



УДК 547.466:543.544

ОДНОСТАДИЙНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ТИМИДИНМОНОФОСФАТА

© 1996 г. Г. В. Сидоров[#], Н. Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 46

Поступила в редакцию 13.03.95 г. После доработки 02.10.95 г.

Изучены реакции восстановления протием и тритием в растворе и без растворителя (твердофазное каталитическое восстановление) 5-гидроксиметил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфата и 5-формил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфата и твердофазная реакция изотопного обмена тимидинмонофосфата с тритием. Проведена количественная оценка выхода различных продуктов, получаемых при восстановлении 5-гидроксиметил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфата протием. Оптимальным среди исследованных методов является восстановление этого соединения тритием в твердой фазе. Этим методом получены препараты меченого тритием тимидинмонофосфата с молярной радиоактивностью до 68 Ки/ммоль.

Ключевые слова: 5-гидроксиметил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфат, 5-формил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфат, [³H]тимидин-5'-монофосфат, водород, тритий, каталитическое восстановление, изотопный обмен.

Согласно разработанной нами схеме получения меченных тритием тимидиновых производных, на первой стадии метка вводится в тимин [1]. При этом использование различных предшественников для введения трития приводит к препаратам, содержащим в молекуле тимина от одного до четырех атомов трития ($A_{\text{мол}}$ до 100 Ки/ммоль). Далее, применяя различные ферментативные реакции, последовательно получают меченные тритием тимидин [2], тимидин-5'-монофосфат и/или тимидин-5'-трифосфат [3]. Преимуществом последовательных ферментативных реакций является высокая чистота получаемых препаратов, обусловленная высокой субстратной специфичностью ферментов. К недостаткам можно отнести многостадийность, обуславливающую потерю меченого препарата на каждой стадии. Цель настоящей работы – разработка одностадийного метода получения меченого тритием TMP.

Для осуществления указанной цели изучали реакции восстановления протием и тритием в растворе и без растворителя (твердофазное каталитическое восстановление) hm-dUMP и f-dUMP и твердофазную реакцию изотопного обмена TMP с тритием, определяя влияние условий реакции на выход и молярную радиоактивность целевого соединения.

Сокращения: $A_{\text{мол}}$ – молярная радиоактивность, hm-dUrd и hm-dUMP – 5-гидроксиметил-2'-дезоксисуридин и его 5'-монофосфат соответственно; f-dUMP – 5-формил-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфат; ТКВ – твердофазное каталитическое восстановление, -dRibP – 2-дезокси-β-D-рибофуранозил-5-фосфат.

[#] Автор для переписки.

Описаны достаточно надежные методики химического синтеза hm-dUMP из dUMP [4, 5]. Представляет также интерес использование для его получения ферментативного фосфорилирования более доступного предшественника, а именно hm-dUrd, осуществляемое, например, фосфотрансферазой, предложенной для 5'-фосфорилирования тимидина [6]. Для синтеза f-dUMP нами была выбрана реакция окисления гидроксиметильной группы hm-dUMP по аналогии с реакцией окисления 5-гидроксиметилурацила до 5-формилурацила [7].

Возможные продукты восстановления hm-dUMP водородом приведены на схеме. Известно, что для пиримидинов помимо реакции восстановления 5-гидроксиметильной группы характерна параллельная реакция гидрирования 5,6-двойной связи [8]. При восстановлении гидроксиметильной группы hm-dUMP (I) образуется TMP (II), который при дальнейшем восстановлении дает 5,6-дигидро-TMP (III). При гидролизе последнего образуется 3-(N¹-2'-дезоксип-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомаляновая кислота (IV). В зависимости от условий реакции (среда, природа катализатора) может также идти преимущественное восстановление пиримидинового ядра с образованием 5-гидроксиметил-5,6-дигидро-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфата (V), который при гидролизе может дать 2'-гидрокси-3-(N¹-2'-дезоксип-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомаляновую кислоту (VI). Дальнейшее восстановление последней приводит к образованию упоминавшегося выше производного (IV).

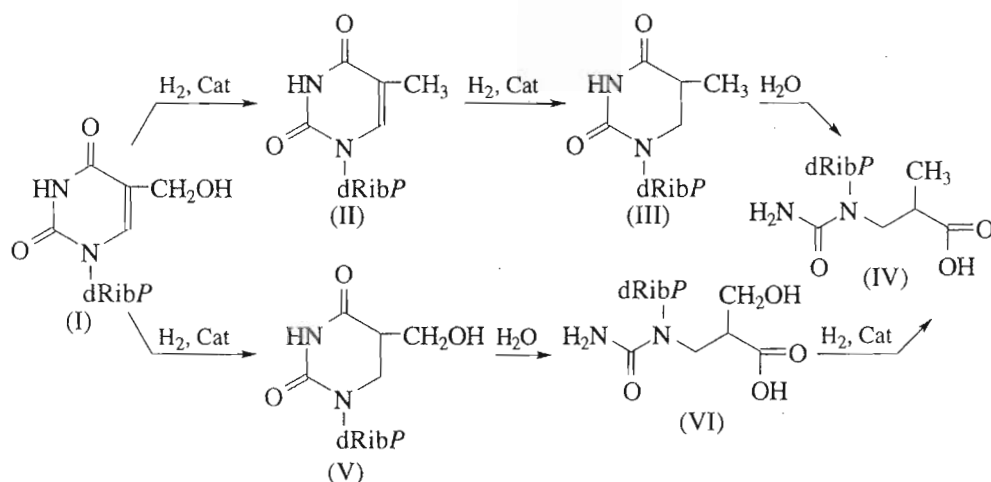


Схема. Продукты восстановления hm-dUMP (I) противом: TMP (II); 5,6-дигидро-TMP (III); 3-(N¹-2'-дезоксидезокси-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомасляная кислота (IV); 5-гидроксиметил-5,6-дигидро-2'-дезоксидезоксиуридин-5'-монофосфат (V); 2'-гидрокси-3-(N¹-2'-дезоксидезокси-5'-фосфо-β-D-рибофуранозил)уреидоизомасляная кислота (VI).

5,6-Дигидропиримидины (III) и (V) идентифицировали по отсутствию характерного для пиримидинов максимума поглощения (260–280 нм) в УФ-спектре. Существенное различие спектров УФ-поглощения модельных соединений (тимин и 5,6-дигидротимин) дало возможность количественно оценить содержание в смеси производных урацила типа (I) и (II), с одной стороны, и 5,6-дигидропроизводных (III) и (V) – с другой. 5,6-Дигидропроизводные пиримидинов идентифицировали на ТСХ-пластинках по образованию характерного желтого окрашивания при обработке хроматограмм специальными реагентами [9] (см. “Экспериментальную часть”). Таким образом, по спектру УФ-поглощения и данным ТСХ идентифици-

ровали соединения, изображенные на схеме, и проводили количественную оценку их содержания в реакционной смеси.

Так, например, при проведении реакции восстановления в 25% уксусной кислоте над PtO₂ идет восстановление гидроксиметильной группы и 5,6-двойной связи с образованием TMP (II) и его 5,6-дигидропроизводного (III) в равных количествах. Над катализаторами Rh/Al₂O₃ и Ru/Al₂O₃ восстанавливается в основном 5,6-двойная связь, приводя к соответствующему 5,6-дигидропроизводному (V) с дальнейшим образованием производного уреидоизомасляной кислоты (VI). Аналогичным образом анализировали все полученные данные, которые суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Состав смеси продуктов* восстановления hm-dUMP водородом (в скобках приблизительный выход, %) в различных средах (продолжительность реакции 2 ч)

Среда	Катализаторы**				
	A	B	C	D	E
5% CH ₃ COOH	II (100)	I (50) II (50)	VI (100)	VI (100)	II (100)
25% CH ₃ COOH	I (30) II (70)	I (70) II (30)	I (30) V (20) VI (50)	I (40) V (20) VI (40)	II (50) III (50)
50% CH ₃ COOH	I (50) II (50)	I (80) II (20)	I (30) III (10) IV (60)	I (30) III (10) IV (60)	
Диоксан-CH ₃ COOH-вода, 75 : 24 : 1	I (90) II (10)	I (100)	III (3–5) V (3–5) IV и VI (80–90)	V (3–5) VI (90–95)	II (30) III (70)

* Структуру соединений (I)–(VI) см. на схеме 1.

** Обозначения катализаторов: А – 6% Pd/BaSO₄; В – 5% Pd/BaSO₄ (Fluka); С – 5% Rh/Al₂O₃ (Koch-Light); D – 5% Ru/Al₂O₃ (Koch-Light); E – PtO₂ (Merck).

Из данных табл. 1 следует, что над катализаторами на основе палладия и платины (А, В и Е) с увеличением кислотности среды падает выход целевого соединения (II). В среде с малым содержанием воды выход ТМР еще меньше. В средах с низкой кислотностью над катализаторами С и D восстанавливается главным образом 5,6-двойная связь hm-dUMP, а при повышении кислотности — гидроксиметильная группа с последующим гладким восстановлением 5,6-двойной связи образующегося ТМР. По-видимому, при уменьшении продолжительности восстановления на катализаторах С и D в сильнокислой среде и точном контроле объема поглощенного водорода можно остановить реакцию на стадии образования ТМР. Однако практически осуществить это довольно трудно, поскольку в реакцию берут большой избыток водорода. Например, в наших реакционных условиях (см. табл. 1 и "Экспериментальную часть") поглощение исходным соединением эквимольного количества водорода привело бы к уменьшению давления в реакционном сосуде примерно на 1–2%. Кроме того, при радиохимическом синтезе важен не столько выход $[^3\text{H}]\text{TMP}$, сколько его молярная радиоактивность и радиохимический выход в опыте. Поэтому окончательный ответ на вопрос об оптимальных условиях проведения реакции могут дать только эксперименты с высокопроцентным тритием (см. табл. 2).

Из табл. 2 видно, что, как правило, при проведении реакции в растворе высоким выходам $[^3\text{H}]\text{TMP}$ отвечают низкие величины $A_{\text{мол}}$. Наилучшие результаты были достигнуты в среде диоксан — уксусная кислота — вода в присутствии катализатора А. В этих условиях молярная радиоактивность полученного соединения отвечает включению в молекулу одного атома трития со степенью изотопного замещения 41%.

Из результатов опытов по восстановлению f-dUMP тритиево-протиевой смесью до $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (табл. 3) следует, что восстановление 5-формильной группы (как и 5-гидроксиметильной группы hm-dUMP) происходит только в кислой среде. В нейтральном водном растворе выход продукта восстановления очень мал (опыт 4), а в щелочной среде реакция практически не идет (опыт 5). Уменьшение кислотности среды приводит к увеличению включения трития и практически не изменяет выход $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (опыты 1–3). Сходный эффект наблюдается при использовании менее сильной кислоты (опыты 8 и 9). При этом снижение концентрации уксусной кислоты не меняет существенно выход и включение трития в $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (опыты 6–8). Проведение реакции в неводном растворе не дает заметного выигрыша в величине $A_{\text{мол}}$ (опыты 10–14).

Таким образом, для синтеза $[^3\text{H}]\text{TMP}$ из f-dUMP условия опытов 2, 3, 8 и 12 наиболее под-

Таблица 2. Восстановление hm-dUMP тритием до $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (продолжительность реакции 2 ч)

Катализатор*	Растворитель	Продолжительность реакции, мин	Характеристики $[^3\text{H}]\text{TMP}$	
			Выход, %	$A_{\text{мол}}$, Ки/ммоль
Е	50% CH_3COOH	120	53,4	0,11
Е	Диоксан— CH_3COOH , 1 : 1	120	78	1,10
С	50% CH_3COOH	30	24	3,30
А	5% CH_3COOH	120	68	1,6
А	Диоксан— CH_3COOH —вода, 75 : 24 : 1	120	8,5	11,9
С	—	30	6,0	3,9
F**	—	20	3,1	20,5
G**	—	30	10,2	68,5

* Обозначения катализаторов: F — 5% Pd/BaSO₄; G — 7% Pd/BaSO₄.

** Реакция в твердой фазе при 170°C.

Таблица 3. Восстановление 5-f-dUMP тритиево-протиевой (1 : 1000) смесью до $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (продолжительность реакции 2 ч)

Опыт	Растворитель	Характеристики $[^3\text{H}]\text{TMP}$	
		Выход, %	$A_{\text{мол}}$, Ки/ммоль
1	0,1 н. HCl	25	23
2	0,01 н. HCl	21	50
3	0,001 н. HCl	23	55
4	Вода	4	20
5	0,1 н. NH ₄ OH	—	—
6	Лед. CH_3COOH	13	50
7	95% CH_3COOH	14	52
8	50% CH_3COOH	13	60
9	50% HCOOH	31	17
10	0,1 н. HCl в MeOH	27	20
11	0,01 н. HCl в MeOH	18	14
12	MeOH— CH_3COOH , 1 : 1	12	60
13	MeOH—HCOOH, 1 : 1	46	34
14	Диоксан— CH_3COOH —H ₂ O, 75 : 24 : 1	9	29

ходящи. При восстановлении f-dUMP высокопроцентным тритием в условиях опыта 2 (табл. 3) был получен $[^3\text{H}]\text{TMP}$ (6,0 Ки/ммоль, выход 19%) и выделен меченный тритием hm-dUMP (3,7 Ки/ммоль, выход 26%).

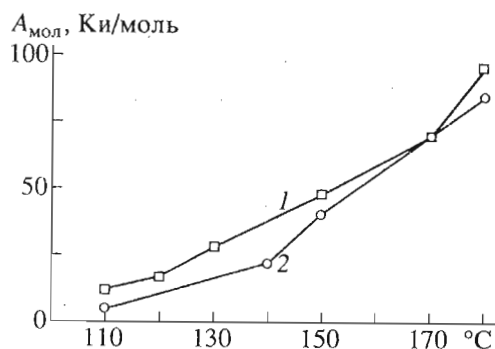


Рис. 1. Зависимость от температуры величины $A_{\text{мол}}$ для $[^3\text{H}]\text{TMP}$, получаемого в каталитической твердофазной реакции hm-dUMP (1) и TMP (2) с тритием. Время реакции 30 мин.

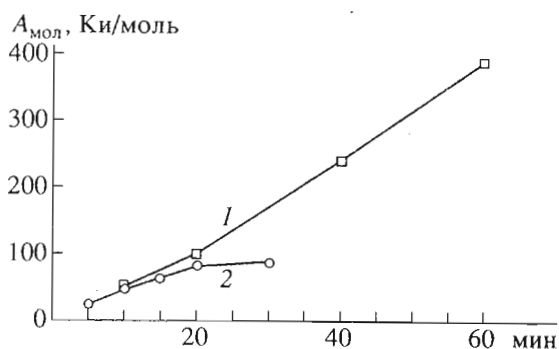


Рис. 2. Зависимость величины $A_{\text{мол}}$ для $[^3\text{H}]\text{TMP}$, получаемого в каталитической твердофазной реакции hm-dUMP (1) и TMP (2) с тритием, от продолжительности проведения реакции при 170°C .

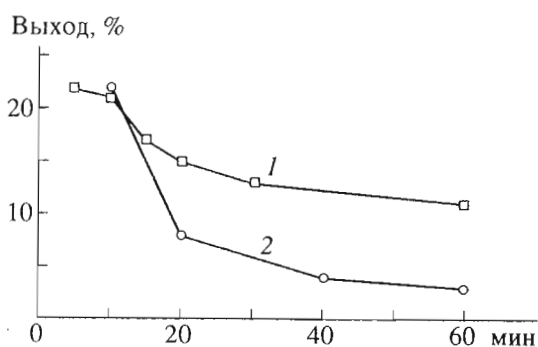


Рис. 3. Зависимость выхода $[^3\text{H}]\text{TMP}$, получаемого в каталитической твердофазной реакции hm-dUMP (1) и TMP (2) с тритием, от продолжительности проведения реакции при 170°C .

Далее были изучены твердофазные каталитические реакции hm-dUMP и TMP с газообразным тритием. Проведенные исследования показали, что с ростом температуры растет включение трития в TMP (рис. 1). Однако выше 170°C протекает сильная деструкция: в продуктах реакции остается менее 5% целевого соединения.

Согласно рис. 2 и 3, проведение реакции более 30 мин нецелесообразно. $[^3\text{H}]\text{TMP}$, получаемый из hm-dUMP за это время, имеет практически максимальную величину $A_{\text{мол}}$. При увеличении продолжительности реакции происходит накопление продукта гидрирования 5,6-двойной связи (III) и производного β -уреидоизомасляной кислоты (IV) (схема), а также различных продуктов разложения (по-видимому, вследствие разрыва N-гликозидной и фосфоэфирной связей) с высокой молярной радиоактивностью, по свойствам близких к целевому соединению, что затрудняет дальнейшую очистку последнего.

В табл. 2 приведены также результаты изучения твердофазной реакции hm-dUMP с тритием. Обращает на себя внимание различие в выходах и величинах $A_{\text{мол}}$ препаратов $[^3\text{H}]\text{TMP}$, получаемых с использованием разных партий палладиевого катализатора. По-видимому, над более активным катализатором F наряду с гидроксиметильной группой восстанавливается также 5,6-двойная связь пиримидинового кольца. Этот процесс сопровождается сильной деструкцией целевого соединения и объясняет низкий выход $[^3\text{H}]\text{TMP}$. Мы предполагаем, что скорость восстановления в этих условиях существенно выше скорости изотопного обмена трития с протонами гидроксиметильной группы. Поэтому молярная радиоактивность меченного тритием TMP отвечает включению одного атома трития со степенью изотопного замещения около 70%. Молярная активность $[^3\text{H}]\text{TMP}$ в случае применения катализатора G отвечает включению более двух атомов трития. Вероятно, при использовании менее активного катализатора наряду с реакцией восстановления гидроксиметильной группы протекает параллельная реакция изотопного обмена трития с протонами этой группы. Аналогичный эффект наблюдали и при восстановлении 5-гидроксиметилурацила в твердой фазе [1].

Сравнение использованных подходов к одностадийному синтезу $[^3\text{H}]\text{TMP}$ показывает, что проведение реакции восстановления hm-dUMP и f-dUMP в растворе не дает преимущества перед аналогичной реакцией в твердой фазе с точки зрения выхода и величины $A_{\text{мол}}$ целевого соединения. Так, оптимальным, с нашей точки зрения, следует считать вариант получения меченного тритием TMP восстановлением hm-dUMP в твердой фазе при 170°C над катализатором 7% Pd/BaSO_4 в течение 30 мин ($A_{\text{мол}}$ 68.5 Ки/ммоль, выход 10.2%). В тех случаях, когда требуются препараты с более высокой молярной радиоактивностью, необходимо использовать в качестве предшественника меченный тритием тимин ($A_{\text{мол}}$ до 100 Ки/ммоль) и энзиматические реакции, о которых говорилось выше. Применение 2'-[2- ^3H]дезоксирибозы в качестве донора 2'-дезоксирибозы на стадии превращения тимина в тимидин позволяет получать препараты с $A_{\text{мол}}$ выше 110 Ки/ммоль [1].

Все полученные описанными выше методами препараты [^3H]TMP имели чистоту более 97%, измеренную с помощью тонкослойной радиохроматографии в перечисленных ниже системах растворителей. Чистота полученных препаратов была подтверждена при ферментативном превращении их в [^3H]TTP. При этом молярная радиоактивность полученного [^3H]TTP практически не отличалась от аналогичной величины для исходного соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обозначения катализаторов даны в табл. 1 и 2. Катализаторы А, F и G были приготовлены согласно процедуре, описанной в [10]. Исследование реакций восстановления и изотопного обмена (0.01% тритий) и синтез меченых препаратов (95–97% тритий) проводили на установке для работы с газообразным тритием [11].

Тимин, 5,6-дигидротимин, dUMP и hm-dUrd – препараты производства Sigma. ТСХ осуществляли, используя пластинки с целлюлозой F (Merck) и следующие смеси растворителей: *трет*-бутиловый спирт–метилэтилкетон–вода–аммиак, 4 : 3 : 2 : 1 (А), этанол–1 М ацетат аммония, 5 : 2 (Б), *втор*-бутиловый спирт–вода, 77 : 23 (В), бутанол–уксусная кислота–вода, 2 : 1 : 1 (Г), а также пластинки с PEI–целлюлозой (Merck) и 1 М NaCl и воду в качестве растворителей.

Жидкостную колоночную хроматографию проводили на колонках (32 × 450 мм и 16 × 275 мм) с дауэксом 1 × 8 (Serva) в формиатной форме (элюция раствором муравьиной кислоты с различной концентрацией) и с целлюлозой DE-32 (16 × 250 мм; Whatman; элюция 0.05 М TEAB, pH 8.6).

ВЭЖХ осуществляли, используя колонку Serapop SGX C18 (7 мкм, 3.3 × 150 мм) с предколоночной размером 3.3 × 50 мм. Подвижная фаза – 2% ацетонитрила в 0.1 М TEAB (pH 7.0), элюция 0.5 мл/мин, давление 75 атм.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spescord M-40. Радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике СЖС-04к со сцинтилляционной жидкостью ЖС-8 (НПО “Монокристаллпреактив”). Растворители очищали по стандартным методикам.

Фосфотрансфераза из моркови (КФ 2.7.1.77; НИКТИ Б.В., Новосибирск) имела следующие характеристики: удельная фосфотрансферазная активность 216 ед/мг белка, содержание белка – 0.37 мг в 1 мг препарата.

Синтез hm-dUMP исходя из dUMP [5]. В запаянной ампуле нагревали 5 сут при 50°C 800 мг (1.9 ммоль) динатриевой соли dUMP и 500 мг (16.7 ммоль) параформа в 1.2 мл 1 н. HCl. Реакционную смесь переносили в круглодонную колбу и

отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса. Остаток смешивали с 20 мл воды, фильтровали через бумажный фильтр и из фильтрата выделяли hm-dUMP на колонке (32 × 450 мм) с дауэксом 1 × 8 с элюцией 1 М HCOOH. По аналогии с работами [4, 5] продукт, выходящий перед исходным соединением, был идентифицирован как hm-dUMP. Фракции, соответствующие hm-dUMP, объединяли, упаривали в вакууме при 36°C. Муравьиную кислоту удаляли отгонкой с водой и затем 5 раз с 50% этанолом. Было получено 240 мг (0.71 ммоль, 37.4%) hm-dUMP. Хроматографические и УФ-спектральные характеристики полученного соединения соответствовали литературным [4, 5].

Синтез hm-dUMP из hm-dUrd. Реакционную смесь, содержащую 5.9 мг hm-dUrd, 670 мг *n*-нитрофенилфосфата (Sigma), 7.7 мл калий-фосфатного буфера (0.05 М, pH 5.2) и 0.77 мг фосфотрансферазы из моркови, инкубировали 1 ч при 38°C и экстрагировали эфиром 6 раз по 10 мл. Целевое соединение выделяли из водного слоя на дауэксе 1 × 8 (16 × 275 мм). Колонку промывали водой (100 мл), затем 4 н. муравьиной кислотой. Собирали фракции, соответствующие hm-dUMP, удаляли муравьиную кислоту как описано выше. Выход hm-dUMP 72%. Соединение было хроматографически однородным. УФ-спектральные характеристики соответствовали литературным [4, 5].

Синтез f-dUMP. В колбе на 5 мл смешивали раствор 33.6 мг (0.1 ммоль) hm-dUMP в 0.5 мл воды с 0.5 мг (3 мкмоль) азотнокислого серебра и 54 мг (210 ммоль) персульфата калия и выдерживали 30 мин при 38°C. Реакционную смесь разбавляли водой до 5 мл и выделяли целевое соединение на колонке с дауэксом 1 × 8 (16 × 275 мм, элюция 1.0 н. HCOOH). Продукт, выходящий после исходного соединения, проявлял характерную реакцию “серебряного зеркала”, а при восстановлении водородом давал TMP и был идентифицирован как f-dUMP. Было выделено 720 ОЕ₂₈₀ (pH 2, λ_{max} 280 нм) f-dUMP. Соединение хроматографически однородно при испытании в четырех системах растворителей (табл. 4); УФ-спектральные характеристики приведены в табл. 5.

Реакции восстановления в растворе. В реакционную ампулу из стекла помещали раствор предшественника в подходящем растворителе и навеску катализатора (табл. 1–3). Ампулу присоединяли к установке для работ с газообразным тритием, содержимое ампулы замораживали в жидком азоте, вакуумировали и заподляли газом до давления 300 мм рт. ст. После размораживания перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре. Через 2 ч газ из ампулы удаляли, катализатор отделяли фильтрованием.

Таблица 4. Хроматографическая подвижность (R_f) соединений на пластинках с целлюлозой F в смесях растворителей А-Г*

Соединение	Смеси растворителей			
	А	Б	В	Г
dUMP	0.09	0.25	0.03	0.39
hm-dUMP	0.10	0.23	0.03	0.33
TMP	0.13	0.32	0.15	0.47
f-dUMP	0.15	0.20	0.10	0.35

* Состав смесей – см. "Экспериментальную часть".

Таблица 5. Некоторые характеристики спектра УФ-поглощения синтезированных соединений

Соединение	pH	λ_{\max} , нм	λ_{\min} , нм	$\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$
hm-dUMP	2	264	232	0.71	0.59
	12	264	245	0.82	0.55
f-dUMP	2 и 7	282	252	0.67	2.15
	12	286	262.5	1.38	1.80

Лабильный тритий удаляли упариванием с 50% этанолом (3 × 10 мл).

Реакция восстановления без растворителя. В реакционную ампулу из стекла помещали твердую смесь исходного соединения и катализатора. Ампулу присоединяли к установке для работ с газообразным тритием, откачивали и вводили газообразный тритий или тритиево-протиевую смесь (1 : 1000). Ампулу термостатировали при выбранной температуре, охлаждали и удаляли из ампулы избыток трития. Проводили очистку от лабильного трития как описано выше.

Для обнаружения 5,6-дигидропроизводных использовали методику, предложенную в работе [9]. После проведения реакции восстановления и анализа реакционной смеси методом ТСХ опрыскивали хроматограмму 1 н. NaOH, высушивали и опрыскивали раствором, содержащим 1 г *n*-диметиламинобензальдегида (перекристаллизованного из этанола), 10 мл конц. соляной кислоты и 100 мл этанола. После высушивания при 50°C производные 5,6-дигидросоединений дают желтое окрашивание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sidorov G.V., Myasoedov N.F. // J. Radioanal. Nucl. Chem. Articles. 1988. V. 121. P. 461–467.
2. Иванькова Е.К., Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 1981. Т. 23. С. 296–300.
3. Мясоедов Н.Ф., Кузнецова О.Б., Иванькова Е.К., Сидоров Г.В., Соболева О.Ю. // Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Сборник докладов. Прага, ЧКАЕ, 1977. С. 125–132.
4. Alegria A.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 149. P. 317–324.
5. Maley F. // Arch. Biochem. Biophys. 1962. V. 96. P. 550–558.
6. Harvey C.L., Clericuzio E.M.E., Nussbaum A.L. // Anal. Biochem. 1970. V. 36. P. 413–421.
7. Brossmer R., Ziegler D. // Tetrahedron Lett. 1966. V. 28. P. 5253–5256.
8. Cline R.E., Fink R.M., Fink K. // J. Am. Chem. Soc. 1959. V. 81. P. 2521–2530.
9. Fink R.M., Cline R.E., McGaughey C., Fink K. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 4–10.
10. Mazingo R. // Org. Syn. 1955. P. 685–691.
11. Михайлов К.С., Лавров О.В., Мясоедов Н.Ф. // Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Сборник докладов. Прага, ЧКАЕ, 1977. С. 253–258.

Single-Step Methods for Preparation of Tritium-Labeled Thymidine Monophosphate

G. V. Sidorov¹ and N. F. Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 46, Moscow, 123182 Russia

Abstract—Reduction of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate and 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate by protium and tritium in solution and without solvent (solid-phase catalytic reduction) and the isotope exchange solid-phase reaction of thymidine phosphate with tritium were studied. Yields of various products obtained upon the reduction of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate with protium were determined. Solid-phase reduction of this compound with tritium is optimum among the methods tried. Using this method, tritium-labeled thymidine 5'-phosphate preparations with a molar radioactivity of up to 68 Ci/mmol were obtained.

Key words: 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, [³H]thymidine 5'-monophosphate, hydrogen, tritium, catalytic reduction, isotope exchange.

¹ To whom correspondence should be addressed.