



УДК 546.11.027.3:543.422.27:577.112.4.088.53:577.334

ПРОСТОЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ РАДИОАКТИВНЫХ  
НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

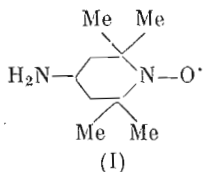
Нейман Л. А., Антропова Л. П., Плужников Ю. А.

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

Действием термически активированного газообразного трития получен радиоактивный 4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (темпамин), пригодный для введения спиновой метки в белки.

Метод спиновых меток широко используется в исследованиях структуры и функции биологически активных соединений [1, 2]. С помощью ковалентно связанных с белком парамагнитных нитроксильных радикалов (пиперидин-1-оксилы, пирролин-1-оксилы, пирролидин-1-оксилы) можно получать весьма ценные сведения о конформации белков и пространственных аспектах их взаимодействия с рецепторами или низкомолекулярными лигандами, особенно в тех случаях, когда спиновая метка селективно введена по идентифицированным аминокислотным остаткам (см., например, [3, 4]).

Определение положения спин-меченых остатков осложняется тем, что при получении пептидных гидролизатов и анализе меченых пептидов трудно избежать элиминирования (главным образом восстановления) парамагнитных радикалов. Например, при модификации нейротоксина II яда кобры *Naja naja oxiana* 4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксидом (темпамином) (I) в присутствии водорастворимого карбодиимида был выделен ряд спин-меченых производных, однако спиновую метку удалось локализовать лишь в производном, полученном с наибольшим выходом (модифицированном по остатку Glu<sup>2</sup>) [5]. Использование реагентов, содержащих радиоактивную метку в «ножке» [6] или в самом парамагнитном радикале, может облегчить как количественную оценку числа введенных в молекулу биополимера спиновых меток, так и определение их положения.



В настоящей работе описан экспрессный способ введения тритиевой метки в темпамин. Этот способ основан на использовании метода термической активации газообразного трития, с помощью которого ранее были успешно получены меченые биополимеры, их модификаторы и низкомолекулярные биорегуляторы [7–9]. Метод позволяет исходить из готового немеченого соединения и не связан с его модификацией, а примененный нами улучшенный вариант этого метода (нанесение исходного вещества на бумажную подложку — ср. [9–11]) повышает как химический и радиохимический выход продукта, так и его молярную радиоактивность.

Взаимодействие термически активированных атомов трития с темпамином проводили аналогично описанному ранее [9, 11]. После элюирования продукта с бумажной подложки лабильный тритий, количество которого достигает 90% от всего введенного трития, удаляли многократным упариванием с этанолом. Суммарная радиоактивность меченого препара-

та после этого составила  $\sim 8$  мКи, причем с подложки удастся элюировать  $\sim 50\%$  исходного количества темпамина (данные УФ-спектра).

Меченый препарат очищали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Удельная радиоактивность [ $^3\text{H}$ ]темпамина составила  $\sim 0,2$  Ки/ммоль; концентрацию продукта определяли по УФ-спектру.

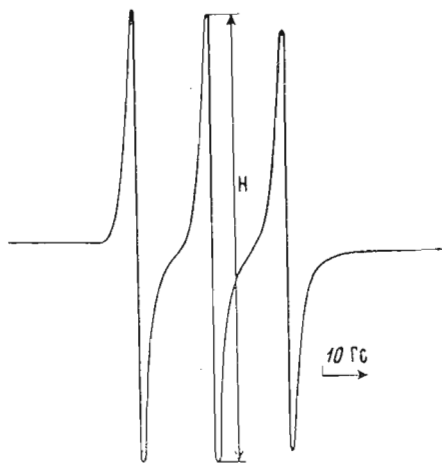
Полученный радиоактивный продукт и исходный темпамин имели идентичные спектры ЭПР, поэтому для количественной оценки содержания нитроксильных радикалов в тритированном образце мы воспользовались величинами интенсивностей центральных компонентов (рисунок). Данные спектров ЭПР показали, что меченый тритием темпамин полностью сохранил парамагнетизм исходного соединения.

Этот результат весьма примечателен с точки зрения реакционной способности термически активированных атомов трития. Хотя для замещенных пиперидин-1-оксидов известны целый ряд реакций, затрагивающих только функциональные группы, но не парамагнитный центр, при каталитическом гидрировании 4-окси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксидов, содержащих алкенильные и алкильные заместители, на платиновой черни или никеле Ренея в первую очередь насыщаются парамагнитные центры и лишь затем ацетиленовые и этиленовые связи [12]. Для активированных же атомов трития реакции присоединения по кратным связям протекают легче, чем реакции замещения Н на  $^3\text{H}$  (изотопный обмен) (см., например, [13]). Поэтому сохранение парамагнитного центра в меченом темпамине (в котором прошло замещение Н на  $^3\text{H}$ ) является нетривиальным и, по-видимому, свидетельствует о сходстве между реакцией пиперидин-1-оксидов с термически активированным газообразным тритием и каталитическим гидрированием этих свободных радикалов на палладиевой черни, при котором радикальный центр насыщается позднее кратных связей (ср. [12]).

В заключение следует отметить, что по своей молярной радиоактивности [ $^3\text{H}$ ]темпамин, полученный действием термически активированного трития, является подходящим для определения положения спиновых меток на уровне нескольких десятых наномоль, что весьма существенно для труднодоступных белковых объектов. Можно полагать, что метод, описанный в настоящей работе, пригоден для введения тритиевой метки не только в темпамин, но и в другие стабильные пиперидин-1-оксильные и пирролидин-1-оксильные радикалы, причем особенно высоких значений молярной радиоактивности и радиохимического выхода следует ожидать для тех из них, молекулы которых не содержат заместителей с подвижными атомами водорода.

### Экспериментальная часть

Реакцию темпамина с активированными атомами трития проводили в установке, описанной ранее [7]. Раствор 5 мг темпамина (Reanal, ВНР) в 1,5 мл абс. этанола с помощью автоматической микропипетки равномерно наносили на лист (220 $\times$ 100 мм) фильтровальной бумаги ФНС, который предварительно был тщательно промыт этим же растворителем. Высушенной бумагой выстилали стенки реакционного сосуда, который вакуумировали до 0,1 Па. Затем в сосуд вводили  $\sim 1,85$  ГБк ( $\sim 50$  мКи) газообразного трития («Изотоп», СССР) и на вольфрамовую нить внутри



Спектр ЭПР 4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида. Стрелкой показана интенсивность центральной компоненты (H)

сосуда подавали напряжение, нагревая ее до 2200 К в течение 30 с при одновременном охлаждении наружных стенок сосуда жидким азотом. Затем сосуд вновь вакуумировали до 0,1 Па и реакцию с  $^3\text{H}_2$  проводили аналогично еще дважды (порции по  $\sim 1,85$  ГБк). Полученные продукты смывали с бумаги 75 мл абс. этанола; элюат, суммарная радиоактивность которого составляла  $\sim 70$  мКи, упаривали на ротормном испарителе, повторяя эту операцию еще трижды со свежими порциями этанола. Суммарная радиоактивность после этих операций составляла  $\sim 10$ ,  $\sim 8,5$ ,  $\sim 8$  и  $\sim 8$  мКи.

Продукты разделяли ТСХ на силикагеле (готовые пластинки Kieselgel 60 фирмы Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — аммиак (10 : 5 : 0,1). После препаративной ТСХ [ $^3\text{H}$ ]темпамин ( $R_f$  0,56) элюировали метанолом. Выход продукта 0,7 мг (14%).

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР), спектры ЭПР — на спектрометре Varian E 109 (США). Для растворения образцов использовали этанол. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Beckman LS9800 (Австрия) в сцинтилляторе Ready-Solv. Концентрацию темпамина рассчитывали по спектрам поглощения, используя экспериментально найденный коэффициент молярного поглощения в этаноле  $\epsilon_{250}$  2052.

Авторы выражают глубокую признательность члену-корреспонденту АН СССР В. Т. Иванову и В. И. Цетлину за проявленный ими интерес к работе и помощь в ее осуществлении и С. А. Козьмину за снятие спектров ЭПР.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лизгенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974.
2. Берлинер Л. Метод спиновых меток. М.: Мир, 1979.
3. Уткин Ю. Н., Пашков В. С., Плужникова К. А., Курятов А. Б., Арсеньев А. С., Цетлин В. И. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 437–449.
4. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47–52.
5. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. V., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Toxicon, 1982, v. 20, № 1, p. 83–93.
6. Price N. C. FEBS Lett., 1973, v. 36, № 3, p. 351–354.
7. Шишков А. В., Филагов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов А. Н. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237–1239.
8. Смоляков В. С., Петренко А. Г., Ушаков А. Н., Нейман Л. А. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 455–457.
9. Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Сойфер В. С., Третьякова С. Ю., Хохлов А. С. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 116–120.
10. Нейман Л. А., Смоляков В. С., Антропова Л. П. В кн.: Органические соединения меченные радиоактивными изотопами. М.: ЦНИИатоминформ, 1982, ч. 1, с. 32–42.
11. Нейман Л. А., Антропова Л. П., Конуп И. П., Чепелев В. М., Назаров Е. И. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 121–124.
12. Литвин Е. Ф., Козлова Л. М., Шапиро А. Б., Фрейдлин Л. Х., Розанцев Э. Г., Скрипиченко Л. Н. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1979, № 1, с. 109–114.
13. Макаров В. А., Филагов Э. С., Несмеянов А. Н. Химия высоких энергий, 1969, т. 3, № 5, с. 413–420.

Поступила в редакцию  
18.VII.1984

#### A FACILE METHOD FOR PREPARING RADIOACTIVE NITROXYL RADICALS

NEIMAN L. A., ANTROPOVA L. P., PLUZHNIKOV K. A.

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

Radioactive 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempamine), suitable for protein spin labeling, has been prepared using thermally activated gaseous tritium.