



УДК 547.953 : 543.51

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ЛИПИДОВ С ПРОСТОЙ
ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

II. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДОВ АЛКИЛЬНОГО ТИПА

*Розин А. Э., Кабанов С. П., Куприянов С. Е.,
Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.*

*Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова;*

*Научно-исследовательский физико-химический институт
им. Л. Я. Карпова, Москва*

Описаны масс-спектры 1-О-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанолamina и -фосфорилхолина, полученные электронной и химической ионизацией, а также десорбцией в сильном электрическом поле. Последний метод позволяет получать молекулярные ионы с интенсивностью, достаточной для использования их при идентификации природных гомологичных смесей глицерофосфолипидов. Идентифицирован ряд характерных пиков.

Прогресс в области изучения строения и функционирования биологических мембран в определенной степени зависит от успехов в разработке методов выделения и анализа составляющих их структурных компонентов, в том числе фосфолипидов. В связи с этим совершенствование способов идентификации данного класса соединений представляет актуальную задачу.

В настоящее время основным методом фракционирования природных фосфолипидов является хроматография [1]. Их структурный анализ, как правило, проводят расщеплением липолитическими ферментами [2]. Применение масс-спектрометрии [3] (отдельно или в комбинации с ГЖХ) затрудняется из-за малой летучести и термической лабильности этих соединений, что позволяет использовать эти методы лишь при изучении продуктов деструкции фосфолипидов.

Разработка масс-спектрометрического метода анализа природных гомологичных смесей фосфолипидов дала бы возможность идентифицировать их с минимальной затратой времени и вещества.

В качестве объектов исследования нами были выбраны основные представители всех типов алкильных фосфолипидов: 1-О-гексадецил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанолamin и -фосфорилхолин (Ia, IIa) [4], 1-О-9'-октадеценил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанолamin и -фосфорилхолин (Iб, IIб), а также 1-О-(2'-метоксигексадецил)-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанолamin и -фосфорилхолин (Iв, IIв) [5].

Попытки получить пики молекулярных ионов соединений (Ia, IIa) в источнике с ионизацией электронным ударом не дали желаемых результатов. Это, видимо, объясняется их малой летучестью при температурах

Таблица 1

Основные ионы, образующиеся при фрагментации электронным ударом соединений (Ia), (IIa)

Тип иона	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)		Тип иона	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)	
	(Ia)	(IIa)		(Ia)	(IIa)
<i>A</i>	565(95)	565(14)	<i>И</i>	297(61)	297(32)
<i>B</i>	482(100)	524(100)	<i>B + 2</i>	285(10)	285(5)
	380(60)	380(42)	<i>Г</i>	267(6)	267(8)
	353(33)	353(33)	<i>Д</i>	255(70)	255(37)
<i>П</i>	315(5)	315(4)	<i>Е</i>	241(48)	241(20)
<i>К</i>	299(5)	299(2)	<i>Ж</i>	225(47)	225(24)
<i>К—Н</i>	298(20)	298(12)			

Таблица 2

Основные ионы, образующиеся при ионизации метаном соединения (Ia)

Тип иона	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)	Тип иона	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)
	407(2)	<i>И</i>	297(52)
	327(8)	<i>B + 2</i>	285(82)
<i>П</i>	315(8)	<i>B + 1</i>	284(48)
<i>К</i>	299(73)	<i>Г</i>	267(23)
<i>К—Н</i>	298(23)	<i>Е</i>	241(5)

ниже 150° и значительной лабильностью при больших температурах, что подтверждалось наличием в масс-спектрах пиков, соответствующих продуктам термической деструкции. Основные направления распада соединений (Ia, IIa) под электронным ударом можно представить следующим образом* (см. табл. 1 и схему). Наиболее интенсивные пики в масс-спектрах соединений (Ia, IIa) соответствуют ионам *A* с *m/e* 565, которые получают расщеплением фосфодиэфирной связи со стороны глицеринового остатка. Отщепление алкильной группировки (ион *Ж*) с *m/e* 225 дает базовые пики *B* с *m/e* 482 (Ia) и *m/e* 524 (IIa), соответствующие ионам с сохранением фосфодиэфирной связи. Основные ионы фосфолипидов (Ia), (IIa), полученные в источнике с электронным ударом, представлены в табл. 1.

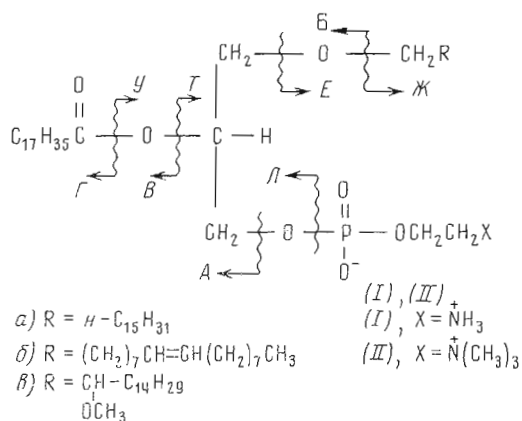
Попытка провести химическую ионизацию метаном и изобутаном соединений (Ia), (IIa) для обнаружения в масс-спектрах заметных пиков молекулярных ионов также была безуспешной. При ионизации метаном соединения (Ia) схема фрагментации в значительной степени аналогична фрагментации при электронном ударе. В масс-спектре имеются интенсивные ионы *E* с *m/e* 241, характеризующие длину алкильного остатка, ионы *Г* с *m/e* 267, *B + 1* и *B + 2* с *m/e* 284 и 285, указывающие на природу жирнокислотного остатка. Одновременный разрыв фосфодиэфирной связи и отщепление жирной кислоты дают ионы *К*, *К—Н* с *m/e* 299, 298, а с отрывом ацидона — ион *П* с *m/e* 315. Отщепление воды от иона *П* дает ион *И* с *m/e* 297.

Наличие такой же серии пиков при фрагментации алкильных диглицеридов [6] подтверждает правильность выводов об одновременном разрыве фосфодиэфирной связи со стороны фосфатного остатка с одновременным отрывом жирной кислоты. Малоинтенсивный, но встречающийся во всех спектрах с химической ионизацией ион с *m/e* 407 может образовываться при отрыве NH_3^+ -группы и жирнокислотного остатка с образованием пяти- и шестичленного циклического фосфата [7] (табл. 2).

* Авторы выражают признательность Б. В. Розынову (ИВХ АН СССР) за помощь при обсуждении результатов.

Так как отсутствие пиков молекулярных ионов в спектрах с электронной и химической ионизацией в основном обусловлено сложностью перевода вещества в газовую фазу без термической деструкции, что, очевидно, связано с цвиттерионной структурой этих соединений, мы использовали метод полевой десорбции, лишенный этих трудностей и успешно применяющийся для анализа различных биологически активных соединений [8, 9]. В литературе описан масс-спектр цвиттериона бетаина [10], молекулярный ион которого достаточно интенсивен.

Действительно, в масс-спектрах, полученных десорбцией в сильном электрическом поле (потенциал эмиттера относительно вытягивающего электрода 12,5 кВ), пики молекулярных ионов фосфолипидов являются основными и их значение m/e дает возможность судить о молекулярном весе. Ток нагрева эмиттера для различных соединений подбирался в пределах 15—20 мА. В этих условиях кроме базовых молекулярных ионов в результате частичной термической деструкции возникают осколочные ионы небольшой интенсивности. Основные направления образования этих ионов в значительной степени сходны с фрагментацией в источниках с электронной и химической ионизацией (схема).



Основные различия заключаются в присутствии в масс-спектре интенсивных молекулярных ионов и в разрыве фосфодиэфирной связи как со стороны фосфатного остатка, так и со стороны глицериновой части молекулы. При полевой десорбции, как правило, интерес представляют лишь молекулярные ионы, а фрагментация незначительна, в данном же случае осколочные ионы позволяют получить информацию о гидрофобных компонентах фосфолипидов. Так, ионы G и B характеризуют жирнокислотный состав исследуемых соединений. Ионы U и T характерны для природных лизофосфолипидов. Величину алкильного остатка можно установить с помощью значения иона Z для соединения (Iа), а в случае производных 1-О-2'-метоксаликниловых производных (Iа), (IIв) характерно образование иона $E-OCH_3$ (табл. 3).

Соединения (IIа), (IIб), (IIв) оказались более устойчивыми при тех же значениях тока нагрева эмиттера и давали почти исключительно молекулярные ионы большой интенсивности (табл. 4).

Необходимо отметить, что, хотя при оптимальном токе нагрева эмиттера в масс-спектрах наблюдается образование исключительно молекулярных ионов, при увеличении тока появляется целый ряд ионов значительной интенсивности. Это обусловлено термической деструкцией исходных веществ, что доказывается наличием фрагментарных ионов и после уменьшения нагрева. При повторном увеличении тока молекулярные ионы не образуются. В то же время слишком малые токи нагрева эмиттера (до 15 мА) дают незначительную интенсивность молекулярных ионов.

Таблица 3

Основные ионы, образующиеся при полевой десорбции соединений (Ia), (Iб), (Iв)

Тип иона	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)		
	(Ia)	(Iб)	(Iв)
<i>M</i> + 2	709(20)	735(15)	739(6)
<i>M</i> + 1	708(14)	734(51)	738(50)
<i>M</i>	707(100)	733(100)	737(100)
<i>L</i> + 2		609(5)	613(9)
<i>L</i> + 1		608(6)	612(12)
<i>A</i>	565(7)	591(6)	595(16)
<i>У</i>	440(10)	466(5)	470(5)
<i>T</i>		450(10)	454(5)
<i>B</i> + 2	285(16)		285(18)
<i>B</i> + 1	284(22)		284(19)
<i>Г</i>		267(5)	
<i>E</i> — OCH ₃			240(23)
<i>Ж</i>	225(23)		

Таблица 4

Основные ионы, образующиеся при полевой десорбции соединений (IIa), (IIб), (IIв)

Тип иона	<i>m,e</i> (относительная интенсивность, %)		
	(IIa)	(IIб)	(IIв)
<i>M</i> + 2	751(11)	777(6)	781(5)
<i>M</i> + 1	750(41)	776(40)	780(52)
<i>M</i>	749(100)	775(100)	779(100)
<i>У</i> + 1	483(13)	509(12)	513(13)
<i>У</i>	482(9)	508(11)	512(9)
<i>B</i> + 2	285(30)	285(20)	285(34)
<i>B</i> + 1	284(58)	284(9)	284(12)
<i>Г</i>	267(5)	267(7)	267(10)
<i>E</i> — OCH ₃			240(9)

Экспериментальная часть

Масс-спектры ионизацией электронным ударом получены на масс-спектрометре Varian MAT-112 (США) с системой обработки данных SS 101 MS. Исследуемые образцы вводили непосредственно в ионный источник, энергия ионизирующих электронов 70 эВ.

Масс-спектры с химической ионизацией получены на масс-спектрометре Finnigan 3300 F (США) с системой обработки данных 6103. В качестве газа-реактанта использовались метан и изо-бутан.

Масс-спектры с ионизацией в сильном электрическом поле получены на приборе Varian MAT-731 (США) с системой обработки данных SS 100 MS. Потенциал эмиттера относительно вытравливающего электрода составлял 12,5 кВ. Ток нагрева эмиттера для различных соединений подбирался в пределах 15—20 мА.

Среднее стандартное отклонение интенсивностей пиков имело порядок 30%.

Чистота и аутентичность всех исследованных веществ контролировались с помощью ИК-спектроскопии, элементного анализа и ТСХ на различных сорбентах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoebet S. R., Vismanthan C. P., Lundberg W. D. (1968) *J. Chromatogr.*, 4, 195—208.
2. Woelk H., Debuch H., Porcelatti G. (1973) *Z. Physiol. Chem.*, B 354, 1265—1270.
3. Ackman G. C. (1972) *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, 12, pp. 240—243, Acad. Press, N. Y.
4. Розин А. Э., Гудкова С. Ф., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) *Био-
орган. химия*, 2, 78—81.
5. Розин А. Э., Еременко Л. Е., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) *Био-
орган. химия*, 2, 1547—1550.
6. Розин А. Э., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1977) *Биоорган.
химия*, 3, 393—396.
7. Klein R. A. (1972) *J. Lipid Res.*, 13, 672—679; (1971) 12, 628—634.
8. James D. E. (1975) *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 455—460.
9. Beckey H. D., Shulten H. R. (1975) *Z. Anal. Chem.*, 273, 345—348.
10. Viggarr Uddin Ahman, Anwer Basha, Atta-ur-Rahman (1974) *Pakistan J. Sci. and
Ind. Res.*, 17, 210.

Поступила в редакцию
9.IV.1976

После доработки
17.IX.1976

MASS-SPECTROMETRY OF ETHER LIPIDS. II. MASS-SPECTROMETRY OF ETHER GLYCEROPHOSPHOLIPIDS

ROZIN A. E., KABANOV S. P., KUPRIYANOV S. E.,
SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
L. Ya. Karpov Physico-Chemical Research Institute, Moscow*

For 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphorylethanolamine and -phosphorylcholine, mass-spectra were obtained using either electron and chemical ionization, or high electric field desorption. The latter affords molecular ions whose intensity is sufficient to be used in identification of the mixtures of homologous naturally-occurring glycerophospholipids.