

УДК 546.100.02.3:547.15/17

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТВЕРДОФАЗНОГО И ЖИДКОФАЗНОГО МЕТОДОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ДЕЙТЕРИЯ В 4-АМИНОБУТАНОВУЮ КИСЛОТУ

© 2024 г. В. П. Шевченко, К. В. Шевченко, Л. А. Андреева, И. Ю. Нагаев*, Н. Ф. Мясоедов

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2

*e-mail: nagaev.img@yandex.ru

Получена 06.10.2023, после доработки 13.12.2023, принята к публикации 20.12.2023

Исследована эффективность включения дейтерия в 4-аминобутановую кислоту (ГАВА). При использовании D_2O при $200^\circ C$ в ГАВА включалось в среднем около 0.5 атома дейтерия. При использовании D_2O с трифторуксусной кислотой (1 : 1) при $250^\circ C$ включалось в среднем 1.49 атома дейтерия с выходом 15%. При применении твердофазного метода удавалось вводить в среднем около 3 атомов дейтерия на молекулу ГАВА. При изотопном обмене с D_2O использование палладиево-родиевой смеси, предварительно обработанной газообразным дейтерием, позволяло получать [D]ГАВА, содержание дейтерия в которой достигало 4.5–4.6 атома. Но в обоих случаях выходы [D]ГАВА оказались низкими. Препаративные количества [D]ГАВА получали при использовании дополнительных носителей. Лучший результат получен при нанесении ГАВА на цеолит. При использовании D_2O и 5% $PdO/BaSO_4$ -ГАВА-цеолита, предварительно обработанного газообразным дейтерием, можно получить [D]ГАВА со средним содержанием 1.5–2.0 атомов дейтерия и выходом около 30%.

Ключевые слова: дейтерий, ГАВА, изотопный обмен

DOI: 10.31857/S0033831124010138

Биологические системы, связанные с ГАВА, влияют на работу клеток Лейдига [1], играют роль при астме [2] и предотвращении развития сахарного диабета [3]. Секреция ГАВА в β -клетках происходит совместно с секрецией инсулина. По-видимому, этим можно объяснить ингибирующее влияние ГАВА на секрецию глюкагона, связанную с повышением концентрации глюкозы в крови [4]. Установлена пептидная регуляция специфических лиганд-рецепторных взаимодействий ГАВА на плазматических мембранах нервных клеток [5, 6].

Проблема, связанная с проникновением экзогенной ГАВА через гематоэнцефалический барьер, не решена до сих пор [7, 8]. Не исключено, что экзогенная ГАВА может стимулировать выработку эндогенной ГАВА [9, 10]. Разобраться в этом вопросе можно, используя [D]ГАВА. Проникает [D]ГАВА в ту или иную живую ткань или экзогенная ГАВА лишь стимулирует выработку эндогенной ГАВА в этой ткани, можно выяснить, выделив ГАВА и определив, содержит ли она дейтерий. Есть работы с использованием [D]ГАВА для изучения жизнедеятельности растений [11].

На достоверность полученных данных влияет количество дейтерия в [D]ГАВА. Необходимо получить [D]ГАВА со средним содержанием дейтерия в молекулах [D]ГАВА более одного атома. К сожалению, подвижность протонов при C–H связях в алифатических карбоновых кислотах — низкая [12, 13]. Поэтому на первой стадии проводят в жестких условиях

введение дейтерия в органические кислоты [14, 15], из которых химическими методами получают аминокислоты. Применению жестких условий при введении изотопов водорода в аминокислоты соединения препятствуют побочные реакции, которые сопровождаются образованием различных полимеров [16].

Цель работы — получить [D]ГАВА, исходя из ГАВА, с высоким содержанием дейтерия, используя для активации изотопного обмена твердофазный или жидкофазный метод, а также при совместном применении обоих методов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, ГАВА, реагенты и растворители — коммерческие препараты. Трифторуксусная кислота (ТФУ) не содержала дейтерия, растворы с D_2O смешивали по объему. Исходные соединения и реакционные смеси охарактеризованы с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (Thermo Electron, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в 0.1%-ной уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ. Для сбора и обработки хроматографических данных использовалась система «МультиХром 1.5» (Амперсенд, Россия).

ВЭЖХ проводили на колонках Reprosil-pur C18 AQ (4 × 150 мм, размер частиц — 5 мкм) и Kromasil 100C18 (8 × 150 мм, размер частиц — 7 мкм). В первом случае элюент А: 25 мМ дигидрофосфат аммония рН 2.8 + 1 мМ гептансульфонат натрия, элюент Б: метанол, линейный градиент от 0 до 20% Б за 15 мин. Во втором случае элюент А: 25 мМ дигидрофосфат аммония рН 2.8 + 2 мМ гептансульфонат натрия, элюент Б: метанол; градиент от 0 до 50% Б за 30 мин, скорость — 2.0 мл/мин. Время удерживания — 3.21 и 6.10 мин соответственно.

ВВЕДЕНИЕ ДЕЙТЕРИЯ В GABA

1. Раствор 1 мг GABA в 0.1 мл дейтериевой воды помещали в ампулу, заполняли аргоном, запаивали и грели при 180 и 200°C в течение 15–30 мин. Растворитель удаляли лиофилизацией, остаток растворяли в водном метаноле (1 : 1) и анализировали масс-спектрометрическим методом.

2. Раствор 1 мг GABA в 40 мкл смеси дейтериевой воды с ТФУ (1 : 1) помещали в ампулу, заполняли аргоном, запаивали и грели при 210, 230 и 250°C в течение 30 мин. Растворитель удаляли упариванием при пониженном давлении. Остаток растворяли в 1 мл водного метанола (1 : 1) и анализировали масс-спектрометрическим методом.

3. Раствор 1 мг GABA в 100 мкл смеси дейтериевой воды с ТФУ (1 : 1) помещали в ампулу, содержащую 10 мг K_2PtCl_4 . Ампулу заполняли аргоном, запаивали и при 210 °C выдерживали 30 мин. Далее реакцию смесь обрабатывали, как описано выше.

4. 1 мг $RhCl_3$ помещали в ампулу, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием (давление 400 гПа). Затем в ампулу вносили раствор 1 мг GABA в 0.1 мл дейтериевой воды, продували аргоном. Ампулу запаивали и грели при 180°C 30 мин. Далее обрабатывали, как описано выше.

5. 10 мг $PdO/BaSO_4$ помещали в ампулу, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием (давление 400 гПа). Затем вносили в ампулу 1 мг GABA в 0.1 мл дейтериевой воды, продували аргоном. Ампулу запаивали и грели при 180°C 30 мин. Далее обрабатывали, как описано выше.

6. 10 мг $Pd/BaSO_4$ помещали в ампулу, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием (давление 400 гПа). Затем вносили в ампулу 1 мг GABA в 0.1 мл дейтериевой воды, продували аргоном. Ампулу запаивали и грели при 210°C 30 мин. Далее обрабатывали, как описано выше.

7. Раствор GABA (50 мг) и $RhCl_3$ (50 мг) в 0.5 мл дейтериевой воды при смешивании с 5% $PdO/BaSO_4$ (250 мг) замораживали жидким азотом и лиофилизировали. Сухой остаток тщательно растирали. Порошок вновь лиофилизировали.

а) в реакцию брали 14 мг смеси. Реакционную ампулу вакуумировали и заполнили газообразным

дейтерием до давления 400 гПа. Реакцию вели при 150–210°C 15 мин. Затем растворитель удаляли упариванием. Остаток растворяли в 2 мл водного метанола (1 : 1) и анализировали масс-спектрометрическим методом;

б) смесь (14 мг) помещали в ампулу и обрабатывали D_2 при 150°C 15 мин. Затем в ампулу вносили 0.1 мл D_2O , продували аргоном. Ампулу запаивали и грели при 190, 210, 230°C 30 мин. Далее обрабатывали, как описано выше;

в) смесь (14 мг) помещали в ампулу, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием. Затем вносили в ампулу 0.1 мл дейтериевой воды, заполняли аргоном. Ампулу запаивали и грели при 180–230°C 30–60 мин. Далее обрабатывали, как описано выше.

Использование других катализаторов для твердофазных реакций

GABA (50 мг) растворяли в 0.4 мл дейтериевой воды и смешивали с 500 мг катализатора Линдлара, или 5% $PdO/BaSO_4$, или 5% Pd/Al_2O_3 , или 5% $Pd/BaSO_4$. При перемешивании смесь замораживали жидким азотом и лиофилизировали. Сухой остаток переносили в агатовую ступку и тщательно растирали. Порошок вновь лиофилизировали.

В реакцию брали 11 мг смеси. Реакционную ампулу вакуумировали и заполняли дейтерием до давления 400 гПа. Реакцию вели 15 мин при 150, 170 и 190°C. Затем после удаления газообразного дейтерия реакцию смесь три раза упаривали с 3 мл метанола. Далее обрабатывали, как описано выше.

Использование других носителей

GABA (50 мг) растворяли в 0.4 мл дейтериевой воды и смешивали с 500 мг $BaSO_4$, или ZrO_2 , или TiO_2 , или цеолита. При перемешивании смесь замораживали жидким азотом и лиофилизировали. В сухой остаток вносили 50 мг 5% $Pd/BaSO_4$. Смесь помещали в агатовую ступку и тщательно растирали. Порошок вновь лиофилизировали.

а) в реакцию брали 12 мг смеси. Реакционную ампулу вакуумировали и заполняли дейтерием до давления 400 гПа. Реакцию вели при 190°C 5 мин. Затем растворитель удаляли упариванием при пониженном давлении. Далее обрабатывали, как описано выше;

б) в реакцию брали 12 мг смеси. Реакционную ампулу вакуумировали, заполняли дейтерием до давления 400 гПа и выдерживали при комнатной температуре. Через 1 ч в ампулу вносили 0.1 мл дейтериевой воды, заполняли аргоном, ампулу запаивали и выдерживали при 210°C 15–180 мин. Далее обрабатывали, как описано выше;

в) препаративный синтез проводили с 0.6 г смеси. Реакционную ампулу вакуумировали, заполняли дейтерием до давления 400 гПа и выдерживали при комнатной температуре. Через 1 ч ампулу

вакуумировали и вновь заполняли дейтерием до давления 400 гПа. Еще через 1 ч в ампулу вносили 0.6 мл дейтериевой воды и заполняли аргоном, ампулу запаивали и выдерживали при 210°C 30–90 мин. Содержимое ампулы переносили на фильтр и смывали GABA метанолом (6 × 1 мл). Полученный раствор упаривали и лиофилизировали. Очистку проводили хроматографическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Использование только дейтериевой воды для введения дейтерия в GABA оказалось малоперспективным. Даже при 200°C изотопным обменом в GABA включалось около 0.5 атома дейтерия (табл. 1). Активировать изотопный обмен с D₂O пытались, используя TФУ, RhCl₃, 5% PdO/BaSO₄, 5% Pd/BaSO₄ и K₂PtCl₄. Во всех случаях за 30 мин включение дейтерия оказалось меньше 2 атомов (табл. 1). Реакцию с раствором D₂O–TФУ (1 : 1) провели при 210, 230 и 250°C в течение 30 мин (табл. 1). Добавление к раствору GABA в D₂O–TФУ (1 : 1) в качестве гомогенного катализатора K₂PtCl₄ практически не изменило включение дейтерия в аминокислоту. При использовании RhCl₃, или 5% PdO/BaSO₄, или 5% Pd/BaSO₄ их предварительно обрабатывали газообразным

дейтерием. Затем добавляли раствор GABA в дейтериевой воде и нагревали в термостате (табл. 1). При повышении температуры в присутствии предварительно восстановленного 5% PdO/BaSO₄ включение дейтерия в [D]GABA увеличивалось лишь на 10–20%, а выход при этом падал существенно: при 190°C до 23% и при 200°C — до 8%. Таким образом, в результате всех этих модификаций ввести более 1.5 атома дейтерия в GABA не удалось.

Следующим этапом стала оптимизация условий введения дейтерия твердофазным методом. В качестве катализаторов были выбраны 5% Pd/BaSO₄, 5% PdO/BaSO₄, 5% Pd/Al₂O₃ и катализатор Линдлара (табл. 2). Раствор GABA в D₂O наносили на эти катализаторы, растворитель удаляли. Остаток нагревали в атмосфере дейтерия и подбирали условия, при которых дегградация вещества была не более 80%. При этом можно было оценить, на каком катализаторе отношение выход — включение метки — наилучшее. В результате проведенных исследований оказалось, что более двух атомов дейтерия включается в молекулы GABA только на 5% PdO/BaSO₄. Поэтому этот катализатор выбран для дальнейших экспериментов. Недостатком использования данного катализатора является низкий выход препарата.

Такие проблемы часто удавалось решить, модифицируя катализаторы различными добавками [17].

Модификацию 5% PdO/BaSO₄ проводили, обрабатывая его водным раствором GABA и RhCl₃. Для удаления воды смесь замораживали жидким азотом и лиофилизировали. Затем смесь GABA–RhCl₃–5% PdO/BaSO₄ (1 : 1 : 5) обрабатывали газообразным дейтерием при температурах от 150 до 210°C. Известно, что смесь RhCl₃ и аминокислот делает более эффективным спилlover изотопов водорода [17]. В результате большее количество активированных частиц дейтерия сольватируется на молекулах GABA, сорбированных на катализаторе. Кроме того, не только повышается включение дейтерия, но и замедляется дегградация вещества. При нагревании смеси RhCl₃ и палладиевого катализатора в атмосфере газообразного дейтерия образуется биметаллический катализатор, который продуцирует активированные частицы изотопов водорода, разрушающие исходное соединение в меньшей степени [18]. Действительно, восстановленный 5% PdO/BaSO₄, модифицированный RhCl₃, более эффективно активировал изотопный обмен (табл. 2). При температурах выше 190°C в GABA включалось более 2 атома дейтерия, а выход при 190°C при добавлении RhCl₃ вырос в 7 раз. К сожалению, такая методика более подходит для введения трития в GABA. Получение же десятков миллиграммов [D]GABA сложно, так как увеличение количества вещества в 50–100 раз потребует соответствующего увеличения остальных ингредиентов, что технически трудно выполнимо.

Поэтому была проведена серия экспериментов, когда смесь GABA–RhCl₃–5% PdO/BaSO₄ (1 : 1 : 5) предварительно обрабатывали 2 ч при комнатной

Таблица 1. Введение дейтерия в GABA изотопным обменом

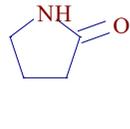
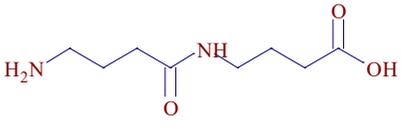
| Условия | Выход, % | [D] |
|---|----------|------|
| 180°C, 30 мин, D ₂ O | 98 | 0.31 |
| 200°C, 15 мин, D ₂ O | 75 | 0.54 |
| 210°C, 30 мин, D ₂ O–TФУ 1 : 1 | 60 | 1.34 |
| 230°C, 30 мин, D ₂ O–TФУ 1 : 1 | 25 | 1.49 |
| 250°C, 30 мин, D ₂ O–TФУ 1 : 1 | 15 | 1.47 |
| 210°C, 30 мин, D ₂ O–TФУ 1 : 1, K ₂ PtCl ₄ | 37 | 1.35 |
| 180°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ | 92 | 0.07 |
| 180°C, 30 мин, D ₂ O, 5% PdO/BaSO ₄ | 46 | 1.03 |
| 210°C, 60 мин, D ₂ O, 5% Pd/BaSO ₄ | 5 | 1.22 |
| 180°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 89* | 0.83 |
| 190°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 81* | 0.95 |
| 200°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 36* | 2.35 |
| 210°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 16* | 2.99 |
| 210°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 80** | 0.48 |
| 210°C, 60 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 7* | 3.07 |
| 230°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 3* | 4.53 |
| 190°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 20*** | 2.29 |
| 210°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 9*** | 3.08 |
| 230°C, 30 мин, D ₂ O, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ | 4*** | 2.90 |

Примечание. Соотношение GABA–RhCl₃–5% PdO/BaSO₄ 1 : 1 : 5; * предварительная обработка — 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием; ** количество смеси и D₂O увеличено в 25 раз; *** предварительная обработка — 15 мин при 150°C газообразным дейтерием.

температуре или при 150°C газообразным дейтерием и проводили изотопный обмен с D₂O при температурах от 180 до 230°C (табл. 1). При этом оказалось, что включение дейтерия в GABA по обеим методикам достигало ~3 атомов (210°C, 30 мин) при выходе 7–9%. Очевидно, что при использовании и этих подходов препаративные количества [D]GABA не получить.

Действительно, оказалось, что при использовании этих методов увеличивать навески смеси можно не более чем в десять раз. При дальнейшем увеличении концентрации GABA увеличивалось образование полимерных и других побочных продуктов и выход меченого продукта становился еще ниже. Попытки провести реакцию при той же концентрации GABA за счет увеличения объема реакционной смеси приводили к увеличению выхода [D]GABA, но включение дейтерия резко падало (табл. 1).

Анализ масс-спектрометрических данных показал, что основными побочными продуктами реакции оказались дейтерированные амиды — димер и пирролидинон:

| | |
|---|---|
|  |  |
| Пирролидинон | Димер |
| C ₄ H ₇ NO 85.05* | C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ 188.06* |

* Молекулярная масса недейтерированного соединения.

По-видимому, при повышении концентрации GABA выход [D]GABA падает за счет более эффективной конденсации молекул GABA, а при добавлении соответствующего объема D₂O контакт молекул GABA с катализатором становится менее эффективным, в результате выход получается выше, а включение дейтерия — ниже. Другими словами, если для проведения биологических опытов нужен [D]GABA с высоким содержанием дейтерия, можно воспользоваться твердофазным методом или комбинацией твердофазного и жидкофазного метода, но если для экспериментов требуются десятки миллиграмм [D]GABA, пусть в среднем примерно с 1.5 ± 0.5 атомами дейтерия, нужен другой подход.

По-видимому, изотопный обмен между молекулами GABA и активированными частицами дейтерия идет лишь на поверхности катализатора и вся масса соединения в реакции не участвует, т.е. включение дейтерия небольшое. Экспериментально показано, что при использовании дополнительного носителя, когда вещество наносится на этот носитель и затем смешивается с катализатором, устойчивость его увеличивается и, следовательно, выход его растет [17]. Кроме того, за счет большего количества носителя контакт молекул GABA с поверхностью носителя возрастает, что повышает вероятность изотопного обмена.

В качестве дополнительных носителей использовали BaSO₄, ZrO₂, TiO₂, цеолит. Предварительно оценили, какой изотопный обмен на этих носителях можно ожидать при использовании твердофазной методики. Для этого перечисленные носители пропитывали водным раствором GABA, замораживали жидким азотом и лиофилизировали. Сухой остаток механически смешивали с 5% Pd/BaSO₄. В результате получали смесь 5% Pd/BaSO₄—GABA—носитель (1 : 1 : 10). Оказалось, что даже при 190°C включение дейтерия в GABA практически не происходит (табл. 2). По-видимому, без использования RhCl₃ увеличение количества носителя не приводит к эффективному контакту дейтерия с нанесенным на носитель GABA. Другими словами, на разных носителях деградация GABA происходит в разной степени, но изотопный обмен минимален. Таким образом, твердофазный метод в данном случае неэффективен.

Выход и содержание метки в GABA при двухчасовом насыщении смеси 5% Pd/BaSO₄—GABA—носитель при комнатной температуре газообразным дейтерием с последующим изотопным обменом с D₂O при 210°C приведены в табл. 3. Отличие этой методики от предыдущей заключается в том, что контакт активных частиц дейтерия не ограничивается только молекулами GABA,

Таблица 2. Введение дейтерия в GABA изотопным обменом твердофазным методом (15 мин, давление D₂ 400 гПа)

| Условия | Выход, % | [D] |
|---|----------|------|
| 150°C, 5% PdO/BaSO ₄ | 92 | 0.19 |
| 170°C, 5% PdO/BaSO ₄ | 7.5 | 1.3 |
| 190°C, 5% PdO/BaSO ₄ | 3 | 2.4 |
| 150°C, 5% Pd/BaSO ₄ | 75 | 0.03 |
| 170°C, 5% Pd/BaSO ₄ | 67 | 0.12 |
| 190°C, 5% Pd/BaSO ₄ | 13.5 | 0.82 |
| 150°C, 5% Pd/Al ₂ O ₃ | 1.5 | 0.43 |
| 170°C, 5% Pd/Al ₂ O ₃ | 1.0 | 0.48 |
| 190°C, 5% Pd/Al ₂ O ₃ | — | — |
| 150°C, катализатор Линдлара | 47 | 0.05 |
| 170°C, катализатор Линдлара | 21 | 0.15 |
| 190°C, катализатор Линдлара | 16.7 | 0.31 |
| 150°C, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ (1 : 5) | 35 | 1.49 |
| 170°C, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ (1 : 5) | 30 | 1.76 |
| 190°C, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ (1 : 5) | 21 | 2.18 |
| 200°C, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ (1 : 5) | 15 | 2.45 |
| 210°C, RhCl ₃ , 5% PdO/BaSO ₄ (1 : 5) | 10 | 2.53 |
| 190°C, 5% Pd/BaSO ₄ —BaSO ₄ * | 83 | 0.03 |
| 190°C, 5% Pd/BaSO ₄ —ZrO ₂ * | 3.5 | — |
| 190°C, 5% Pd/BaSO ₄ —TiO ₂ * | 1 | — |
| 190°C, 5% Pd/BaSO ₄ —цеолит* | 42 | 0.07 |

* Время реакции — 5 мин.

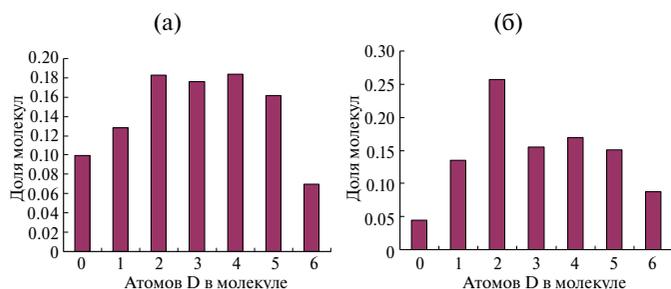


Рис. 1. Дейтерировании GABA: а — RhCl₃-5% PdO/BaSO₄-GABA (1 : 5 : 1), D₂, 23°C, 1 ч, затем D₂O (210°C, 30 мин); б — RhCl₃-5% PdO/BaSO₄-GABA (1 : 5 : 1), D₂, 150°C, 15 мин, затем D₂O (210°C, 30 мин).

адсорбированными на поверхности носителя, а они могут взаимодействовать со всеми веществами, растворенными в D₂O. Судя по приведенным данным, цеолит лучше инициировал изотопный обмен D₂O с GABA, за ним идут TiO₂, ZrO₂ и BaSO₄.

Кинетические исследования при использовании в качестве носителя цеолита показали, что при 210°C при увеличении времени реакции с 15 до 180 мин содержание GABA, не вступившего в реакцию, падает с 74 до 4%, а содержание изотопомеров с одним и двумя атомами дейтерия изменяется с 24.0 до 97%. Выход [D]GABA за этот период времени падал с 52 до 12%. Практически после выдерживания реакционной смеси более 60 мин включение дейтерия выходит на плато. Содержание изотопомеров с одним и двумя атомами дейтерия за 90, 120 и 180 мин изменяется с 94 до 97%. Таким образом, реакцию следует проводить в течение 60 мин при 210°C.

Таким образом, при использовании дополнительного носителя (цеолит, 210°C) выход [D]GABA вырос в 5 раз, изотопный обмен — в 1.4 раза (табл. 1, 3).

Таблица 3. Введение дейтерия в GABA изотопным обменом на разных носителях

| Условия | Выход, % | [D] |
|--|----------|------|
| 210°C, 60 мин, D ₂ O 5% Pd/BaSO ₄ -BaSO ₄ | 34* | 0.64 |
| | 42** | 0.45 |
| 210°C, 60 мин, D ₂ O 5% Pd/BaSO ₄ -ZrO ₂ | 15* | 1.25 |
| | 21** | 1.22 |
| 210°C, 60 мин, D ₂ O 5% Pd/BaSO ₄ -TiO ₂ | 13* | 1.34 |
| | 18** | 1.15 |
| 210°C, 60 мин, D ₂ O 5% Pd/BaSO ₄ -цеолит | 26* | 1.71 |
| | 31** | 1.66 |
| | 34*** | 1.48 |

* Предварительная обработка — 2 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием.

** Получение препаративных количеств (увеличение количества GABA до 50 мг).

*** Получение препаративных количеств (увеличение количества GABA до 100 мг), время реакции — 90 мин.

Как следует из табл. 3, при использовании цеолита увеличение количества GABA в 50–100 раз практически не влияет на выход [D]GABA. Таким образом, можно получать необходимые для исследования количества [D]GABA.

Интересно проследить, какие изотопомеры образуются при использовании твердофазной методики введения дейтерия и при изотопном обмене с дейтериевой водой. Содержание GABA, не содержащей дейтерий, при расчетах не учитывалось.

На катализатор Линдлара, или 5% Pd/BaSO₄, или 5% PdO/BaSO₄, или 5% Pd/Al₂O₃ наносили GABA (10 : 1). При 150°C вклад изотопомеров с одним и двумя атомами дейтерия относительно других изотопомеров в присутствии катализатора Линдлара — 100%, 5% Pd/BaSO₄—99%, 5% PdO/BaSO₄—86%, 5% Pd/Al₂O₃—91%.

При изотопном обмене с дейтериевой водой, когда не использовались гетерогенные катализаторы, в диапазоне 180–250°C основными изотопомерами также являлись изотопомеры с одним и двумя атомами дейтерия (98–100%). Это объясняется подвижностью а-протонов у карбоксильной группы. При использовании смеси GABA-RhCl₃-5% PdO/BaSO₄ (1 : 1 : 5), обработанной 1 ч при комнатной температуре газообразным дейтерием, суммарное количество изотопомеров с одним и двумя атомами дейтерия при изотопном обмене с D₂O было при 180°C 32.0%, при 190°C — 62.5%, при 200°C — 69.2%, 210°C — 34.6%, 230°C — 0.08%. Т.е. при возрастании температуры до 200°C включение дейтерия в а-положении к карбоксильной группе растет. При более высоких температурах распределение меняется. При температурах выше 200°C создаются условия для изотопного обмена против на дейтерий при всех C–H связях (рис. 1).

В результате включение дейтерия значительно растет, что приводит к уменьшению вклада изотопомеров с одним и двумя атомами дейтерия. Но одновременно растет образование побочных продуктов с амидной связью и выход [D]GABA оказывается низким.

Таким образом, при использовании кооперации твердофазного и жидкофазного методов удалось ввести в GABA более двух атомов дейтерия (RhCl₃–5% PdO/BaSO₄-GABA) и получать препаративные количества [D]GABA (5% Pd/BaSO₄-цеолит).

Эффективность изотопного обмена на цеолите можно объяснить данными, полученными при гидрировании этилена газообразным противом. Установлено, что благодаря взаимодействию этилена и Al-центров цеолита, при котором образовывались кислотные центры Бренстеда, вероятность гетеролитической диссоциации H₂ возрастает и при одновременном присутствии H₂ и этилена даже при комнатной температуре образуется C₂H₆ в измеряемых количествах [19]. Подобный эффект удалось объяснить, проведя расчеты энергии адсорбции для молекул H₂ и C₂H₄. Полученные результаты позволили

авторам сделать вывод, что сила кислот Бренстеда на поверхности цеолита может быть решающим фактором, определяющим эффективность восстановления C_2H_4 . Степень восстановления C_2H_4 четко коррелировала со способностью цеолита образовать кислотные центры Бренстеда.

В присутствии этилена экспериментально были идентифицированы положительно заряженные кластеры $[Al_3+O_2-]^+$ или $[Al_3+(OH-)_2]^+$ на поверхности цеолита. Возможность образования подобных структур была также смоделирована вычислительными методами [20, 21]. При взаимодействии с этими структурами на поверхности цеолита образуются катионные этильные частицы ($C_2H_5^+$), связанные с атомами кислорода, входящими в состав цеолита. Из возможных путей реализации этого процесса наиболее достоверным оказался путь, на первой стадии которого предполагалась образование более глубоко делокализованного водорода на кислотных центрах Бренстеда, в результате чего при взаимодействии с этиленом становится возможным образование кластера $[H-Al_3+O_2-]H^+$, на котором этилен восстанавливается до этана. Расчеты энергий реакции и активационных барьеров однозначно указывали на то, что это предположение — наиболее верное [22–25]. Реакция C_2H_4 с активированным на кислотных центрах Бренстеда водородом имеет низкий активационный барьер, и ее протекание при этих условиях наиболее вероятно. Таким образом, проведенные исследования имеют большое теоретическое значение. Продемонстрирована важная роль кислотных центров Бренстеда для реализации процессов, связанных со взаимодействием молекулярного водорода с органическими соединениями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по плану НИОКР НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *The Leydig Cell in Health and Disease*. Part of the Book Ser.: Contemporary Endocrinology / Eds. A.H. Payne, M.P. Hardy. Humana Totowa, New Jersey: Humana, 2007. P. 299. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7>
2. Xiang Y.-Y., Wang Sh., Liu M., Hirota J.A., Li J., Ju W., Fan Y., Kelly M.M., Ye B., Orser B., O'Byrne P.M., Inman M.D., Yang X., Lu W.-Y. // Nat. Med. 2007. Vol. 13. P. 862–867. <https://doi.org/10.1038/nm1604>
3. Soltani N., Qiu H., Aleksic M., Glinka Y., Zhao F., Liu R., Li Y., Zhang N., Chakrabarti R., Ng T., Jin T., Zhang H., Lu W.-Y., Feng Z.-P., Prud'homme G.J., Wang Q. // PNAS. 2011. Vol. 108. N 28. P. 11692–11697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102715108>
4. Rorsman P., Berggren P.-O., Bokvist K., Ericson H., Mohler H., Ostenson C.-G., Smith P.A. // Nature. 1989. Vol. 341. P. 233–236. <https://doi.org/10.1038/341233a0>
5. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 4. С. 300–306. <https://doi.org/10.7868/S1027813314040116>
6. Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Myasoe-dov N.F. // FEBS J. 2014. Vol. 281. P. 385–386.
7. Boonstra E., de Kleijn R., Colzato L.S., Alkemade A., Forstmann B.U., Nieuwenhuis S. // Front. Psychol. 2015. Vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520>
8. Diegel J.G., Pintar M.M. // J. Natl. Cancer Inst. 1975. Vol. 55. № 3. P. 725–726. <https://doi.org/10.1093/jnci/55.3.725>
9. Barrett E., Ross R.P., O'Toole P.W., Fitzgerald G.F., Stanton C. // J. Appl. Microbiol. 2012. Vol. 113. N 2. P. 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
10. Steenbergen L., Sellaro R., van Hemert S., Bosch J.A., Colzato L.S. // Brain Behav. Immun. 2015. Vol. 48. P. 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.003>
11. Hijaz F., Killiny N. // Plant Meth. 2020. Vol. 16. Article 24. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-0057-9>
12. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2013. Т. 55. № 3. С. 284–288. <https://doi.org/10.1134/S1066362213030181>
13. Heys J.R. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2010. Vol. 53. N 11–12. P. 716–721. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1822>
14. Wennerberg J., Dreisch K. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2023. Vol. 66. N 4–6. P. 138–144. <https://doi.org/10.1002/jlcr.4021>
15. Uttry A., Mal S., van Gemmeren M. // J. Am. Chem. Soc. 2021. Vol. 143. P. 10895–10901.
16. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Чернышева М.Г., Бадун Г.А., Федосеев В.М., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2011. Т. 53. № 3. С. 285–288. <https://doi.org/10.1134/S1066362211030192>
17. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные три-тетраметиллипиды. М.: Наука, 2003. 246 с.
18. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф., Попова Н.Н., Пирогова Г.Н. // Радиохимия. 2002. Т. 44. № 6. С. 533–536.
19. Vityuk A., Khivantsev K., Aleksandrov H.A., Vayssilov G.N., Alexeev O.S., Amiridis M.D. // ACS Catal. 2018. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04000>
20. Bhering D.L., Ramirez-Solis A., Mota C.J.A. // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107. P. 4342–4347.
21. Zheng A., Li S., Liu S.-B., Deng F. // Acc. Chem. Res. 2016. Vol. 49. P. 655–663.
22. Blöchl P.E. // Phys. Rev. B. 1994. Vol. 50. P. 17953–17979.
23. Grimme S. J. // Comp. Chem. 2006. Vol. 27. P. 1787–1799.
24. Kresse G., Furthmüller J. // Comput. Mater. Sci. 1996. Vol. 6. P. 15–50.
25. Kresse G., Joubert J. // Phys. Rev. B. 1999. Vol. 59. P. 1758–1775.

THE USE OF D₂ AND DEUTERIUM WATER FOR THE INTRODUCTION OF A LABEL INTO 4-AMINOBUTANOIC ACID

V. P. Shevchenko, K. V. Shevchenko, L. A. Andreeva, I. Yu. Nagaev*, and N. F. Myasoedov

National Research Centre Kurchatov Institute, pl. Kurchatova, 2, Moscow, 123182 Russia

**e-mail: nagaev.img@yandex.ru*

Received October 6, 2023; revised December 13, 2023; accepted December 20, 2023

Abstract—The efficiency of incorporating deuterium into 4-aminobutanoic acid (GABA) has been studied. When using D₂O at 200°C, about 0.5 deuterium atom was included in GABA on average. When using D₂O with trifluoroacetic acid (1 : 1) at 250°C, an average of 1.49 deuterium atoms with a yield of 15% were included. When using the solid-phase method, it was possible to introduce about 3 deuterium atoms per GABA molecule. During isotopic exchange with D₂O, the use of a palladium–rhodium mixture pretreated with gaseous deuterium made it possible to obtain [D]GABA with the deuterium content of 4.5–4.6 atoms. But in both cases, the yields of [D]GABA were low. Preparative amounts of [D]GABA were obtained using additional carriers. The best result was obtained when applying GABA to zeolite. Using D₂O and 5% Pd/BaSO₄–GABA–zeolite pretreated with deuterium gas, [D]GABA was obtained with an average content of 1.5–2.0 deuterium atoms and a yield of about 30%.

Keywords: deuterium, GABA, isotope exchange