впоследствии было исследовано введение Т в некоторые нуклеиновые основания, нуклеозидмонофосфаты и нуклеиновые кислоты с помощью как МВЧА, так и МТА; результаты представлены в табл. 3. Сохранность соединений этого класса в условиях МВЧА и МТА высокая, однако полимерные молекулы могут подвергаться модификации без расщепления. Возможно, в частности, присоединение Т по ненасыщенным связям гетероциклических ядер ДНК и РНК, поскольку твердые тимин и урацил образуют свободные радикалы, присоединяя атомы Н, возникающие при разряде в газообразном водороде [83].

Следует также отметить, что ВЧ-разряд использовался [44, 81] для активации Т₂ при получении меченых нуклеозидмонофосфатов и урацила методом твердофазного каталитического восстановительного дегалоидирования. В аденозинтрифосфате в условиях МВЧА разрываются пирофосфатные связи с образованием аденозиндифосфата и аденозин-

ТАБЛИЦА 3

Меченые нуклеиновые основания, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты

Соединение	m, мг	Расход трития, Ки	Условия	α , Ки/ммоль	Ссылки
Аденин	110	0,08	2450 МГц, 150 Вт, 0,7 мм рт. ст., 5 мин	0,021	[75]
Тимин	80	0,08	То же	0,0048	[75]
АТФ	100	25	800 кГц (импульсный режим), 200 мм рт. ст.	0,03	[81]
Гуанозинмонофосфат	—	—	2000 К, 0,01 мм рт. ст., 2—5 мин	10—20	[18]
Дезоксицитидинтрифосфат	—	—	Смесь (99:1) Не и Т ₂ , 80 Вт, 40 МГц, 0,01 мм рт. ст., 1 ч	0,5	[82]
n-Нитрофениловый эфир АМФ	—	—	То же	0,001	[82]
АТФ-3'-ОСН ₃	—	—	»	1	[82]
ДНК фага λ	—	—	»	0,08	[82]
Суммарная тРНК	—	—	»	0,01	[82]
тРНК из <i>E. coli</i>	1	30	2200 К, 0,01 мм рт. ст., 0,5 мин	0,3	[19]

Примечания. Метод получения меченого гуанозинмонофосфата и тРНК из *E. coli* — МТА, в остальных случаях — МВЧА; химический выход в случае аденина 85%, тимина 80%, в остальных случаях — 50% (в случае гуанозинмонофосфата не указан); радиохимический выход для аденина 21%, для тРНК из *E. coli* — 0,02%, для тимина — 3,6%; в остальных случаях не указан.

монофосфата (выход 22 и 7% соответственно), величина a которых превышает значение a меченого аденозинтрифосфата соответственно в $\sim 1,5$ и ~ 2 раза [81].

7. Аминокислоты, пептиды и белки

Выше уже указывалось, что реакции с атомарным тритием представляют особый интерес как метод введения метки в белки. Высокую радиоактивность можно ввести в белковую молекулу и с помощью ^{125}I или ^{131}I , однако, во-первых, иодированные белки химически (а зачастую и биологически) уже не идентичны нативным белкам, а во-вторых, применявшиеся до последнего времени методы иодирования белков сопряжены с побочными окислительными процессами.

Получение тритийсодержащих белков — также непростая задача. Биосинтез со сколько-нибудь удовлетворительным выходом целевого продукта возможен лишь для немногих объектов и требует использования очень высоких активностей воды НТО и проведения выделения и очистки по чрезвычайно трудоемким и скрупулезно отработанным методикам. Возможности химического синтеза белков, меченных тритием, также ограничены. Наибольшие успехи достигнуты [3] в случае пептидных гормонов и токсинов, содержащих до нескольких десятков аминокислотных остатков, в молекулы которых тритий был введен комбинацией пептидного синтеза (исходя из галогенаминокислот) с каталитическим дегалогенированием. Наиболее же перспективными и универсальными для получения тритийсодержащих белков представляются обменные методы, и в частности МТА и МВЧА газообразного трития, преимущества которых уже рассматривались во введении.

Поскольку при взаимодействии атомарного трития с белками могут протекать различные процессы, зависящие от первичной, вторичной и третичной структур белковой молекулы, изучение общих закономерностей этой реакции было начато с модельных соединений — аминокислот и коротких пептидов [18, 78, 84]. Как видно из табл. 4, с помощью МТА и МВЧА удается пометить как алифатические, так и ароматические аминокислоты. Согласно результатам для аланина и фенилаланина, МТА позволяет достичь более высоких значений a , но сравнительная ценность МТА и МВЧА для препаративного получения меченых аминокислот специально не изучалась.

Помимо реакции непосредственного замещения Н на Т (табл. 4), для препаративных целей использовалось также восстановление атомарным тритием ненасыщенных $\text{C}=\text{C}$ -связей и некоторых функциональных групп. Так, в условиях МВЧА (20 Вт, 2450 МГц, 1 Ки T_2 , 5 мин) в случае 3,4-дегидро-*DL*-пролина в основном протекает реакция присоединения с образованием меченого *DL*-пролина [37], а *DL*-аланин- t ($a=0,0004$ Ки/ммоль) был единственным меченым продуктом взаимодействия α -оксиминопропионовой кислоты с НТ (8000 В, 40 мм рт. ст., 10 мин) [89]. Следует также упомянуть получение (МВЧА, 1,5 кэВ, рабочий газ — водород с примесью 0,0001% трития, давление $5 \cdot 10^{-4}$ мм рт. ст., 30 мин) меченых фенилтиогидантоиновых производных аминокислот $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{CON}(\text{Ph})\text{C}=\text{S}$ [13], выход 1—10%, $a \sim \sim 0,001$ Ки/г. Внутримолекулярное распределение трития между аминокислотным остатком и фенильной группой не определялось.

Что касается влияния условий эксперимента, то для МТА (табл. 4, способ Г) установлено [86] увеличение a в ~ 7 раз при повышении температуры пленки нанесенного вещества от 77 до 300 К (на примере тирозина). При МВЧА (способ А) изменение величины навески (от 13 до 100 мг) мало отражается на величине a , но приводит к \sim четырехкратному росту радиохимического выхода [78], тогда как для меченого *L*-пролина (МТА, способ Г) при увеличении навески от 0,1 до 1 и 10 мг величина a падает соответственно в ~ 2 и ~ 10 раз [87]. При способе А варьирование мощности разряда (в пределах 50—200 Вт) и его продолжительности (в пределах 3—12 мин) мало влияют на значение a и

Меченые аминокислоты

Аминокислота	Метод	t, мин	Φ , %	η , %	a , Ки/ммоль	Ссылки
Аланин	А	6	83	2,2	0,0016	[75, 78]
Аланин	Б	—	55	—	0,05	[81]
Аланин	В	—	—	4	0,2	[9]
Аланин	Г	60,17	—	—	0,65	[70, 85, 86]
Аргинин	Б	—	42	—	0,055	[81]
Аспарагиновая кислота	Б	—	—	—	0,1	[81]
Валин	Б	—	—	—	0,043	[81]
Валин	Д	15	—	—	0,087	[87]
Гистидин	Б	—	15	—	2,32	[81]
Глицин	А	6	60	1	0,0006	[75, 78]
Глутаминовая кислота	Б	—	—	—	0,14	[81]
Изолейцин	Б	у—	47	—	0,075	[81]
Лейцин	А	12	72	10,2	0,0107	[75, 78]
Лейцин	Б	—	—	—	0,085	[81]
Лейцин	Д	—	—	—	0,13	[76]
Метионин	Б	—	—	—	0,23	[81]
Пролин	Б	—	20	—	0,38	[81]
Пролин	Д	15	—	—	0,25	[87]
Серин	Б	—	—	—	0,035	[81]
Тирозин	Б	—	—	—	0,35	[81]
Тирозин	Г	—	—	—	0,315	[88]
Триптофан	А	0,5	64	8,9	0,0145	[75, 78]
Триптофан	Б	—	45	—	0,062	[81]
Фенилаланин	А	6	76	9	0,0119	[75, 78]
Фенилаланин	Б	—	—	—	0,165	[81]
Фенилаланин	Г	—	—	—	0,3	[88]
Цистин	Б	—	30*	—	0,03	[81]

Примечания. Методы: А — микроволновой разряд (150 Вт, 2450 МГц), 0,08 Ки Т₂, давление 0,7 мм рт. ст., навеска 100 мг DL-аминокислоты; Б — микроволновой разряд в импульсном режиме, 25 Ки Т₂, давление 200 мм рт. ст., навеска 100—150 мг DL-аминокислоты; В — кольцевой безэлектродный разряд (80 Вт, 40 МГц), смесь (99:1) Не и Т₂ (давление в области мишени 10⁻⁴ мм рт. ст.), навеска 5 мг; Г — МТА, температура W-спирали 2000 К, давление 10⁻² мм рт. ст., навеска 0,2—1,0 мг; Д — микроволновой разряд (30 Вт, 2450 МГц), циркуляционный режим (190 циклов в минуту) 0,3—2,0 Ки Т₂, давление 1—4 мм рт. ст. В случае пролина и валина (навески по 0,1—0,4 мг L-аминокислоты) вещество наносилось на бумажную мембрану. Обозначения: t — продолжительность экспозиции, Φ и η — соответственно химический и радиохимический выходы.

* Наряду с цистином получается цистин, $a = 0,316$ Ки/ммоль, выход 50%.

на радиохимический выход, но оба эти показателя уменьшаются почти вдвое при уменьшении экспозиции до 1 мин [78]. Двухкратное увеличение давления позволяет вдвое повысить a , но дальнейшее увеличение давления менее эффективно, а при 0,96 Ки/Т₂ значение a лишь немногим выше, чем при 0,08 Ки, тогда как радиохимический выход падает в ~10 раз. Сильно зависит от условий реакции количество лабильного трития в меченых аминокислотах. Так, аланин-³H, полученный методами В [9] и Г [86], содержал соответственно 60 и 90—95% лабильного трития.

Механизм реакции аминокислот с атомарным тритием изучался почти исключительно для условий МТА. Согласно общим представлениям (см. выше), на первой стадии атака молекулы аминокислоты $RCH_2CH(NH_2)COOH$ атомом Т приводит к отрыву водорода с образованием НТ и радикалов $RCH_2\dot{C}(NH_2)COOH$ (VIII) или $R\dot{C}HCH(NH_2)COOH$ (IX), которые на второй стадии при рекомбинации с атомом Т превращаются в меченые аминокислоты. Лимитирующей является первая стадия, и по внутримолекулярному распределению трития между α - и β -положениями в меченых аминокислотах можно судить о соотношении реакций образования радикалов (VIII) и (IX). Данные по такому внутримолекулярному распределению для случая МТА представлены в табл. 5. Во всех случаях образование радикалов типа (IX) оказывается энергетически более выгодным, что хорошо согласуется с расчетными данными [63, 64, 90], свидетельствующими о большей устойчивости (IX) (большая степень делокализации неспаренного элек-

Внутримолекулярное распределение трития (%) в меченых аминокислотах

$$R\overset{\beta}{C}H_2\overset{\alpha}{C}H(NH_2)COOH, \text{ полученных с помощью МТА}$$

Аминокислота	R	α -положе- ние	β -положение		Аромати- ческое ядро	Ссылки
			на одну связь C—H	всего		
Аланин	H	43	19	57	—	[63, 73]
Серин	OH	18	41	82	—	[63, 73]
Цистеин	SH	11	45	89	—	[63, 73]
Аспарагиновая кислота	COOH	30	35	70	—	[63, 73]
Фенилаланин	Ph	5	19	38	57	[90]
Тирозин	<i>p</i> -HOC ₆ H ₄	8	42	84	8	[64, 88]

трона), а также о большей подвижности атомов водорода в β -положении (во всех случаях, кроме аланина; в качестве критерия использовалась граничная электронная плотность). Эти результаты согласуются и с известными закономерностями образования свободных радикалов: отрыв H от CH_3 -группы происходит труднее, чем от замещенной CH_2 -группы (ср. данные для аланина). Влияние заместителей при введении трития в аминокислоты по МТА (см. табл. 4) в целом такое же, как при реакции аминокислот с атомами водорода в водном растворе [91].

Преимущественная локализация трития в β -положении наблюдалась [92, 93] и для меченых *L*-изолейцина, *L*-аллоизолейцина и *L*-валина, полученных с помощью МВЧА. В случае валина тритий распределялся между α -, β - и γ -положениями в соотношении 7:33:60 (т. е. 10% на каждую γ -C—H-связь).

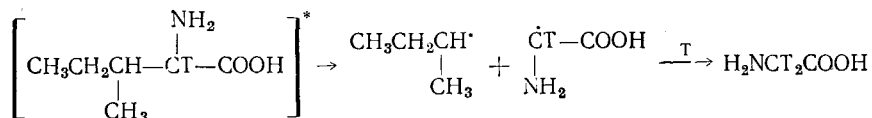
Что касается внутримолекулярного распределения трития в меченых ароматических аминокислотах — фенилаланине и тирозине (см. табл. 5), то значительно большая радиоактивность ароматического ядра в фенилаланине легко объяснима, поскольку, как уже отмечалось выше, заместитель в ядре (в данном случае OH в тирозине) сильно затрудняет присоединение трития (лимитирующая стадия).

Более детальные представления о механизме взаимодействия атомарного трития с аминокислотами основаны на том, что кинетика реакций атомов T (образующихся по МТА) с фенилаланином и тирозином при температуре < 200 K отклоняется от уравнения Аррениуса [88, 94], а при температуре ≤ 60 K скорость реакции вообще не зависит от температуры, хотя даже при 30 K эти реакции протекают с заметной скоростью [72, 95]. Низкотемпературный кинетический предел свидетельствует о туннельном механизме (см. выше, с. 1133). Полагают [72, 95], что туннельный эффект преобладает при температурах ≤ 200 K. Это подтверждается зависимостью внутримолекулярного распределения трития в меченых ароматических аминокислотах от температуры [88, 95]. Для тирозина при 300—400 K, а для фенилаланина в интервале 77—300 K наблюдается также изменение распределения трития между ароматическим ядром и боковой цепью при изменении экспозиции [88, 94], что связано с потерями трития из ядра в результате диспропорционирования.

Побочными процессами при взаимодействии атомарного трития с аминокислотами являются расщепление C—C-связей с образованием меченых молекул более низкой молекулярной массы, замещение на атомы T функциональных групп (декарбоксилирование, дезаминирование, дезоксигенирование, десульфирование), стереоизомеризация, а также присоединение трития к ароматическому ядру и разрыв сульфидных мостиков. Степень протекания этих процессов зависит как от условий реакции, так и от структуры аминокислот.

Расщепление углеродного скелета наблюдалось во многих случаях. Так, в условиях МТА из аланина образуются меченые пропан и этан [86], а из фенилаланина — меченые бензол, толуол, а также глицин и

аланин [94, 96], которые в тех же условиях получают и из тирозина [94]. В ряде случаев расщепление вызывается, по-видимому, не тритием, а излучением раскаленной W-спирали [94], однако укорочение цепи аминокислот, приводящее к образованию низших гомологов, представляет собой истинную побочную реакцию и носит общий характер. В условиях МВЧА зафиксировано образование меченого глицина из *L*-валина [93] и *L*-аллоизолейцина [92]; из *L*-изолейцина меченый глицин, содержащий ~20% общей радиоактивности, образовывался в результате расщепления возбужденной молекулы *L*-изолейцина-(2-Т) [92]:



Замещение атомом Т функциональных групп также является общим процессом для всех аминокислот. В результате замещения карбоксила в условиях МТА из фенилаланина и тирозина получают меченые фенилэтиламин и тирамин соответственно, которые содержат до 10% общей радиоактивности [94, 96]. Дезаминирование в тех же условиях приводит к образованию меченых жирных кислот: пропионовой кислоты из аланина [85], фенилпропионовой — из фенилаланина и тирозина (в последнем на тритий замещается также фенольный гидроксил) [94, 96, 97], γ -аминомасляной кислоты из α , γ -диаминомасляной кислоты [73], для которой в кислой среде дезаминирование затруднено. Это согласуется с механизмом [95, 97], по которому атом Т сначала присоединяется к аминогруппе, а затем отщепляется NH_2T . Замещение гидроксила на тритий в случае тирозина (МТА) ведет к образованию меченого фенилаланина [94], а в случае цистина (МВЧА) легко расщепляется сульфидный мостик с образованием меченого цистеина, выход и активность которого (см. табл. 4) превышают соответствующие значения для получающегося наряду с ним меченого цистина [81].

Присоединение тепловых атомов водорода к ароматическим ядрам *L*-фенилаланина, *L*-тирозина и *DL*-триптофана при 77 К зафиксировано методом ЭПР [60]. При тритировании фенилаланина по Вильцбаху меченый β -циклогексилаланин является основным побочным продуктом [98], однако в условиях МТА бензольное кольцо фенилаланина или тирозина не насыщается [94].

Вопрос о рацемизации оптически активных аминокислот в процессе введения трития особенно важен, поскольку он определяет пригодность метода для получения тритийсодержащих белков при сохранении ими биологической активности. Вообще при реакциях трития с твердыми *L*- или *D*-аминокислотами степень образования меченого оптического антипода невелика. При методе Вильцбаха она колеблется от 1 до ~20% [98, 99], при МВЧА она еще меньше (например, для *L*-валина она составляет 1,5% по сравнению с 4,0% по Вильцбаху) [93], а обращение конфигурации у α -С-атома для *L*-изолейцина и *L*-аллоизолейцина составляет 1,0 и 0,3% соответственно [92]. Это объясняется тем, что α -положения аминокислотных молекул атакуются атомами трития лишь в незначительной степени — 1% для *L*-аллоизолейцина и <8% для *L*-изолейцина. Преобладание атаки в β -положение связано, однако, и с большей степенью эмеризации у асимметрического β -С-атома. Так, в условиях МВЧА из *L*-изолейцина образуются меченые *L*- и *D*-изолейцины и *L*- и *D*-аллоизолейцины в соотношении 72:1:23:4 (по радиоактивности), а из *L*-аллоизолейцина — эти же стереоизомеры в соотношении 29:0,3:67,6:3 [92].

Рацемизация оптически активных аминокислот в условиях МТА исследовалась только на примере *L*-аланина [100], который при температуре мишени 77 К образовывал смесь меченых *L*- и *D*-аланинов (~70:30), а при введении метки по МВЧА (в условиях перезарядки ускоренных до энергии 0,6 кэВ атомарных ионов) не рацемизовался, хотя содержал в α -положении ~25% введенного трития. На этом основа-

Меченые пептиды

Пептид	N	Метод	α , Ки/ммоль	Φ , %	η , %	Ссылки
Leu — Tyr — Leu	3	A	0,1	—	—	[10]
Ile — Ile — D — Val	3	A	0,2	—	—	[10]
Val — Ala — Ala — Phe	4	A	2,0	—	—	[10]
T-4 из гидролизата белка вируса табачной мозаики	7	Б	0,2	—	—	[101]
Asp ¹ — Val ⁴ — Ангиотензин-II	8	В	0,3	40	—	[102]
Брадикинин	9	Г	0,1	—	10	[9]
Ангиотензин-I	10	Д	0,4	32	2	[19, 66]
Релизинг-фактор гонадотропина	10	Е	2—3	—	—	[87]
Релизинг-фактор лютеинизирующего гормона (люлисерин)	10	A	10,6	40	—	[103]
α -Аманитин		A	0,02	—	—	[76]
Соматостатин	14	A	0,75	—	—	[76]
T-8 из гидролизата белка вируса табачной мозаики	20	Б	2,8	—	—	[101]
Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	39	A	10*	—	—	[76]
Антибиотик А-128	10	Б	1—10*	—	—	[18]

Примечания. Методы: А — МВЧА (20 Вт, 2450 МГц, ~ 1 Ки Т₂ в циркуляционном режиме, давление 4 мм рт. ст., 5 мин.), навеска ≤ 10 мг; Б — МТА (давление $\sim 0,01$ мм рт. ст., температура W-нити 2000 К, 2—5 мин). Вещество нанесено на стенки стеклянного сосуда, охлаждаемого жидким азотом; В — электрический дуговой разряд, ~ 6 Ки Т₂, давление 10 мм рт. ст., 30 мин., навеска 15 мг; Г — МВЧА (80 Вт, 40 МГц), смесь (9:1) He и Т₂, давление 0,01 мм рт. ст., навеска 15 мг; Д — МТА (0,03 Ки Т₂, давление 0,01 мм рт. ст., температура W-нити 2000 К, 0,5 мин). Вещество нанесено на бумагу; Е — МВЧА (30 Вт, 2450 МГц, 2 Ки Т₂ в циркуляционном режиме, давление 4 мм рт. ст., 15 мин). Вещество (0,1—0,5 мг) нанесено на бумажный фильтр. Обозначения: N — число аминокислотных остатков, Φ и η — соответственно химический и радиохимический выходы.

* Биологическая активность полностью сохранена.

нии авторы [100] считают, что атомы Т с энергией $> 1,5$ эВ взаимодействуют с аминокислотами не по радикальному механизму, а в результате непосредственного синхронного замещения Н на Т.

Следует отметить, что продукты побочных реакций в сумме могут оказывать преобладающими. Например, выход (в % от общей радиоактивности) меченого фенилаланина (по МТА) при малых экспозициях (10—30 с) составляет $\sim 25\%$, а основными побочными реакциями являются расщепление до глицина (выход 8%) и аланина (выход 10—15%), декарбоксилирование до фенилэтиламина (выход 10—20%) и дезаминирование до фенилпропионовой кислоты (выход 10—20%). При более длительных экспозициях (1—20 мин) выходы фенилаланина и тирозина снижаются до ~ 15 и $\sim 25\%$ соответственно [94].

Поскольку в пептидах один свободный карбоксил и одна свободная аминогруппа (определяющие как протекание побочных реакций, так и количество лабильного трития) приходится уже не на один, а на несколько или даже на несколько десятков аминокислотных остатков, можно было полагать, что пептиды окажутся более благоприятным (по сравнению с аминокислотами) объектом реакции с атомарным тритием. Действительно, пептидная связь аланилаланина не разрывается в условиях МТА [101], тогда как доля лабильного трития в меченых пептидах в 3—5 раз меньше, чем в полученных в идентичных условиях меченых аминокислотах [9], а молярная активность для пептидов в 100—1000 раз больше, чем для аминокислот [92]. Так, в одинаковых условиях МВЧА меченый валин и содержащие его пептиды — Ile—Ile—Val и Phe—Ala—Ala—Val были получены с активностью, равной 1,1, 0,2 и 2 Ки/ммоль соответственно. Данные о меченых пептидах, полученных действием атомарного трития, сведены в табл. 6.

Аминокислотные остатки в пептидах метятся в различной степени, которая в первом приближении должна определяться химической структурой этих остатков. По данным модельных экспериментов со смесями 17 аминокислот, вероятность введения трития в нелабильные положения различных аминокислот в условиях МТА (см. табл. 7) [20] падает в

ТАБЛИЦА 7

Вероятность введения метки в различные аминокислоты (условия МТА)
в расчете на молекулу (K) и одну С—Н-связь (K') относительно аланина

Аминокислота	K	K'	Аминокислота	K	K'
Аланин	1,00	0,33	Лизин	1,60	0,80
Аргинин	1,19	0,60	Метионин	1,35	0,67
Аспарагиновая кислота	2,75	1,37	Изолейцин	1,48	1,48
Валин	1,72	1,72	Лейцин	1,20	0,60
Гистидин	1,76	0,88	Пролин	1,39	0,70
Глицин	1,81	—	Серин	1,78	0,90
Глутаминовая кислота	1,83	0,91	Тирозин	1,08	0,54
Цистеин	1,04	0,52	Треонин	2,51	1,51
			Фенилаланин	1,20	0,60

ряду: аспарагиновая кислота \geq серин $>$ фенилаланин $>$ тирозин $>$ цистеин $>$ аланин, что в общем согласуется с данными по реакциям атомарного водорода с аминокислотами в растворе [91]. Однако по другим данным [63, 73], порядок уменьшения реакционной способности аминокислот в условиях МТА иной: аланин $>$ цистеин $>$ серин $>$ аспарагиновая кислота. Все эти данные, по-видимому, требуют уточнения.

Объяснить неравномерное включение трития в аминокислотные остатки пептидов только с помощью коэффициентов, подобных приведенным в табл. 7, не удастся. Несомненно на атаку аминокислотного остатка в пептиде влияет как химическая природа соседних остатков, так и пространственная структура пептида, о чем свидетельствует, в частности, различное содержание трития в одноименных аминокислотных остатках пептидов Т-4 и Т-8 из гидролизата белка вируса табачной мозаики [20, 101, 104] (см. табл. 6), причем в 20-членном Т-8 отклонение от равновероятного распределения трития существенно больше, чем в более коротком семичленном Т-4. Кроме того, использование смеси аминокислот в качестве модели неправомерно, поскольку роль свободных аминогрупп и карбоксилатов в реакциях атомарного трития с аминокислотами и пептидами несравнима.

Естественно, что в белках влияние пространственных факторов должно проявляться в еще большей степени, и саму неравномерность внутримолекулярного распределения трития в меченых белках, полученных действием атомов Т, предложено [72, 105, 106] использовать для определения третичной структуры. В случае меченого миоглобина кашалота, например, радиоактивности остатков валин-1 и валин-10 отличались в 20 раз [101], а наиболее доступными для атаки атомов Т наряду с N-концевой аминокислотой оказались остатки с полярными группами; гидрофобные же остатки метились существенно меньше [106]. Это соответствует общепринятым представлениям о преимущественной локализации полярных аминокислотных остатков в поверхностном слое белковой глобулы. Принципиальная пригодность предложенного метода подтверждается рентгеноструктурными данными о доступности различных аминокислотных остатков в миоглобине, хотя для нескольких остатков были обнаружены существенные отклонения.

Другое применение меченых белков, полученных действием атомарного трития,— определение их первичной структуры [76, 101, 105]. При этом, наоборот, необходимо, чтобы мечеными были все аминокислотные остатки, т. е. чтобы метка была «тотальной». Поэтому предлагается [101] перед введением Т денатурировать белки, нарушая упорядоченность их структуры. Последующая ступенчатая деградация меченых белков по Эдману приводит к меченым производным аминокислот, которые определяются в количестве 0,1—10 нмоль (в зависимости от значения a исходного меченого белка).

Несмотря на интересные перспективы изучения структуры и функций белков с помощью «тотально» меченных соединений, до настоящего вре-

Меченые белки

Белок	Метод	a , мКи/мг	a , мКи/ммоль	Ссылки
Альбумин из сыворотки крови быка	А	0,24	—	[72, 73, 107]
То же	Б	0,005	—	[8]
»	В	0,1	—	[55]
Белок вируса табачной мозаики	А	—	1 000	[20]
Гамма-глобулин	Г	—	—	[108]
Инсулин	Г	0,003—0,05	—	[109]
Коллаген	А	—	540	[73]
β_2 -Лактоглобулин	А	—	270	[73]
Лизоцим	Г	1,0	—	[76]
Лютеинизирующий гормон	Г	50	—	[10]
β_2 -Микроглобулин	Г	0,5—5,0	—	[76]
Миоглобин кашалота	А	—	4 000	[101, 106]
То же	Г	0,5—1,0	—	[76]
Рибонуклеаза из поджелудочной железы быка	А	—	500	[72, 73, 110]
То же	Д	—	100	[9]
»	Е	1000	—	[111]
Фолликулостимулирующий гормон	Г	50	—	[10]
α -Химотрипсин	А	—	24 300	[72, 73]
Цикло-АМФ-зависимая гистонкиназа	А	—	5 000	[112]

Примечания. Методы: А — МТА (температура W-нити 2000 К, давление 0,01 мм рт. ст., 10—90 с), навеска 2—5 мг; Б — МВЧА (0,05 Ки T_2 , 110 Вт, 90 с), навеска ~20 мг; В — электрический разряд (давление 0,03—0,06 мм рт. ст., 100 мкА, 500 В, навеска 0,5 г); Г — МВЧА (0,5—2 Ки T_2 , давление 2—6 мм рт. ст., 2450 МГц, 78 К, 5—20 мин), навеска 3—20 мг; Д — МВЧА [смесь (99:1) He и T_2 , 40 МГц, 80 Вт, давление 0,001 мм рт. ст.], навеска ~5 мг; Е — МВЧА (10 Ки T_2 , давление ~10 мм рт. ст., 100 мкА, 60 кВ, 5 мин), навеска 50 мг.

мении действием атомарного трития метка была введена менее чем в 20 белков (см. табл. 8); в ряде случаев были достигнуты достаточно высокие значения a . Для сравнения укажем, что по предложенной недавно модификации метода Вильцбаха (давление ~0,1—35 мм рт. ст., экспозиция 1—60 ч) удается получать меченые белки при почти полном сохранении ими ферментативной активности, но с a , равной лишь 0,001—0,015 Ки/ммоль [113].

По-видимому, дальнейшее развитие исследований с применением меченых белков, получаемых действием атомарного трития, сдерживается прежде всего опасениями по поводу побочных реакций, которые могут протекать в процессе введения метки и приводить к нарушениям структуры и функции белковых молекул. Такие побочные реакции уже рассматривались выше для аминокислот и пептидов; они, разумеется, возможны и при взаимодействии атомов Т с белками. Так, при действии атомов водорода, генерируемых в условиях МВЧА, на порошкообразные полимеры ароматических аминокислот, а также инсулин, карбоксипептидазу А или папаин были идентифицированы (по спектрам ЭПР) радикалы, образовавшиеся в результате присоединения Н к ароматическим кольцам [60, 114], что может приводить к насыщению последних. Возможный разрыв сульфидных мостиков гораздо опасней для белков, чем для пептидов. Расщепление белков при МТА наблюдалось на примере бычьего сывороточного альбумина [107]. Однако в целом ряде других случаев [20, 101, 105, 106] в условиях МТА разрывов мостиков в полипептидах не происходит.

Степень протекания всех указанных побочных реакций априорно непредсказуема и может сильно варьировать для различных белков. Влияние же условий введения Т на сохранение нативной структуры белковых молекул исследовано пока совершенно недостаточно. Все это показывает, насколько важно тщательно отделять меченые нативные белки от продуктов побочных реакций. Общее рассмотрение методов очистки белков выходит за рамки настоящего обзора, однако наиболее перспективной представляется аффинная хроматография, и в частности ее разновидность — иммуносорбция, которая с успехом использовалась при

очистке меченых рибонуклеазы [110] и сывороточного альбумина [107]. Главное преимущество этих методов — в их высокой специфичности; кроме того, они сразу же определяют степень сохранения биологической активности. Отметим, что, если меченый белок не потерял ферментативной активности, то модификация части аминокислотных остатков в процессе введения Т не препятствует его использованию в биологических экспериментах, однако такие препараты непригодны для исследования первичной структуры.

Трудности очистки от продуктов побочных реакций делают весьма привлекательной другую возможность введения тритиевой метки в белки, а именно с помощью меченых модифицирующих агентов. Многие из этих агентов, несомненно, могут быть с успехом получены действием атомарного трития. Хорошим примером является упоминавшийся выше меченый тетрафторборат триэтилоксония, радиоактивность которого при получении с помощью МТА может достигать 5—6 Ки/ммоль [52, 66]. Использование этого препарата для этерификации концевых карбоксилов позволяет получать меченые модифицированные белки с высокой активностью.

* * *

Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее перспективным для целей получения меченных тритием соединений в настоящее время является метод термической активации. Его универсальность, простота выполнения, небольшие расходы трития, а также высокие уровни удельных активностей делают его наиболее удобным для использования в научных организациях, применяющих в своих исследованиях радионизотопные метки. При этом важно отметить, что исследователь может, используя простую установку, сам ввести метку в нужный ему препарат, в том числе весьма сложного строения, и в результате получить меченый продукт, который коммерчески недоступен. Метод, очевидно, несложно превратить в производственно-значимый, и тогда он может найти широкое применение в изотопной промышленности, производящей меченные тритием органические соединения.

С нашей точки зрения, важно отметить и еще одну особенность метода термической активации, превращающую его в непосредственный инструмент исследования структуры микро- и макрообъектов. Речь идет о преимущественной локализации метки в тонких (3—10 Å) поверхностных слоях мишени, обусловленной малой величиной пробега реакционноспособных атомов. Вследствие этого, анализируя распределение трития между молекулами, составляющими объект, или его внутримолекулярное распределение, можно получить достаточно наглядную и точную картину относительного пространственного расположения фрагментов объекта. В применении к биологическим объектам это означает возможность изучения топографии белков в мембранах и сложных комплексах (например, нуклеосомах), пространственной организации биологических макромолекул и т. п. Это направление использования метода термической активации уже доказало свою перспективность и, несомненно, будет развиваться.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Evans E. A.* Tritium and Its Compounds. London: Butterworths, 1974.
2. *Johnston A. J., Urch D. S.* J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1973, v. 69, p. 1186.
3. *Нейман Л. А.* Успехи химии, 1981, т. 50, с. 196.
4. *Wilzbach K. E. J.* Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, p. 1013.
5. *Wenzel M., Schulze P. E.* Tritium Markierung. Preparation, Measurement and Uses of Wilzbach Labelled Compounds. Berlin: Walter De Gruyter, 1962.
6. *Menzinger M., Wolfgang R. J.* Chem. Phys., 1969, v. 50, p. 2991.
7. *Несмеянов Ан. Н., Поздеев В. В.* Успехи химии, 1963, т. 32, с. 773.
8. *Ghanem N. A., Westermarck T. J. J.* Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, p. 4432.
9. *Шишков А. В., Румянцев Ю. М., Гольданский В. И.* Докл. АН СССР, 1978, т. 239, с. 988.

10. Hembree W. C., Ehrenkauser R. L. E., Lieberman S., Wolf A. P. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, p. 5532.
11. Дзантиев Б. Г., Шимчук О. С., Шишков А. В. Ж. прикл. спектр., 1976, т. 24, с. 340.
12. Дзантиев Б. Г., Шимчук О. С., Шишков А. В. Химия выс. энергий, 1971, т. 5, с. 450.
13. Баратова Л. А., Дзантиев Б. Г., Шимчук О. С., Шишков А. В. Радиохимия, 1974, т. 16, с. 131.
14. Langmuir I. J. Amer. Chem. Soc., 1912, v. 34, p. 1310.
15. Klein R., Scheer M. D. J. Phys. Chem., 1958, v. 62, p. 1011.
16. Пономарев А. Н., Тальрозе В. Л. Докл. АН СССР, 1960, т. 130, с. 120.
17. Moser H. C., Nordin P., Senne J. K. Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 1964, v. 15, p. 557.
18. Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольдманский В. И., Несмеянов А. Н. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, с. 1237.
19. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П. Тезисы докл. II Симп. стран — члнов СЭВ «Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами». Л., 1981, с. 7.
20. Баратова Л. А., Гольдманский В. И., Румянцев Ю. М., Унукович М. С., Шишков А. В. Молек. биол., 1982, т. 16, с. 117.
21. Brennan D., Fletcher P. C. Proc. Roy. Soc., 1959, v. A 250, p. 389.
22. Taylor J. B., Langmuir I. Phys. Rev., 1933, v. 44, p. 423.
23. Кондратьев В. Н. Константы скорости газозавных реакций. Спр. М.: Наука, 1970, с. 36.
24. Макаров В. А., Филатов Э. С., Несмеянов А. Н. Химия выс. энергий, 1970, т. 4, с. 465.
25. Филатов Э. С., Орлова М. А., Симонов Е. Ф. Вестн. МГУ. Химия, 1980, т. 21, с. 49.
26. Дубинская А. М., Юсубов Н. Н. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, с. 2095.
27. Lee E. K. C., Rowland F. S. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 2907.
28. Wolfgang R. Progr. Reaction Kinetics, 1965, v. 3, p. 97.
29. Urch D. S., Welch M. J., Arthy R. J. Trans. Faraday Soc., 1970, v. 66, p. 1642.
30. Дубинская А. М. Успехи химии, 1978, т. 47, с. 1169.
31. Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Орлова М. А. Там же, 1981, т. 50, с. 2168.
32. Wolfgang R. Proc. II Int. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds. Brussels: Euratom, 1968, p. 755.
33. Feng P. Y., Greenlee T. W. Proc. Symp. «Tritium in the Physical and Biological Sciences», v. 2, Vienna: IAEA, 1962, p. 11.
34. Scheer M. D., Klein R. J. Phys. Chem., 1959, v. 63, p. 1517.
35. Klein R., Scheer M. D. J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, p. 1007.
36. Макаров В. А., Филатов Э. С., Несмеянов А. Н. Химия выс. энергий, 1969, т. 3, с. 463.
37. Ehrenkauser R. L. E., Wolf A. P., Hembree W. C., Lieberman S. J. Label. Compounds, 1977, v. 13, p. 367.
38. Краснянский А. В., Кремлякова Н. Ю., Светликин С. М., Смирский Ю. Н., Фирсова Л. П., Воробьева В. Я., Михлина Е. Е., Яхонтов Л. Н. Радиохимия, 1978, т. 20, с. 309.
39. Краснянский А. В., Писляков В. Н., Фирсова Л. П. Там же, 1978, т. 20, с. 634.
40. Смирский Ю. Н., Фирсова Л. П. Там же, 1978, т. 20, с. 305.
41. Смирский Ю. Н., Фирсова Л. П. Там же, 1978, т. 20, с. 300.
42. Фирсова Л. П., Краснянский А. В., Светликин С. М., Михлина Е. Е., Воробьева В. Я., Янина А. Д., Яхонтов Л. Н. Ж. орг. химии, 1976, т. 12, № 10, с. 2249.
43. Chiu W. H., Peng C. T. J. Label. Compounds, 1979, v. 16, p. 603.
44. Мясоедов Н. Ф., Марченко Н. С., Михайлов К. С. В сб.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами (Марианске Лазне, ЧССР, 1976). Сборник докладов, Прага, 1977, с. 275.
45. Shores R. D., Moser H. C. J. Phys. Chem., 1961, v. 65, p. 570.
46. Weeks R. W., Garland J. K. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, p. 2380.
47. Klein R., Scheer M. D., Kelley R. J. Phys. Chem., 1964, v. 68, p. 598.
48. Campbell D., Symons M. C. R., Verma G. S. P. J. Chem. Soc., A, 1969, p. 2480.
49. Moser H. C., Shores R. D. J. Phys. Chem., 1962, v. 66, p. 2272.
50. Макаров В. А., Филатов Э. С., Несмеянов А. Н. Химия выс. энергий, 1969, т. 3, с. 413.
51. Макаров В. А., Филатов Э. С. Там же, 1970, т. 4, с. 467.
52. Смоляков В. С., Петренко А. Г., Ушаков А. Н., Нейман Л. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, с. 455.
53. Скрипкин А. Ю., Вольнская А. В., Шишков А. В., Гольдманский В. И. Молек. биол., 1981, т. 15, с. 1364.
54. Городецкий Д. И., Михайлов К. С., Мясоедов Н. Ф., Степанов В. М. В сб.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами (Марианске Лазне, ЧССР, 1976). Сборник докладов, Прага, 1977, с. 181.
55. Wolfgang R., Pratt T., Rowland F. S. J. Amer. Chem. Soc., 1956, v. 78, p. 5132.
56. Lemmon R. M., Tolbert B. M., Strohmeier W., Whittermor J. M. Science, 1959, v. 129, p. 1740.
57. Westermarck T., Lindroth H., Enander B. Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 1960, v. 7, p. 331.

58. Краснянский А. В., Несмеянов Ан. Н., Фурсова Л. П. Вестн. МГУ. Химия, 1976, т. 17, с. 195.
59. *Liming F. G. (Jr), Herak J. N., Gordy W.* Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1967, v. 58, p. 2329.
60. *Liming F. G. (Jr), Gordy W.* Ibid., 1968, v. 60, p. 794.
61. Шатров В. Д., Чхеидзе И. И. Химия выс. энергий, 1971, т. 5, с. 44.
62. *Ache H. J., Herr W., Thiemann A.* Proc. Symp. «Tritium in the Physical and Biological Sciences». v. 2. Vienna: IAEA, 1962, p. 21.
63. Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Бательман В. Д. Химия выс. энергий, 1981, т. 15, с. 73.
64. Филатов Э. С., Орлова М. А., Симонов Е. Ф. Радиохимия, 1980, т. 22, с. 614.
65. *Ache H. J., Herr W., Thiemann A.* In: Chemical Effects of Nuclear Transformations, v. 2, Vienna: IAEA, 1961, p. 111.
66. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П. В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами, ч. 1, М.: ЦНИИАтоминформ, 1982, с. 33.
67. Смоляков В. С., Циренина М. Л., Ушаков А. Н., Нейман Л. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, с. 284.
68. Молотковский Ю. Г., Лазуркина Т. Ю., Фаерман В. Н., Смоляков В. С. Бергельсон Л. Д. Там же, 1980, т. 6, с. 594.
69. *Sato Y., Meshi T., Takahashi T.* Bull. Chem. Soc., Japan, 1961, v. 34, p. 167.
70. Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Шишков А. В., Могильников В. П. Радиохимия, 1979, т. 21, с. 909.
71. *Cole T., Heller H. C.* J. Chem. Phys., 1965, v. 42, p. 1668.
72. Несмеянов Ан. Н., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Гольданский В. И., Шишков А. В., Гедрович А. В. XII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Рефераты докладов и сообщений, № 1. М.: Наука, 1981, с. 203.
73. Несмеянов Ан. Н., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Орлова М. А. В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами, ч. 2. М.: ЦНИИАтоминформ, 1982, с. 52.
74. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. Биоорг. химия, 1981, т. 7, с. 1813.
75. *Gosztonyi T., Kovacs A., Marton J.* Proc. II Int. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds. Brussels: Euratom, 1968, p. 947.
76. *Wessels B. W., McKean D. J., Lean N. C., Shinnick C., DeLuca P. M., Smithies O.* Radiat. Res., 1978, v. 74, p. 35.
77. *Fishman J., Norton B. I., Hembree W. C.* J. Label. Compounds, 1973, v. 9, p. 563.
78. *Gosztonyi T., Walde N.* Ibid., 1966, v. 2, p. 155.
79. *Ghanem N. A.* III Int. Conf. on Peaceful Uses of Atomic Energy. Geneva, 1964, IX, Rep. № 458.
80. *Nordin P., Moser H. C., Senne J. K.* Biochem. J., 1965, v. 96, p. 336.
81. Михайлов К. С., Мясоедов Н. Ф., Лавров О. В., Сидоров Г. В., Тельковская Т. Д., Гаврилов В. Ю. В кн.: Производство изотопов, М.: Атомиздат, 1973, с. 175.
82. Тулькес С. Г., Румянцев Ю. М., Шишков А. В. Биофизика, 1978, т. 23, с. 1098.
83. *Jensen H., Henriksen T.* Acta Chem. Scand., 1968, v. 22, p. 2263.
84. *Hembree W. C., Ehrenkaufer R. L. E., Lieberman S., Wolf A. P.* In: Methods in Enzymology, v. 37B. Ed. by O'Malley, Hardman. New York: Acad. Press, 1975, p. 313.
85. Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Филатов Э. С., Шишков А. В. Химия выс. энергий, 1978, т. 12, с. 8.
86. Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Могильников В. П. Там же, 1979, т. 13, с. 373.
87. *Ehrenkaufer R. L. E., Wolf A. P., Hembree W. C.* Пат. США 4162142 (1979); С. А., 1979, в. 91, 114274.
88. Филатов Э. С., Орлова М. А., Симонов Е. Ф. Вестн. МГУ. Химия, 1980, т. 21, с. 49.
89. *Sato Y., Takahashi T.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1961, v. 34, p. 169.
90. Филатов Э. С., Орлова М. А., Симонов Е. Ф. Вестн. МГУ. Химия, 1980, т. 21, с. 160.
91. *Neta P., Schuler R. H.* Rad. Res., 1971, v. 47, p. 612.
92. *Ehrenkaufer R. L. E., Hembree W. C., Lieberman S., Wolf A. P.* J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 5005.
93. *Ehrenkaufer R. L. E., Wolf A. P., Hembree W. C., Lieberman S. J.* Label. Compounds, 1977, v. 13, p. 359.
94. Орлова М. А., Симонов Е. Ф., Филатов Э. С. Химия выс. энергий, 1979, т. 13, с. 468.
95. Орлова М. А., Симонов Е. Ф., Филатов Э. С. Радиохимия, 1981, т. 23, с. 614.
96. Орлова М. А., Несмеянов Ан. Н. Там же, 1978, т. 20, с. 787.
97. Орлова М. А., В кн.: Материалы конференции молодых ученых, посвященной 60-летию ВЛКСМ (Москва), 1978). М.: МГУ, 1979, ч. 1, с. 58.
98. *Parmentier J. H. J.* Label. Compounds, 1966, v. 2, p. 367.
99. *Parmentier J. H.* Ibid., 1965, v. 1, p. 93.
100. Баратова Л. А., Румянцев Ю. М., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Цыряпкин В. А., Шишков А. В. Химия выс. энергий, 1981, т. 15, с. 370.
101. Шишков А. В., Унукович М. С., Румянцев Ю. М., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Леднева Р. К., Гольданский В. И. Докл. АН СССР, 1980, т. 251, с. 751.
102. *Khairallah P. A., Page J. H., Vintpus E. M., Smeby R. R.* Science, 1962, v. 138, p. 523.

103. *Li Zhi-Min*. *Heh Hua Hsueh Ju Fang She Hua Hsueh*, 1980, v. 2, № 1, p. 51; *C. A.*, 1980, v. 93, p. 3315.
104. *Шишков А. В.* I Всесоюзн. биофизический съезд. Тезисы докл. М., 1982, № XVII.5.4, с. 163.
105. *Шишков А. В., Румянцев Ю. М., Унукович М. С., Гольдманский В. И., Симонов Е. Ф., Филатов Э. С., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Леднева Р. К.* IV Всесоюзн. симп. по химии белков и пептидов. Тезисы докл., Минск, 1977, с. 23.
106. *Гольдманский В. И., Румянцев Ю. М., Шишков А. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П.* *Молек. биол.*, 1982, т. 16, с. 528.
107. *Зорин С. Н., Мазо В. К., Симонов Е. Ф., Филатов Э. С., Веселова О. Л.* *Вопр. питания*, Деп. ВНИИМТИ № Д-4902; *Медиц. реф. ж.*, 1983, раздел VII, № 7, публ. 2250.
108. *Cardinaud R., Takashima K., Dansset J., Fromageot P.* *Int. J. Appl. Radiation Isotop.*, 1964, v. 15, p. 1.
109. *Tschesche H., Behr W., Wick R.* In: *Insulin: Chemical Structure and Function of Insulin Related Hormones*. Proc. II. Int. Insulin Symp., 1979 (Pub., 1980), p. 185; *C. A.*, 1980, v. 93, 182264.
110. *Гоникберг Э. М., Дегтерев И. А., Унукович М. С., Шишков А. В., Филатов Э. С.* *Докл. АН СССР*, 1976, т. 229, с. 112.
111. *Noyer M., Schnek A. G., Leonis J., Winand M.* *J. Label. Compounds*, 1976, v. 12, p. 365.
112. *Нестерова М. В., Барбашов С. Ф., Арибджанов А. А., Абдукаримов А., Северин Е. С.* *Биохимия*, 1980, т. 45, с. 979.
113. *Lively M. O., Bush G. A., Mathur B. P., Moran T. F., Powers J. C.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, v. 204, p. 589.
114. *Liming F. G.* *Radiat. Res.*, 1969, v. 39, p. 252.

Институт химической физики
АН СССР, Москва; Институт
биоорганической химии, имени
М. М. Шемякина АН СССР, Москва