

Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод твердофазного каталитического гетерогенного изотопного обмена

Г.В. Сидоров¹, Ю.Г. Казаишвили², Б.А. Рудой²

¹Институт молекулярной генетики РАН;

Российская Федерация, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, д. 2;

²ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА»;

Российская Федерация, 125252, Москва, ул. авиаконструктора Микояна, д. 12

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сидоров Георгий Васильевич – заместитель заведующего отделом, ведущий научный сотрудник, доктор химических наук. Тел.: +7 (499) 196-02-13. E-mail: sidgv@img.ras.ru.

Казаишвили Юрий Георгиевич – ведущий биолог сектора доклинических исследований, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (495) 741-49-89 (доб. 3902). E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Рудой Борис Анатольевич – руководитель отдела фармацевтических разработок, доктор биологических наук, профессор. Тел.: +7 (495) 741-49-89 (доб. 1243). E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Полимерные соединения, меченные изотопами, в частности тритием, незаменимы для разнопрофильных биохимических и диагностических целей, структурно-функциональных исследований, а также для изучения клеточного метаболизма разнообразных биологически активных соединений. Наиболее эффективными способами введения изотопов водорода в субстанции сложного строения являются реакции изотопного обмена. Изотопный обмен с газообразным тритием проводят обычно либо в жидкой, либо в твердой среде. Достижение относительно высокого уровня включения трития возможно в случае проведения реакции с тритием в твердой фазе.

Цель работы – изучить возможность использования метода твердофазного каталитического изотопного обмена (ТКГИО) для введения тритиевой метки в полимерную субстанцию «Кагоцел».

Материал и методы. Тритиевую метку вводили в высокополимерную субстанцию «Кагоцел» с использованием метода температурного каталитического изотопного обмена. Отсутствие существенных изменений физико-химических свойств образца меченой субстанции «Кагоцел» в сопоставлении с исходной, контролировали методами эксклюзионной и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Стабильность полученных образцов меченой субстанции «Кагоцел» оценивали при хранении в течение 30 дней. Оценивали также стабильность введенной метки при инкубировании меченой субстанции при температуре 37°C в течение 12 ч в растворе кислоты (HCl, 0,01M), щелочи (KOH, 0,01 M) и воды очищенной (MilliQ, pH 6,5).

Результаты. Разработана методика введения трития (в варианте ТКГИО) в высокополимерную субстанцию «Кагоцел». Методика позволяет получать продукт с радиохимической чистотой более 98% и удельной активностью, достаточной для проведения различных биологических исследований. Меченная тритием полимерная субстанция «Кагоцел» стабильна в 2% растворе этилового спирта в течение 7 дней при температуре 10°C, а также в нейтральной и кислой среде.

Заключение. Показана пригодность метода ТКГИО для введения тритиевой метки в субстанцию «Кагоцел». Разработанный метод позволяет получать препараты меченной тритием полимерной субстанции «Кагоцел» с высокой удельной активностью.

Ключевые слова: «Кагоцел», тритий, метод твердофазного каталитического изотопного обмена

Для цитирования: Сидоров Г.В., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А. Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод твердофазного каталитического гетерогенного изотопного обмена. Фармация, 2018; 67 (8): 16–21. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-08-03>

SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED POLYMERIC KAGOCEL SUBSTANCE:
SOLID-PHASE CATALYTIC HETEROGENEOUS ISOTOPE EXCHANGE METHOD

G.V. Sidorov¹, Yu.G. Kazaishvili², B.A. Rudoy²

¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 2, Acad. Kurchatov Sq., Moscow 123182, Russian Federation;

²ООО «NEARMEDIC PHARMA», 12, Aircraft Designer Mikoyan St., Moscow 125252, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Georgiy V Sidorov – Associate Professor Laboratory of Isotope Labelled Physiologically Active Compounds, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akad. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia; Associate Professor, Ph.D. E-mail: sidgv@img.ras.ru

Yuri G. Kazaishvili – Biologist of preclinical studies, unit LLC NEARMEDIC PHARMA, Ph.D. Tel.: +7 (495) 741 49 89 (доб. 3902). E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Boris A. Rudoy – Head of R&D department LLC NEARMEDIC PHARMA, Ph.D. Professor Tel.: +7 (495) 741 49 89 (доб. 1243). E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru

SUMMARY

Introduction. Polymer compounds labeled with isotopes, tritium in particular, are indispensable for hetero-profile biochemical and diagnostic purposes, structural and functional studies, and investigations of the cellular metabolism of various biologically active compounds with the use of radioisotopes. The most efficient ways to incorporate hydrogen isotopes into natural compounds, especially into those of complex structure, are isotope exchange reactions. Isotope exchange with gaseous tritium is usually carried out in either liquid or solid media. The relatively high levels of tritium incorporated can be achieved if the solid-phase reaction with tritium is done.

Objective: to investigate whether the solid-phase catalytic isotope exchange (SPCIE) technique can be used to incorporate a tritium label into the polymer component of the Kagocel substance.

Material and methods. The relevance of the obtained labeled Kagocel substance was controlled by exclusion and reversed-phase high-performance liquid chromatography. The investigators assessed the stability of the prototypes of a polymer fraction of the Kagocel substance during prolonged storage and the impact of pH changes on the stability of the label incorporated into the polymer fragment.

Results. A procedure was developed to incorporate tritium as a label into the polymer component of the Kagocel substance, by applying the SPCIE technique, which could prepare a labeled substance with a radiochemical purity of more than 98% and a specific activity sufficient to conduct various biological studies. The tritium-labelled polymer Kagocel substance was stable in 2% ethyl alcohol for 7 days at 10°C, and when incubated for 12 hours in a 0.01 M HCl solution (pH 2.0).

Conclusion. The investigation has shown that the SPCIE technique is suitable for the incorporation of the tritium label into the polymer component of the Kagocel substance. The developed technique makes it possible to prepare tritium-labeled polymer Kagocel substance preparations having high specific activity and stability.

Key words: kagocel, tritium, solid-phase catalytic isotope exchange with tritium.

For citation: Sidorov G.V., Kazaishvili Yu.G., Rudoy B.A. Synthesis of tritium-labeled polymeric Kagocel substance: solid-phase catalytic heterogeneous isotope exchange method. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 67 (8): 16–21. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-08-03>

Введение

Меченные тритием соединения используются при проведении исследований по лиганд-рецепторному связыванию [1], изучению механизма действия [2,3], определению органа-мишени, изучению фармакокинетических параметров [4] и многих других. Частое обращение к тритию, как к радиоактивной метке обусловлено удобным для проведения биологических экспериментов периодом полураспада, высокой удельной активностью, а также возможностью получать меченые соединения без внесения изменений в технологический процесс синтеза фармацевтической субстанции.

Кагоцел представляет собой высокополимерное соединение – сополимер (привитой сополимер), основой которого является окисленное производное полисахарида – карбоксиметилцеллюлозы с ковалентно связанными с этой полимерной цепью модифицированными молекулами природного полифенола – госсипола [5, 7].

Отсутствие специфических физико-химических свойств, которые могли бы позволить надежно идентифицировать анализируемое вещество в низких концентрациях в биологических матри-

цах является общей особенностью многих полисахаридов, к которым и относится субстанция «Кагоцел». В частности, субстанция «Кагоцел» не имеет флюорохромных остатков, не обладает способностью к поляризации света, не имеет оптического вращения, оптический спектр этого вещества не имеет характерных максимумов, для ее обнаружения и количественного определения не применим метод масс-спектрометрии.

В такой ситуации при необходимости количественной оценки содержания исследуемого вещества в биологических системах чаще всего прибегают к приему с введением в состав активного вещества флюоресцентной или радиоактивной метки.

Однако известно, что введение в изучаемое полимерное вещество молекул люминофора может привести к изменению физико-химических свойств (молекулярная масса, конформация и т.д.) и, в последствии, – фармакокинетических характеристик вещества [6]. Поэтому наиболее целесообразным является использование для этих целей радиоактивной метки. С учетом особенностей химического строения полимерной субстанции «Кагоцел» для ее пометки нами был выбран изотоп ^3H [9].

Наиболее эффективными способами введения изотопов водорода в природные соединения, особенно сложного строения, являются реакции изотопного обмена [8,10–13,15,16]. Источником изотопа в таких методиках является либо растворитель, содержащий тритий, либо газообразный тритий. Эти реакции не требуют синтеза специальных предшественников и позволяют довольно эффективно вводить метку в различные соединения, доступные, зачастую, в минимальных количествах. Поведение реакций изотопного обмена в тяжелой воде затрудняется в связи с относительно низкой молярной радиоактивностью продукта синтеза, более высокой радиационной опасностью процесса и используется, как правило, в тех случаях, когда исчерпаны другие способы пометки [8].

Реакция изотопного обмена является сложным физико-химическим процессом, связанным со взаимодействием лабильных активированных частиц трития с субстратом, протекающим в строго определенных условиях. В связи с этим необходимы индивидуальная разработка и адаптация метода введения тритиевой метки для каждого отдельного химического соединения [11].

Изотопный обмен с газообразным тритием можно проводить либо в растворе исходного соединения с применением катализатора, то есть – в жидкой фазе (жидкофазный каталитический гетерогенный изотопный обмен – ЖКГИО), либо без использования растворителя – в твердой фазе (твердофазный каталитический гетерогенный изотопный обмен – ТКГИО). Осуществление синтеза меченых соединений в реакции ТКГИО позволяет получать соединения с относительно высокими значениями удельной активности. Данный метод обеспечивает введение тритиевой метки в различные по химической природе биологически активные соединения, в том числе – в молекулы с ароматическими и гетероциклическими остатками. Варьируя условия введения, можно добиться селективного включения метки в избранные функциональные группы [16].

Рассмотренные выше реакции являются в настоящее время наиболее эффективными способами введения трития в различные физиологически активные соединения и позволяют решать многие задачи при синтезе меченых тритием соединений.

Цель работы – изучить возможность использования метода ТКГИО для введения тритиевой метки в полимерную субстанцию «Кагоцел».

Материал и методы

При проведении реакции ТКГИО раствор субстанции «Кагоцел» перемешивали с катализа-

тором (5%Pd/BaSO₄, Fluka), после чего смесь лиофилизировали. Затем смесь помещали в стеклянную реакционную ампулу, присоединяли последнюю к установке для операций с газообразным тритием (дейтерием), вакуумировали форвакуумным масляным насосом до остаточного давления < 10–2 мм рт. ст. и заполняли реакционную ампулу тритием до достижения давления 300 мм рт. ст. Образец нагревали до температуры в диапазоне 140–150°C, выдерживали при данной температуре для проведения реакции обмена, после чего охлаждали ампулу и удаляли избыток газа форвакуумным насосом. Продукты реакции смывали с катализатора водой, катализатор отделяли центрифугированием. Для удаления лабильного трития отгоняли воду досуха на ротационном испарителе при остаточном давлении <15 мм рт. ст. при температуре 35–37°C. Операцию удаления лабильной метки повторяли после ресуспендирования осадка в 50% этиловом спирте.

Процесс введения метки сопровождался контролем состояния состава и структуры полимера методами обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ. В варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ хроматографию осуществляли на колонке УМС-Triart C18 размером 250×4,6 мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовался буферный раствор 30 мМ калия фосфата однозамещенного рН 2,5 и ацетонитрила в соотношении 2:8. Колонку поддерживали при постоянной температуре 40 °С и скорости подвижной фазы – 1 мл/мин.

Молекулярно-массовые характеристики меченого полимера «Кагоцел» оценивали методом эксклюзионной ВЭЖХ. В этом случае хроматографию осуществляли с использованием хроматографической системы Waters, оснащенной предколонкой Ultrahydrogel 1000 и колонкой Ultrahydrogel 120 (размером 300 × 7,8 мм), заполненные гелем на основе гидроксил-полиметакрилата с размером пор 1000Å и 120Å, соответственно. В качестве подвижной фазы использовали 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 7,0. Колонку поддерживали при постоянной температуре 30°C и скорости подвижной фазы – 0,5 мл/мин.

После проведения процедуры пометки полимерной субстанции осуществляли диализную очистку препарата с использованием мембран с пределом отсечения 2 кДа. Растворенный в воде препарат диализовали против воды MilliQ при температуре 10°C в течение 10 сут, регулярно, раз в сутки, меняя диализную жидкость в сосуде.

Полученный продукт подвергали повторному хроматографическому анализу с последующей оценкой радиохимической чистоты.

Стабильность полученных препаратов меченой тритием субстанции «Кагоцел» оценивали в двух режимах: при хранении в течение 30 дней в прохладном защищенном от света месте (холодильник), контролируя показатель радиохимической чистоты. Кроме того, оценивали стабильность введенной метки при инкубации препарата меченого соединения в течение 12 ч при температуре 37°C в кислой (HCl 0,01 М, pH 2,0), щелочной (KOH 0,01 М, pH 12,0) или нейтральной (H₂O MilliQ, pH 6,5) среде. В последнем случае стабильность введенной в полимер метки оценивали после диализа образцов – по доле перешедшей в пермеат радиоактивности.

Результаты и обсуждение

На предварительном этапе, путем варьирования соотношения количеств субстрата и катализатора, температуры, длительности экспозиции подбирали условия проведения реакции. Для подтверждения эффективности катализатора в качестве негативного контроля использовали инертный носитель (Alusorb A 5 μm Skatz). С учетом значений показателей удельной активности и радиохимической чистоты образцов меченых соединений, полученных в пробных экспериментах, определили оптимальные условия введения трития в полимерную субстанцию «Кагоцел». К наиболее значимым факторам при этом отнесены: соотношение масс вещества субстанции и катализатора (5%Pd/BaSO₄) – 1:10, температура реакционной смеси – 140°C, длительность экспозиции – 20 мин. Все последующие наработки меченого соединения велись при соблюдении указанных выше условий.

До и после проведения реакции пометки проводили хроматографический анализ препаратов (рис. 1, 2)

При этом было подтверждено сохранение основных физико-химических свойств полимерной субстанции «Кагоцел» в процес-

се пометки: не наблюдалось изменения времени удерживания компонентов, регистрируемых при обращенно-фазовой хроматографии препарата, сохраняются молекулярно-массовые характеристики (отсутствие смещения времени удерживания меченой субстанции «Кагоцел» в сравнении с исходной субстанцией), не наблюдается накопления каких-либо существенных количеств дополнительных примесей.

Для контроля специфичности включения тритиевой метки в полимерную субстанцию в ходе отработки методики осуществляли сбор фракций препарата в процессе его хроматографии (в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ) – как до проведения этапа удаления лабильной (не связанной) метки, так и после очистки препарата методом длительного диализа (на мембранах с пределом отсека 2 кДа). Оценивали удельную активность собранных фракций (табл. 1).

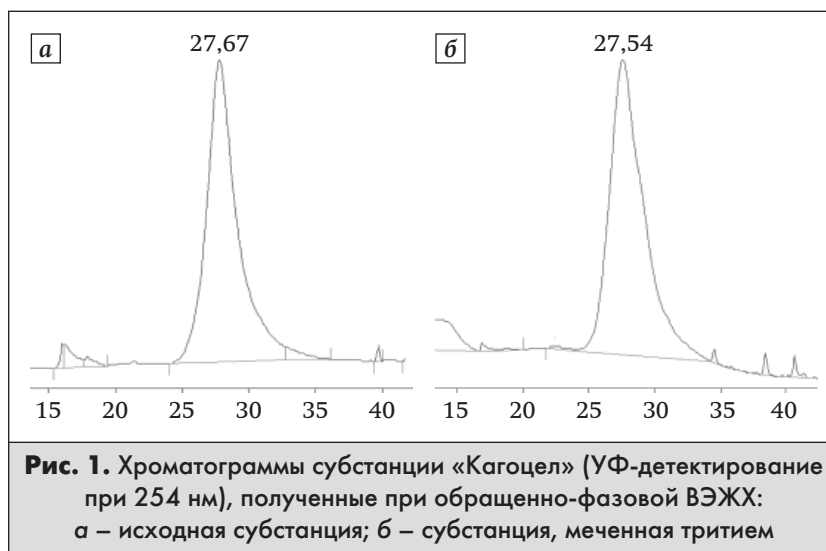


Рис. 1. Хроматограммы субстанции «Кагоцел» (УФ-детектирование при 254 нм), полученные при обращенно-фазовой ВЭЖХ: а – исходная субстанция; б – субстанция, меченная тритием

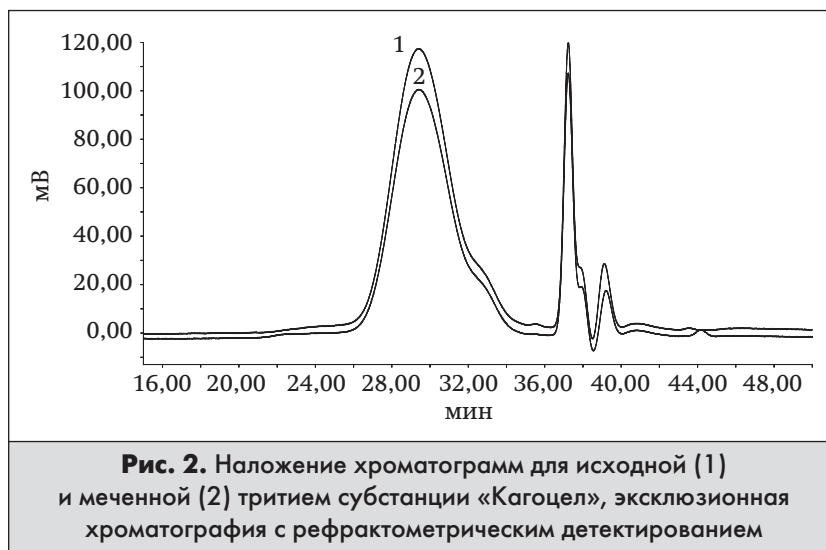


Рис. 2. Наложение хроматограмм для исходной (1) и меченой (2) тритием субстанции «Кагоцел», эксклюзионная хроматография с рефрактометрическим детектированием

Как видно из полученных результатов, основная доля радиоактивности препарата непосредственно после пометки приходится на фракции, время выхода которых соответствует времени выхода основного пика полимера «Кагоцел». Однако в препарате, полученном после двукратного удаления лабильной метки путем отгонки влаги, доля активности, приходящаяся на эти фракции, составляет только примерно 36%, что свидетельствует о недостаточно высокой радиохимической чистоте полученного продукта.

Анализ радиоактивности фракций в тех же временных диапазонах выхода после дополнительного удаления лабильной метки методом длительного диализа показал, что радиохимическая чистота препарата возрастает до значений выше 95%. При этом почти вся активность приходится на фракцию, соответствующую аналогичной фракции в препарате исходного полимера, что свидетельствует о достаточно высокой специфичности включения трития в полимерную субстанцию «Кагоцел» в выбранных условиях проведения реакции ТТКИО.

Таблица 1
Распределение радиоактивности по фракциям, собранным в процессе хроматографирования меченной тритием субстанции «Кагоцел» до и после удаления лабильной метки

Время удерживания, мин	Доля от введенной активности, %	
	до удаления лабильной метки	после удаления лабильной метки
0–12	28,4	1,5
12–24,6	17,4	0,3
24,6–33,5	35,9	98,2
33,5–38,5	4,5	0
38,5–50	13,8	0
50–60	0	0
Всего	100	100

Таблица 2
Радиохимическая чистота меченной тритием субстанции «Кагоцел» при хранении в 2% растворе этилового спирта при температуре 8–10 °С

Показатель	Длительность хранения, сутки				
	0	8	16	22	30
Радиохимическая чистота, %	98,2	95,4	94,4	93,5	90,4

Известно, что биологические исследования, требующие достаточно точной количественной оценки содержания исследуемого вещества в биологических матрицах, предъявляют высокие требования к меченым изотопами препаратам по показателю стабильности [13–15].

Стабильность меченной тритием субстанции «Кагоцел» в процессе длительного, в течение 30 дней хранения, оценивали, контролируя сохранение параметра радиохимической чистоты продукта (см.табл. 2).

По результатам оценки радиохимической чистоты и удельной активности, показана удовлетворительная стабильность в течение 7 дней в 2% растворе этанола.

Важной характеристикой стабильности меченных тритием полимерных веществ является также отсутствие существенных потерь специфической метки при изменении условий нахождения меченого вещества в различных биологических средах. Известно, что в процессе синтеза тритий, помимо стабильных положений в молекуле (ковалентных), может занимать также и относительно лабильные позиции, известны также процессы перехода трития в лабильное состояние под воздействием различных факторов среды, одним из которых является pH раствора [12]. Поэтому стабильность введенной метки дополнительно определяли по доле перешедшей в пермеат радиоактивности после инкубации препарата в течение 12 ч в растворе 0,01 М соляной кислоты (pH 2,0), 0,01 М растворе гидроксида натрия (pH 12,0) и в воде (чистоты MilliQ) (pH 6,5) при температуре 37 °С (табл.3).

По результатам, представленным в табл. 2 и 3, можно сделать вывод, что полученная разработанным методом меченная тритием субстанция «Кагоцел» достаточно стабильна при хранении в 2% растворе этилового спирта, а также в условиях инкубации в кислой (0,01М HCl) и нейтральной среде. Наблюдавшееся существенное возрастание доли лабильного трития при pH 12 может быть связано с протеканием реакций неспецифическо-

Таблица 3
Оценка стабильности меченной тритием субстанции «Кагоцел» в кислой, нейтральной и щелочной средах

pH среды, ед.	Доля лабильного трития в пермеате, %
2	0
6,5	0,4
12	27,9

го обмена и(или) с частичным щелочным гидролизом полимера.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали пригодность метода ТКГИО для введения тритиевой метки в субстанцию «Кагоцел», для последующего ее использования в биологических экспериментах. Разработанный метод позволяет получать меченную тритием субстанцию с высокой удельной активностью и удовлетворительной стабильностью в кислых и нейтральных растворах.

Показатель радиохимической чистоты меченого тритием препарата полимерной субстанции «Кагоцел» составил ~97%. Подтверждена высокая стабильность введенной в полимер «Кагоцел» тритиевой метки при ее хранении в 2% растворе этанола в течение 7 дней, что, как правило, достаточно для проведения различных биологических исследований, включая фармакокинетические.

Отличительной характеристикой данного варианта методики введения метки в полимерную субстанцию является простота, возможность ведения процесса при относительно невысокой температуре реакционной смеси и довольно высокая производительность – возможность получать в одном цикле наработки достаточные количества меченого вещества для проведения фармакокинетических доклинических исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. М.: Фаир-пресс, 1999; 720. [Varfolomeev S. D., Gurevich K. G. Biokinetics: Practical Course //FAIR-PRESS: Moscow, Russia. – 1999. (In Russian)]
2. Некрасова Ю. Н., Садовников В. Б., Золотарев Ю. А., Наволоцкая Е. В. Свойства и механизм действия синтетического пептида октарфина. Биоорганическая химия. – 2010, 36 (5): 638–645 [Nekrasova, Y.N., Sadovnikov, V.B., Zolotarev, Y.A. et al. Properties and mechanism of the action of the synthetic peptide octarphin. Russ. J. Bioorganicheskaya himiya, 2010; 36: 589. <https://doi.org/10.1134/S1068162010050067> (In Russian)]
3. Tyurenkova I.N., Bagmetova V.V., Robertus A.I. A study of the GABAergic mechanisms of the neuropsychotropic action of neuroglutamate //Neurochemical Journal. – 2015; 9: 116. <https://doi.org/10.1134/S1819712415010134>.
4. Зимакова Н.И., Колесникова Е.Ю., Будько А.П. и др. Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина (АГГ). Российский биотерапевтический журнал, 2012; 3: 33–38. [Электронное издание]. <https://cyberleninka.ru/article/n/>

doklinicheskoe-izuchenie-farmakokinetiki-lekarstvennoy-formy-analoga-gipotalamicheskogo-gormona-somatostatina-agg (дата обращения: 14.09.2018). [Zimakova N.I., Kolesnikova E.Y., Budko A.P. et al. Preclinical study of the dosage form of analog drug form of analog hypothalamic hormone somatostatine (AGG). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal, 2012; 3: 33–38. [Electronic resource].: <https://cyberleninka.ru/article/n/doklinicheskoe-izuchenie-farmakokinetiki-lekarstvennoy-formy-analoga-gipotalamicheskogo-gormona-somatostatina-agg>. (Circulation date: 14.09.2018) (in Russian)].

5. Пат. 2238122. Российская Федерация, МПК А61Р 31/16; С08В 15/00. Противовирусный фармацевтический препарат / Гомес П.Л., Ершов Ф.И., Мезенцева М.В. и др.; заявл. 20.01.2003 ; опубл. 20.10.2004.

6. Jensen E.C. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations. – The anatomical record, 2012; 295: 2031–2036.

7. Кагоцел в педиатрии. К вопросу о репродуктивной безопасности: Сборник ст. Под ред. чл.-корр. Т.А. Гусковой. М., 2018; 112. [Kagocel in pediatrics. On the issue of reproductive safety: (by ed. T.A. Guskova). Moscow, 2018; 112 (in Russian)]

8. Williams V.R., Mattice W.L., Williams H.B., 1978. Basic physical chemistry for the life sciences.

9. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А., Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченой тритием: метод термической активации трития. Фармация, 2018; 67 (7) 14–20. Badun G.A., Chernisheva M.G., Kazaishvili Yu.G., Rudoy B.A. Synthesis of tritium-labelled polymeric kagocel substance: tritium thermal activation method. Farmatsiya 2018; 67 (7): 14–20. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-03> (in Russian)

10. Сидоров Г.В., Бадун Г.А., Байтова Е.А. и др. Сравнительное изучение реакций термически активированного трития и твердофазной каталитической гидрогенизации тритием с сахарами и диазинами. Радиохимия 2005; 47: 284–8. [Sidorov G.V., Badun G.A., Baitova E.A. et al. A comparative study of the reactions of thermally activated tritium with sugars and diazines and of solid-phase catalytic hydrogenation of these compounds with tritium. Radiohimiya, 2005; 47: 311. <https://doi.org/10.1007/s11137-005-0095-5>. (in Russian)]

11. Г.В. Сидоров, Н.Ф. Мясоедов. Синтез меченных тритием биологически важных диазинов. Успехи химии, 1999. – 68: 254. [Sidorov G.V., Myasoedov N.F. Synthesis of tritium-labelled biologically important diazines. Uspеhi himii, 1999; 68 (3): 229. <https://doi.org/10.1070/RC1999v068n03ABEH000471> (in Russian)]

12. Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Shevchenko K.V. et al. Specific features of deuterium and tritium labeling of Pro-Gly-Pro-Leu and of physiologically active amino acids. Radiochemistry, 2013; 55: 346

13. Sidorov G.V., Myasoedov N.F. Synthesis of tritium-labelled diazines and their analogues. J. Labelled. Compd. Radiopharm., 1998; 41 (11): 993–1003

14. Baumgärtner F., Donhaerl W. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature //Analytical and Bioanalytical chemistry. – 2004. – Т. 379. – №. 2. – С. 204–9.

15. Баранов В. Изотопы: свойства, получение, применение. Т.2. М.: Физматлит, 2005. – 728 с. [Baranov V. Isotopes: properties, obtaining, application. T.2. Moscow: 2017. (in Russian)]

16. Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Myasoedov N.F. Tritium labeling of bioorganic compounds by isotope exchange. Radiochemistry, 2012; 54 (1): 79–86. <https://doi.org/10.1134/S1066362212010122>

17. Shevchenko V.P., Razzhivina I.A., Chernysheva M.G. et al. Efficiency of isotope exchange between sodium 4-phenylbenzoate and activated tritium Radiochemistry, 2015; 57 (3): 312–320. <https://doi.org/10.1134/S1066362215030121>

Поступила 6 сентября 2018 г.