БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 10 * № 1 * 1984

УДК 546.11.027*.3 : 615.779.931

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНОГО А-ФАКТОРА

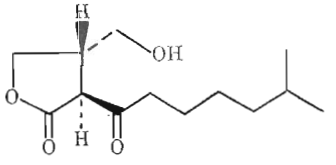
Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Сойфер В. С., Третьякова С. Ю., Хохлов А. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

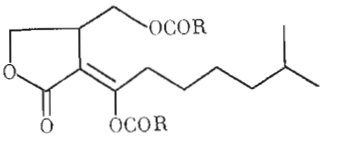
Действием термически активированного газообразного трития получен А-фактор, неопределенно меченный ^3H, с удельной радиоактивностью от 10 до 150 ГБк/ммоль (0,25–4 Ки/ммоль).

А-Фактор — биорегулятор *Streptomyces griseus* (*Actinomyces streptomycini*), необходимый для нормального развития этого актиномицета и продуцирования им антибиотика стрептомицина [1–4]. Для А-фактора установлено строение (2*S*, 3*S*)-изокаприлоил-3-гидроксиметил-γ-бутиролактона (1) [5, 6]; осуществлен синтез рацемического А-фактора [7], природного 3*S*-изомера [8] и ряда производных и аналогов этого соединения [9]. В связи с исследованием механизма действия А-фактора [10, 11], которое проявляется при очень низких концентрациях этого биорегулятора, возникла необходимость в получении меченого препарата, имеющего достаточно высокую удельную радиоактивность. Это требование исключало возможность использования А-фактора, меченного ^{14}C, поэтому настоящая работа посвящена получению А-фактора, меченного тритием.

Поскольку описанные методы синтеза А-фактора из-за многостадийности, низкого суммарного выхода и трудоемкости практически непригодны для получения меченого препарата, было решено использовать для этой цели обменные методы, т. е. вводить тритий в «готовую» молекулу. При этом мы исходили из синтетического рацемического А-фактора, который значительно более доступен по сравнению с природным и превосходит препараты последнего по биологической активности благодаря более высокой степени очистки [7].



(I)



(II)

R = 3,5-динитрофенил

Из различных методов изотопного обмена наиболее подходящим нам представлялся обмен с газообразным тритием, активированным на раскаленной вольфрамовой нити. Этот метод уже использовался для введения тритиевой метки в биологически активные соединения (см., например, [12–14]). Мы проводили работу на аналогичной установке при параметрах (температура нити, давление трития, геометрия сосуда), обеспечивающих свободный пробег атомов трития до стенок реакционного сосуда, на которые наносилась пленка вещества. В этих условиях атомы трития имеют энергию, достаточную только для взаимодействия с поверхностным слоем вещества, так что создание максимальной по площади однородной тонкой пленки вещества оказывается решающим условием достижения высокой молярной радиоактивности меченого препарата и повышения радиохими-

ческого выхода. Вначале мы пытались обновлять поверхность, растворяя вещество после «бомбардировки» атомами трития и повторно нанося растворенное вещество на стенки реакционного сосуда упариванием перед последующей новой «бомбардировкой». Однако при такой методике А-фактор подвергается значительному разрушению. Лучших результатов удалось добиться, уменьшая количество вещества, взятого для однократной «бомбардировки». Так, если брать на один эксперимент 100 мкг А-фактора и ~7 мКи $^3H_2$ и проводить 100 таких экспериментов, то из 10 мг немеченого А-фактора после отмывки от лабильного трития и очистки с помощью хроматографии в тонком слое удается получить 0,27 мг (выход 2,7%) меченого препарата с высокой молярной радиоактивностью — более 4 Ки/ммоль. Отмыть весь лабильный тритий, многократно растворяя препарат в метаноле и отгоняя растворитель, не удалось; полностью он был удален только в результате очистки с помощью препаративной тонкослойной хроматографии. После трехкратной хроматографии меченый А-фактор уже не содержал лабильного трития (проба с метанолом). Средние результаты нескольких таких опытов выглядят следующим образом:

Общее количество исходного А-фактора, мг	10
Количество А-фактора в одном эксперименте, мг	0,1
Количество экспериментов	100
Общий расход трития, ГБк (мКи)	26 (700)
Общая радиоактивность препарата до очистки, ГБк (мКи)	14,8 (400)
Количество лабильного трития, удаленного отгонкой с растворителем, ГБк (мКи)	5 (137)
Общая радиоактивность меченого А-фактора, ГБк (мКи) после первой ТСХ	1,55 (42)
» второй »	0,33 (9)
» третьей »	0,17 (4,6)
Химический выход, мг (%)	0,27 (2,7)
Радиохимический выход, %	0,65
Молярная радиоактивность, ГБк/моль (Ки/ммоль)	152 (4,12)

Хотя способ, описанный выше, дает возможность получать меченый препарат с высокой удельной радиоактивностью, он чрезвычайно трудоемок, плохо воспроизводим (из-за нестандартной толщины получающейся пленки вещества) и требует большого расхода газообразного трития. Поэтому для получения бо́льших количеств меченого А-фактора мы использовали предложенную недавно [15] модификацию метода термической активации трития, при которой исходное немеченое соединение наносят на пористую (бумажную) подложку. Это позволяет резко сократить трудоемкость метода, увеличить весовой масштаб эксперимента, значительно повысить химический и радиохимической выход меченого препарата и, кроме того, делает метод воспроизводимым, поскольку условия нанесения раствора вещества на бумажную подложку легче стандартизовать. Для очистки образующегося меченого А-фактора вместо ТСХ мы применяли хроматографию на колонке со сферическим силикагелем (эффективность ~200 теоретических тарелок). Использование большей колонки было невыгодным, так как А-фактор обнаруживает сильную остаточную адсорбцию на силикагеле, и даже на использованной нами колонке потери при однократной хроматографии 2—5 мг вещества составляли ~30%. С помощью данной модификации мы уже в одном эксперименте (опыт 1) из 10 мг немеченого А-фактора получили ~3 мг меченого препарата. Для контроля эффективности этого метода очистки мы в нескольких опытах переводили меченый А-фактор в еще более липофильное бис-3,5-динитробензоильное производное (II). Последнее очищали колоночной хроматографией и далее омыляли до А-фактора, который дополнительно также очищали хроматографически (опыт 2).

Как видно из приведенных ниже результатов, удельная радиоактивность меченого А-фактора, подвергнутого однократной хроматографической очистке, при последующих хроматографиях (без или с переводом в бис-динитробензоильное производное) практически не изменяется. Таким образом, при наработке больших количеств меченого А-фактора можно ограничиться одной-двумя хроматографическими очистками, что существенно

для увеличения химического выхода. Действительно, как при очистке меченого А-фактора через производное (II) с последующим гидролизом и рехроматографией, так и при аналогичном модельном опыте с немеченым А-фактором общий химический выход составил ~10%. Следовательно, основные потери препарата связаны не с разрушением вещества при введении метки или последующих радиолитических процессах, а с остаточной адсорбцией на силикагеле:

	Опыт 1	Опыт 2
Количество исходного А-фактора в одном эксперименте, мг (мкмоль)	10,5 (43,39)	5,2 (21,49)
Расход трития, ГБк (мКи)	3,7 (100)	3,7 (100)
Общая радиоактивность препарата до очистки, ГБк (мКи)	1,56 (42)	1,48 (38)
Выход, мкмоль (молярная радиоактивность, ГБк/ммоль) меченого А-фактора (I) или его производного (II)		
после первой хроматографии (I)	11,12 (10,1)	11,36 (8,15)
» второй » (I)	5,45 (10,99)	–
» первой » (II)	–	3,67 (7,78)
» второй » (II)	–	3,20 (7,53)
после гидролиза производного (II) и рехроматографии А-фактора (I)	–	1,76 (7,26)
Химический выход (после первой хроматографии), мг (%)	2,69 (25,6)	2,75 (52,8)
Радиохимический выход (после первой хроматографии), %	3	2,5

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что метод термической активации газообразного трития может с успехом использоваться для получения меченого А-фактора. В своем традиционном варианте (нанесение вещества на стенки реакционного сосуда) этот метод позволяет достичь высоких значений молярной радиоактивности, тогда как, нанося вещество на бумажную подложку, можно получать меченый препарат относительно легко, быстро и с хорошим выходом. Хотя молярная радиоактивность в этом случае почти в 15 раз ниже, она вполне достаточна для большинства биохимических исследований.

Экспериментальная часть

Все эксперименты по получению меченого А-фактора действием термически активированного трития проводились на установке, аналогичной описанной в работе [12]. Вещество наносили либо на стенки реакционного сосуда (упаривая на роторном испарителе разбавленный раствор вещества в 2 мл хлороформа), либо на лист фильтровальной бумаги ФНС (СССР, 220×100 мм), который предварительно был промыт метанолом. В последнем случае раствор вещества в 5 мл метанола с помощью микропипетки одинаковыми порциями наносили равномерно на всю поверхность листа, которым после высушивания выстилали стенки реакционного сосуда. Сосуд вакуумировали до ~0,1 Па, заполняли 0,26–3,7 ГБк $^3H_2$ и на вольфрамовую нить подавали напряжение, нагревая ее при 2200 К в течение 30 с. После откачивания избыточного $^3H_2$ и образовавшегося H^3H сосуд вскрывали и вещество смывали со стенок сосуда 1% спиртом в хлороформе, а с бумаги — метанолом. Для колоночной хроматографии использовали пропорциональный программный микронасос В (ЧССР), фракции собирали с помощью коллектора UltroRac 7000 (LKB, Швеция), а ход элюирования регистрировали с помощью анализатора Uvicord II 8300 (LKB, Швеция).

Получение меченого А-фактора. а) 100 мкг А-фактора наносили на стенки сосуда, подвергали действию $^3H_2$ и затем смывали 2 мл 1% спирта в хлороформе. Объединенный элюат от 100 таких экспериментов упаривали, остаток растворяли в 30–50 мл метанола, выдерживали несколько минут и вновь упаривали. Такую обработку повторяли семь раз, причем с каждой порцией метанола удалялось ~5 ГБк трития. Остаток хроматографировали в тонком слое (200×200×1 мм) силикагеля LS 5/40 мкм (ЧССР),

применяя для проявления и элюирования вещества из зоны с R_f 0,40 систему ацетон — хлороформ (1 : 5). Элюат дополнительно очищали дважды ТСХ на пластинках Silufol UV 254 (ЧССР) в системе ацетон — хлороформ (1 : 4).

б) После однократного действия $^3H_2$ на 10,5 мг А-фактора, нанесенного на лист фильтровальной бумаги, вещество смывали 50 мл метанола, элюат упаривали, а остаток хроматографировали на колонке (7,5×260 мм) со сферическим силикагелем Silpearl (ЧССР) (фракция 10—20 мкм) в системе метанол — хлороформ; скорость элюции 0,88 мл/мин, время удерживания А-фактора 39 мин, выход 2,69 мг (25,6%). После рехроматографии в тех же условиях выход 1,32 мг (5,45 мкмоль, 12,6%); вещество идентично А-фактору по данным ТСХ, колоночной хроматографии, УФ- и масс-спектрам (ср. [5]).

в) При аналогичном взаимодействии $^3H_2$ с 5,2 мг А-фактора и однократной очистке вещества колоночной хроматографией получили 2,75 мг (11,36 мкмоль) меченого А-фактора (выход 52,8%), который растворяли в 100 мкл сухого пиридина и обрабатывали 29,2 мг 3,5-динитробензоилхлорида (1 мин при 110° С). Затем прибавляли 10 мкл метанола, нагревали до 110° С, тут же охлаждали и упаривали в вакууме. Остаток распределяли между 200 мкл бензола и 100 мкл 1 н. HCl, органический слой промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и упаривали. Остаток хроматографировали на вышеописанной колонке в системе эфир — хлороформ (1 : 25) и пик с временем удерживания 43 мин рехроматографировали в тех же условиях. Получили 2,02 мг (3,2 мкмоль) меченного ^3H производного (II). УФ (MeOH), $\lambda_{макс}$, нм (ε): 228п (29400); УФ (0,1 н. NaOH в MeOH): 228п (29000), 283 (24500); масс-спектр (прибор LKB 9000, Швеция), *m/z*: 630 ($M^{+\cdot}$), 615 $(M-15)^+$, 613 $(M-17)^+$, 600 $(M-30)^+$, 546 $(M-C_6H_{12})^{+\cdot}$, 435 $[M-(NO_2)_2C_6H_3CO]^+$, 418 $[M-(NO_2)_2C_6H_3COOH]^{+\cdot}$, 403 $[M-(NO_2)_2\cdot C_6H_3COOH-2H]^+$, 212$[(NO_2)_2C_6H_3COOH]^{+\cdot}$. Все характеристики меченого и немеченого соединений (II) полностью идентичны. Полученное производное (II) растворяли в 5 мл метанола, прибавляли 10 мкл 19 н. NaOH и через 5 мин при 20° С — 20 мкл AcOH. Смесь упаривали, остаток распределяли между 200 мкл хлороформа и 200 мкл 1 н. HCl и органический слой хроматографировали на колонке, как описано выше. Получили 426 мкг меченого А-фактора, общий выход 1,76 мкмоль (8,2%).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Хохлов А. С., Товарова И. И., Борисова Л. Н., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Корницкая Е. Я., Ивкина Н. С., Рапопорт И. А.* Докл. АН СССР, 1967, т. 177, № 1, с. 232–235.
2. *Товарова И. И., Корницкая Е. Я., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Анисова Л. Н., Хохлов А. С.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1970, № 3, с. 427–434.
3. *Борисова Л. Н., Ивкина Н. С., Гоменюк Л. А.* Докл. АН СССР, 1970, т. 192, № 1, с. 199–202.
4. *Khokhlov A. S., Anisova L. N., Tovarova I. I., Kleiner E. M., Kovalenko L. V., Krasilnikova O. I., Kornitskaja E. Ya., Pliner S. A.* Z. allg. Mikrobiol., 1973, B. 13, № 8, S. 647–655.
5. *Плинер С. А., Клейнер Е. М., Корницкая Е. Я., Товарова И. И., Розынов Б. В., Смирнова Г. М., Хохлов А. С.* Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 1, с. 70–76.
6. *Клейнер Е. М., Плинер С. А., Сойфер В. С., Оноприенко В. В., Балашова Т. А., Розынов Б. В., Хохлов А. С.* Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1142–1147.
7. *Клейнер Е. М., Оноприенко В. В., Плинер С. А., Сойфер В. С., Хохлов А. С.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 3, с. 424–426.
8. *Mori K., Yamane K.* Tetrahedron, 1982, v. 38, № 19, p. 2919–2921.
9. *Onoprienko V. V., Kleiner E. M., Pliner S. A., Soifer V. S., Tovarova I. I., Kornitskaya E. Ja., Khokhlov A. S.* Intern. Symp. on Antibiotics, Weimar (GDR), Abstracts, 1979, p. C-14.
10. *Воронина О. И., Товарова И. И., Хохлов А. С.* Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 7, с. 985–989.
11. *Воронина О. И., Товарова И. И., Хохлов А. С.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1538–1546.
12. *Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов Ан. Н.* Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237–1239.
13. *Смоляков В. С., Петренко А. Г., Ушаков А. Н., Нейман Л. А.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 455–457.

14. *Смоляков В. С., Циренина М. Л., Ушаков А. И., Нейман Л. А.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 284–288.
15. *Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П.* В сб. Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. М., 1982, ч. 1, с. 33–42.

Поступила в редакцию
24.VI.1983

PREPARATION OF LABELED A-FACTOR

NEIMAN L. A., ONOPRIENKO V. V., SMOLYAKOV V. S.,
SOIFER V. S., TRETYAKOVA S. Yu., KHOKHLOV A. S.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Thermal activation of tritium gas is used for preparation of [G-^{3}H]-A-factor. Molar activity of the labeled compound is in the range of 10–150 GBk/mmol (0,25–4 Ci/mmol).