

УДК 546.100.02.3:547.15/17

СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ *N*-МЕТИЛ-*D*-АСПАРТАТА© 2021 г. В. П. Шевченко<sup>1,\*</sup>, Л. А. Андреева<sup>1</sup>, И. Ю. Нагаев<sup>1</sup>, академик РАН Н. Ф. Мясоедов<sup>1</sup>

Поступило 11.07.2021 г.

После доработки 13.09.2021 г.

Принято к публикации 16.09.2021 г.

Изучено влияние температуры, соотношения катализатор–NMDA и времени проведения реакции на эффективность включения дейтерия в NMDA. Установлено, что при температурах выше 180°C изменение включения метки в NMDA меняется незначительно. Та же закономерность наблюдается при изменении времени реакции. Увеличение времени от 5 до 15 мин увеличивает включение дейтерия на 2–3%. Найдены условия реакции, при которых все атомы протия замещались на дейтерий более чем в трети молекул NMDA. Изменяя соотношение дейтерий–NMDA, оказалось возможным менять содержание дейтерия в веществе. При проведении реакции с газообразным дейтерием с препаративным количеством NMDA в среднем в молекулу аминокислоты включалось 2.76 атома дейтерия.

**Ключевые слова:** *N*-метил-*D*-аспарат (NMDA), дейтерий, синтез, меченые соединения

**DOI:** 10.31857/S2686953521050174

Известно, что правильное функционирование ионных каналов положительно влияет на когнитивные характеристики работы мозга. Нарушение же функционирования ионных каналов может привести к различным патологиям, среди которых болезнь Паркинсона, паралич, эпилепсия [1]. Для оценки процессов, возникающих при работе ионных каналов, используется меченный изотопами водорода *N*-метил-*D*-аспарат (NMDA), который является лигандом ионотропного рецептора глутамата [2–4].

Введение дейтерия в аминокислоты возможно различными методами [5–7]. При использовании изотопного обмена при нагревании без использования растворителя, как правило, удается получить соединения с наибольшим содержанием изотопа водорода [8, 9]. Преимуществом твердофазного введения изотопов водорода в аминокислоты является то, что не происходит изомеризации оптически активных центров в молекулах этих соединений [9].

Включение дейтерия в *N*-метил-*D*-аспарат контролировали масс-спектрометрическим методом на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США) с ионизацией электрораспылением, детектированием масс-спектров в отрицательно заряженных ионах и прямым вводом

раствора образца с концентрацией 10 мкг мл<sup>-1</sup> в метаноле.

Целью данной работы было получение NMDA, содержащего несколько атомов дейтерия на молекулу.

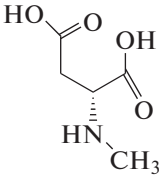
Для решения этой задачи NMDA наносили на оксид алюминия (1 : 40 масс.), и смешивали с катализатором 5% Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> при соотношении катализатор–NMDA от 4 до 6 (масс.). Степень замены протия на дейтерий в NMDA повышалась при росте температуры (табл. 1). Использование родиевых катализаторов, приготовленных на том же носителе, что и носитель, на который наносят вещество, прием, хорошо отработанный, и обеспечивающий высокий изотопный обмен. В этом случае происходит перетекание (спилловер) активированных на катализаторе изотопов водорода на носитель, а затем на носитель с веществом [5]. Эффективность изотопного обмена определяется возможностью активированных частиц дейтерия взаимодействовать со всеми C–H-фрагментами аминокислоты. Только в этом случае возможно образование переходного состояния <sup>2</sup>H–C–H с последующим полным замещением атомов протия на дейтерий. Если в реакцию вступают только некоторые из C–H-фрагментов, замещение происходит лишь частично. Ответ на вопрос, насколько полно происходит замещение, дали проведенные эксперименты.

Согласно полученным данным (табл. 1), при температурах не выше 180°C замена всех атомов протия на дейтерий в NMDA происходит равномерно, несколько ниже количество изотопомеров

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ), 123182 Москва, Россия

\*E-mail: nagaev@img.ras.ru

**Таблица 1.** Влияние на эффективность изотопного обмена условий проведения реакции (в реакцию брали 1 мг NMDA)

	Количество атомов дейтерия в изотопомере	Условия реакции, $T (^{\circ}\text{C})/t$ (мин)				
		180/15	190/5	190/10	190/15	200/15
		Содержание $^2\text{H}$ , %				
 NMDA	$^2\text{H}_0$	7.9	5.5	4.2	4.8	2.4
	$^2\text{H}_1$	7.7	4.1	4.2	3.7	3.0
	$^2\text{H}_2$	13.8	6.0	4.8	5.7	7.4
	$^2\text{H}_3$	12.8	7.4	7.8	6.6	7.5
	$^2\text{H}_4$	16.3	14.6	17.3	14.2	15.8
	$^2\text{H}_5$	26.1	28.9	30.8	29.2	27.9
	$^2\text{H}_6$	13.5	33.2	31.4	35.3	36.0
$\Sigma^2\text{H}^a$	3.65	4.43	4.49	4.54	4.59	
Выход, %		90	85	81	76	52

<sup>a</sup>  $\Sigma^2\text{H}$  – среднее количество атомов дейтерия на молекулу NMDA.

с нулевым (ни один атом протия не замещен на дейтерий) и одним атомом дейтерия (около 8%) и двукратное преимущество изотопомера с пятью атомами дейтерия (около 26%). И лишь в 13–14% молекул NMDA произошло полное замещение атомов протия на дейтерий. При температурах выше 180°C количество включенного дейтерия увеличивается, что, по-видимому, связано с изменением агрегатного состояния этой аминокислоты (температура плавления NMDA 189–190°C). В результате этого включение дейтерия возрастает за счет уменьшения изотопомеров с нулевым и одним атомом дейтерия (около 3–5%) и значительного роста изотопного обмена всех 6 атомов протия в NMDA (около 30–35%).

Дальнейшее варьирование температурой и временем проведения реакции показывало увеличение включения дейтерия только на 2–3%.

Максимальное количество включенного дейтерия – до 4.5 атомов – было достигнуто при значительном избытке газообразного дейтерия. Проведено исследование, целью которого было выяснить, при каких условиях, варьируя соотношение дейтерий–NMDA, можно получить заданное количество включенных атомов дейтерия в NMDA. Изменять соотношение дейтерий–NMDA можно или проводя реакцию при разных давлениях дейтерия в ампуле, или изменяя количество NMDA. Влияние уменьшения давления газообразного дейтерия, при неизменном количестве вещества, нанесенного на катализатор, изучалось в работе [10]. При уменьшении давления в 8 раз включение дейтерия в 4-фенил-бензоат натрия падало с 8 до 6 атомов. В настоящей работе при необходи-

мости получения большего количества дейтерированного NMDA увеличивали количество вещества, нанесенного на катализатор, при неизменном объеме и давлении газообразного дейтерия. В реакциях использовали смеси, содержащие от 1 до 20 мг NMDA. В ходе эксперимента при использовании ампулы объемом 60 мл при давлении дейтерия 400 гПа для включения дейтерия порядка 3 атомов необходимо использовать до 10 мг NMDA. При этих соотношениях, при установлении термодинамического равновесия между газообразным дейтерием и NMDA, мольная доля дейтерия равна 0.634. Исходя из данных табл. 1, ожидаемое количество дейтерия в молекуле NMDA будет в диапазоне 2.8–2.9. Это означает, что получено хорошее совпадение с экспериментальными данными и что изотопные эффекты в условиях реакции незначимы.

При проведении препаративного введения газообразного дейтерия (190°C, соотношение катализатор : NMDA :  $\text{Al}_2\text{O}_3 = 5.5 : 1 : 40$  (масс.), время реакции 10 мин, давление 400 гПа) образовывался препарат со средним количеством атомов дейтерия 2.76 на молекулу NMDA.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Reprosil-pur 120 sil (Dr. Maisch, Германия),  $4 \times 150$  мм, размер частиц 3 мкм, в системе 75% метанол–25%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (2.5 мМ, рН 2.8), скорость подачи элюента 1 мл мин<sup>-1</sup>, детектирование по УФ-поглощению при 200 нм. Время удерживания NMDA – 2.91 мин. Препаративное разделение проводили в той же системе на колонке Reprosil-pur 120 diol (Dr. Maisch, Германия),  $8 \times 150$  мм,

размер частиц 5 мкм, скорость подачи элюента 2 мл мин<sup>-1</sup>.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы. В предложенных условиях спилловер активированных на металле-катализаторе частиц дейтерия происходит эффективно, и происходит их взаимодействие, как на поверхности носителя, так и в пуле молекул NMDA. Изменение агрегатного состояния NMDA способствует увеличению количества изотопомеров с большим содержанием дейтерия. Содержание дейтерия в молекулах NMDA можно менять изменением соотношения вещество–дейтерий. Достижением проведенных исследований является получение высоко меченного NMDA, в котором все атомы протия удалось заместить на дейтерий у трети молекул вещества.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работу проводили при поддержке темы НИОКТР, госрегистрация № АААА-А19-119022590101-1.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egebjerg J., Kukekov V., Heinemann S.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 22. P. 10270–10274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10270>
2. Дамбинова С.А., Каменская М.А. Молекулярные механизмы передачи импульса в мембранах нейронов. Ионные каналы, рецепторы. В кн.: Ашмарин И.П., Стукалов П.В. (ред.). Нейрохимия. М.: Изд. Института биомедицинской химии РАНН, 1996. С. 246–295.
3. Сергеев П.В., Шимановский Н.Д., Петров В.И. Рецепторы. Волгоград: Семь ветров, 1999. С. 346–423.
4. Bennett J.A., Dingledine R. // Neuron. 1995. V. 14. № 2. P. 373–384. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90293-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90293-7)
5. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. Москва: Наука, 2003. 246 с.
6. Toth G., Mallareddy J.R., Toth F., Lipkowski A.W., Tourwe D. // Arkivoc. 2012. V. 2012. № 5. P. 163–174. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013>
7. Rees A.T. // J. Labelled Compd. Radiopharm. 2004. V. 47. № 5. P. 318–319. <https://doi.org/10.1002/jlcr.819>
8. Shevchenko V.P., Nagaev I. Yu., Myasoedov N.F. // J. Labelled Compd. Radiopharm. 2010. V. 53. № 11–12. P. 693–703. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1828>
9. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Усп. хим. 2003. Т. 72. № 5. С. 471–497.
10. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2015. Т. 57. № 4. С. 366–372.

## SYNTHESIS OF DEUTERIUM-LABELED *N*-METHYL-*D*-ASPARTATE

V. P. Shevchenko<sup>a, #</sup>, L. A. Andreeva<sup>a</sup>, I. Yu. Nagaev<sup>a</sup>, and Academician of the RAS N. F. Myasoedov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – IMG), Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>E-mail: nagaev@img.ras.ru

The effect of temperature, catalyst–NMDA ratio, and reaction time on the efficiency of deuterium incorporation into NMDA has been studied. It was found that at temperatures above 180°C, incorporation of the label in NMDA changes insignificantly. The same pattern is observed when the reaction time changes. Increasing the time from 5 to 15 min increases the incorporation of deuterium by 2–3%. Under the selected conditions, according to mass spectrometric data, all protium atoms were replaced by deuterium in more than one third of NMDA molecules. By changing the deuterium–NMDA ratio, it turned out to be possible to change the deuterium content in the substance. When carrying out the reaction of a preparative amount of NMDA with deuterium gas, an average of 2.76 deuterium atoms were included in the amino acid molecule.

**Keywords:** *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA), deuterium, synthesis, labeled compounds