

ОБЩАЯ И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.51+577.17

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИДРОКОРТИЗОНА

П. В. СЕРГЕЕВ, В. Г. МАНУСАДЖЯН, Р. Д. СЕЙФУЛЛА и  
 М. М. МУЛЬТАНОВСКИЙ

Второй Московский ордена Ленина государственный медицинский институт  
 им. Н. И. Пирогова

Поступило 25 III 1970

Получены масс-спектры химически чистого гидрокортизона при двух различных способах ввода вещества в ионный источник: при прямом вводе и резервуарном испарении. Прямой ввод позволяет получить скоррелированные со структурой исходного вещества масс-спектры, в то время как резервуарный метод приводит к термической деструкции образца и образующиеся продукты дают хорошо воспроизводимые масс-спектры, но они плохо коррелируют с исходной структурой молекулы. Характеристическими являются 362, 344, 302, 228,5 и 229 м/е пики слабой и сильной интенсивности. Проведена пробная интерпретация различных продуктов распада исходного иона и приведена схема отщепления тяжелых осколков от исходного молекулярного иона.

Рис. 1, библи. ссылок 6.

Применение масс-спектрометрии в химии стероидных гормонов показало высокую специфичность и универсальность этого метода, позволяющего легко отличить не только различное положение боковых групп при общем сохранении молекулярного веса изучаемого продукта, но и отличить друг от друга  $\alpha$ - и  $\beta$ -ориентации этих групп [1—5].

Масс-спектрометрия гидрокортизона затруднена из-за неустойчивости этого вещества, легко окисляющегося или восстанавливающегося при незначительном термовоздействии. Эта же причина затрудняла проведение газохроматографического анализа производных гидрокортизона. Анализ кортизона [6] показал, что он дает крайне неустойчивые масс-спектры, варьирующие от условий эксперимента, что вызывает необходимость проведения индивидуального анализа при довольно стабилизированных экспериментальных условиях. Сопоставление его масс-спектров, полученных на разных приборах при разных температурах, ускоряющих и ионизирующих напряжениях и способе введения гидрокортизона в ионизационную камеру, довольно затруднительно. Схожестью обладают, как правило, среднемолекулярные пики в области 100—200 м/е, а наибольшей разностью—пики в области выше 200 м/е.

Сказанное обусловило проведение настоящей работы по изучению масс-спектров гидрокортизона и зависимости спектров от экспериментальных условий.

## Экспериментальная часть

Масс-спектры получены на масс-спектрометре МИ-1305. Образец вводился в ионный источник после его нанесения на алюминиевую чашечку затлушки, надеваемой непосредственно на входной штуцер источника (резервуарный метод) или же в водноспиртовом или хлороформном растворе наносился на стальной шарик, закрепленный на упругой проволоке, который вводился в ионный источник, обладающий системой автономного обогрева до  $300^{\circ}$ . Температура источника контролировалась на поверхности непосредственно в месте ввода вещества с помощью хромель-копелевой термопары с точностью  $\pm 1^{\circ}$ . При резервуарном методе ввода длина молекулярного пути от места испарения до места ионизации равнялась  $\sim 20$  см, а при прямом вводе вещества—  $1-2$  см. Резервуарный ввод осуществлялся через изогнутую под  $90^{\circ}$  трубку так, что молекулярный пучок перед попаданием в ионизационную камеру испытывал однократное столкновение со стенкой трубки. Эффект памяти при этом сохранялся довольно долго (около 24 часов). Количество вещества, необходимого для анализа при прямом вводе, оценивалось в одну гамму. Поверхностная температура источника при анализе поддерживалась при  $250 \pm 3^{\circ}$ . Ускоряющее напряжение равнялось 2 кВ (при повторном анализе—4 кВ), напряжение ионизации— 20, 30, 40, 50 и 60 в. Давление в источнике ионов не превышало  $10^{-1}$  мм рт. ст.

Масс-спектр снимался в основном в области 200—400 м/е, а иногда и в области 70—400 м/е. Время регистрации всего интересующего нас диапазона масс-спектра обычно равнялось 6 минутам. Общая запись на диаграммную ленту велась в течение 2—3 часов, что позволило наблюдать за кинетикой деструкции образца и выбрать наиболее удачные масс-спектры.

Спектральная чистота гидрокортизона (фирма Н. В. Органон, Голландия), изготовленного в виде водноспиртового раствора, не проверялась, поэтому следовые продукты старения препарата не исследовались.

Молекула гидрокортизона содержит 26 тяжелых атомов, 5 из которых кислородные. Среднемолекулярный вес каждого отщепившегося тяжелого осколка 14 м/е, поэтому пружинировка осколочных ионов нами проведена по числу потерянных атомов С или О (считая, что атом кислорода можно представить как метановую молекулу). В каждой группе пиков более низкомолекулярная область соответствует отщеплению кислородсодержащего радикала или молекулы.

Характеристические пики масс-спектра гидрокортизона выражены слабо и очень чувствительны к различным воздействиям. Таковы пики молекулярного иона, а также его ближайших спутников, образующихся при отщеплении воды, метана, метилового радикала, кетоспирта, и группы пиков в области 240—260 м/е. Общая тенденция распада ионов отодвинута в область низкомолекулярных осколков и имеет характер воз-

растающей экзопоненты. Такой характер распада, как правило, свойственен неустойчивым соединениям, и он, по-видимому, позволяет ожидать большой химической реакционной способности и лабильности соединения. Этот факт интересен, поскольку молекула гидрокортизона биологически чрезвычайно активна.

Масс-спектр гидрокортизона при прямом вводе вещества содержит множество метастабильных пиков в области 227—229  $m/e$ , а при резервуарном вводе почти не содержат этой группы пиков, что свидетельствует в пользу термодеструкции гидрокортизона с образованием значительно более стойких производных. Об этом же свидетельствуют масс-спектры, полученные при 2 и 4 кв. В последнем случае высокомолекулярные пики более интенсивны, поскольку время регистрации после ионизации молекулы несколько сокращается.

Снятие масс-спектра в течение нескольких часов подряд приводит к значительному изменению спектра, поэтому следует думать, что наиболее близким к исходной структуре молекулы является спектр, получаемый в первые несколько десятков минут.

$M_0^+$  — ионы\*. Масс-спектр содержит несколько ионов в области 358—370  $m/e$ . Молекулярный ион  $M^+ = 362 m/e$  хорошо стабилизирован при прямом вводе вещества и большом ускоряющем напряжении. При повышении температуры или длительном эксперименте он быстро спадает. Как ни странно, масс-спектр гидрокортизона содержит пики с массовыми числами 368  $m/e$  и менее. Возможно, они образуются при старении гидрокортизона, так как им мог бы соответствовать картол—восстановленный метаболит гидрокортизона, обладающий значительно большей стойкостью, чем основное вещество\*\*. Возможно, что этот продукт легко образуется в самом масс-спектрометре. Этот вопрос требует дополнительного исследования.

Надежно установить переход гидрокортизона в кортизон нам не удалось, хотя пик  $(M-2)^+$  нами наблюдался. Место элиминации молекулярного водорода по масс-спектрам чистого вещества установить нельзя. Стабилизация молекулярных ионов в результате присоединения или отщепления водорода низкая, и только пик 368  $m/e$  по интенсивности может быть сравнен с молекулярным пиком. В общей картине масс-спектра интенсивность молекулярного пика, полученного при самых разнообразных условиях, слабая.

Ионы  $M_{-1}^+$ . Эти ионы могут образоваться в результате выделения молекул воды, метана и радикалов—гидроксила или метилена. Наиболее интенсивным является ион 244  $m/e$ . Возникновение двойной связи при C—11 и C—17-атомах стабилизирует ион, и, возможно, здесь же происходит стабилизация положительного заряда.

\* Индекс внизу показывает число отщепившихся тяжелых атомов и характеризует всю группу ионов в определенной области масс-спектра.

\*\* Мы не располагали данными о спектральной чистоте препарата.

**Ионы  $M_{-2}^+$ .** Группа пиков с максимумом при 330 м/е. Она хорошо проявлена в спектрах при резервуарном введении вещества, отсутствует при введении его в источник и слабо проявлена при увеличении ускоряющего напряжения. Образуется при потере двух групп метилена, молекулы метана или одного гидроксила и метилена.

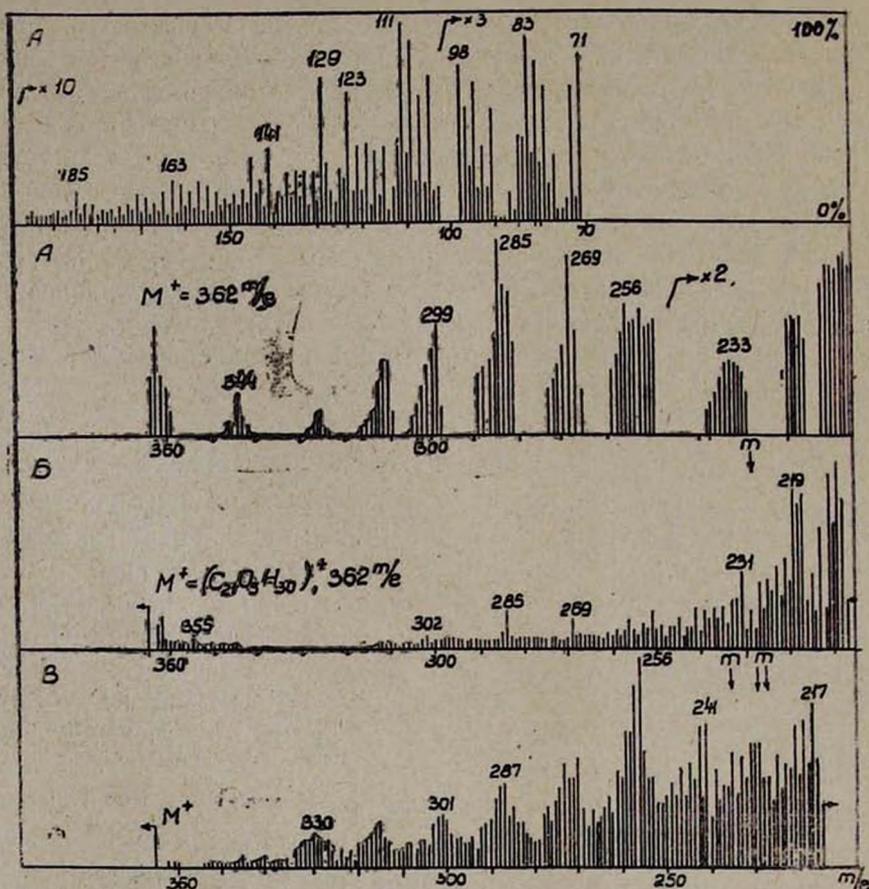


Рис. Масс-спектры гидрокортизона, полученные при прямом (а, б) и резервуарном (в) вводе вещества в ионный источник прибора: А — ускоряющее напряжение 4 кВ, ионизирующее напряжение 70 в, диапазон масс 370—70 м/е, Б и В — ускоряющее напряжение 2 кВ, ионизирующее напряжение 60 в, диапазон масс 370—205 м/е. По оси ординат отложены относительные проценты. Буквой *m* обозначены места появления линий, относящихся к метастабильным ионам.

**Ионы  $M_{-3}^+$ .** Группа пиков в области 310—320 м/е. Резервуарный метод приводит к общей повторяемости картины масс-спектра в этой области формы предыдущей группы пиков, что скорее всего говорит об однородности термодеструкции гидрокортизона при этом методе. Прямой ввод вещества приводит к более неравномерному распределению пиков, что свидетельствует о различных механизмах отщепления угле-

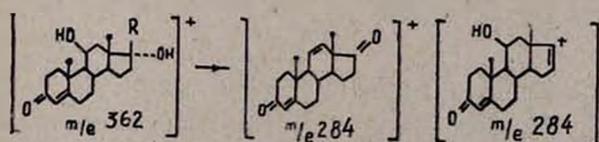
род- и кислородсодержащих групп. Интенсивность сдвинутых в низкомолекулярную область пиков (относительно других пиков этой же группы) высокая, поэтому потеря гидроксила и молекулы воды для гидрокортизона один из наиболее легкоидущих процессов стабилизации осколочных ионов.

При термодеструкции потеря этих же молекул раньше, чем произойдет столкновение молекулы с электроном и образование различных термозамещенных продуктов, приводит к более равномерному характеру масс-спектра. Это объясняется той же чрезвычайно высокой химической активностью гидрокортизона, достигаемой благодаря наличию оксигрупп в С—11 и С—17-положениях.

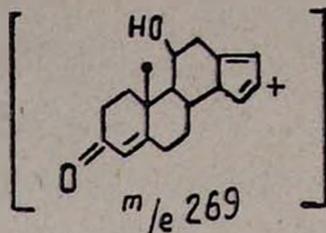
**Ионы  $M_{-4}^+$ .** Группа пиков в области 305—295  $m/e$ . Наиболее интенсивными являются пики 302 и 300  $m/e$ , наблюдаемые в масс-спектре чистого гидрокортизона при прямом вводе вещества. В этой области лежат пики, соответствующие ионам, образуемым при отщеплении боковой группы  $COCH_2OH$ , которая может захватывать водород гидроксила, находящегося в том же положении, и отщепляться в виде нейтральной молекулы. При этом образование остаточного иона из молекулярного приводит к появлению пика 302  $m/e$ , а из иона кортизона, образуемого при дополнительной элиминации  $H_2$  в С—11-углеродном гидроксиле, приводит к образованию пика 300  $m/e$ . Однако интенсивность этих пиков и картина спектров в этой области свидетельствуют, что наличие гидроксила в С—11-положении в общем приводит к дестабилизации ионов этого типа. В масс-спектрах чистого кортизона, полученных Фичем [6], пик 300 очень хорошо проявлен, и термодеструкция или распад молекулярного иона при электронном ударе происходит в основном за счет подобного отщепления.

Таким образом, поведение боковой группы в С—17-положении и интенсивность пиков для кортизона и гидрокортизона позволяют предположить, что на отщепление этой группы влияет гидроксил в С-кольце молекулы. Молекула при этом оказывается гораздо более чувствительной к состоянию соседней грушпировки, чем у кортизона, хотя последняя молекула также не отличается высокой устойчивостью.

**Ионы  $M_{-5}^+$ .** Группа пиков в области 295—280  $m/e$ . Основной пик 284  $m/e$  и близлежащие к нему линии образуются, вероятно, при потере боковой и гидроксильной групп:

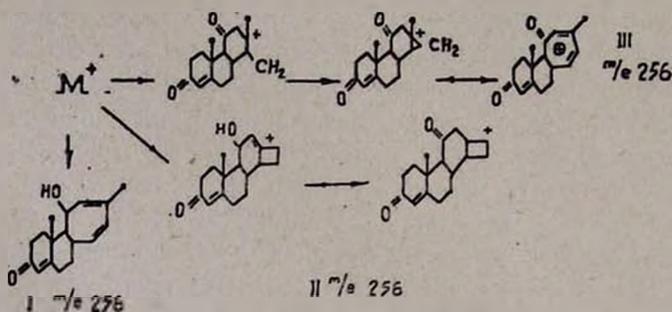


**Ионы  $M_{-6}^+$ .** Группа пиков в области 280—265  $m/e$ . Наиболее интенсивный пик 269  $m/e$  имеет, вероятно, структуру



и образуется из предыдущих осколков в результате дополнительной потери метильной группы  $[M - (\text{HCOCH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3)]^+ = 269 \text{ м/е}$ .

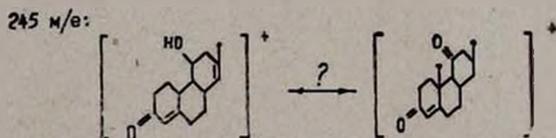
**Ионы  $M^+_{-7}$ .** Область пиков 265—250 м/е. Наиболее характерная часть термодеструктивных масс-спектров. Пики хорошо проявлены и наблюдаются во всех масс-спектрах при самых различных ионизирующих напряжениях. Эти ионы могут образоваться как при частичной деградации D-кольца, так и при перегруппировке C-кольца:



Они наиболее специфичны при термодеструкции гидрокортизона и плохо проявлены у чистого образца. Однако интенсивность их в последнем случае несколько возрастает при увеличении ускоряющего напряжения.

**Ионы  $M^+_{-8}$ .** Область пиков 250—235 м/е. Образуются в результате полного распада D-кольца. Масс-спектр содержит группу аморфных пиков средней интенсивности.

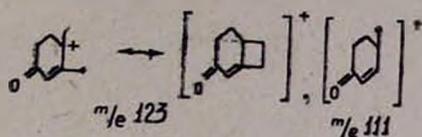
Возможные структурные формулы ионов с массовым числом 245 м/е:



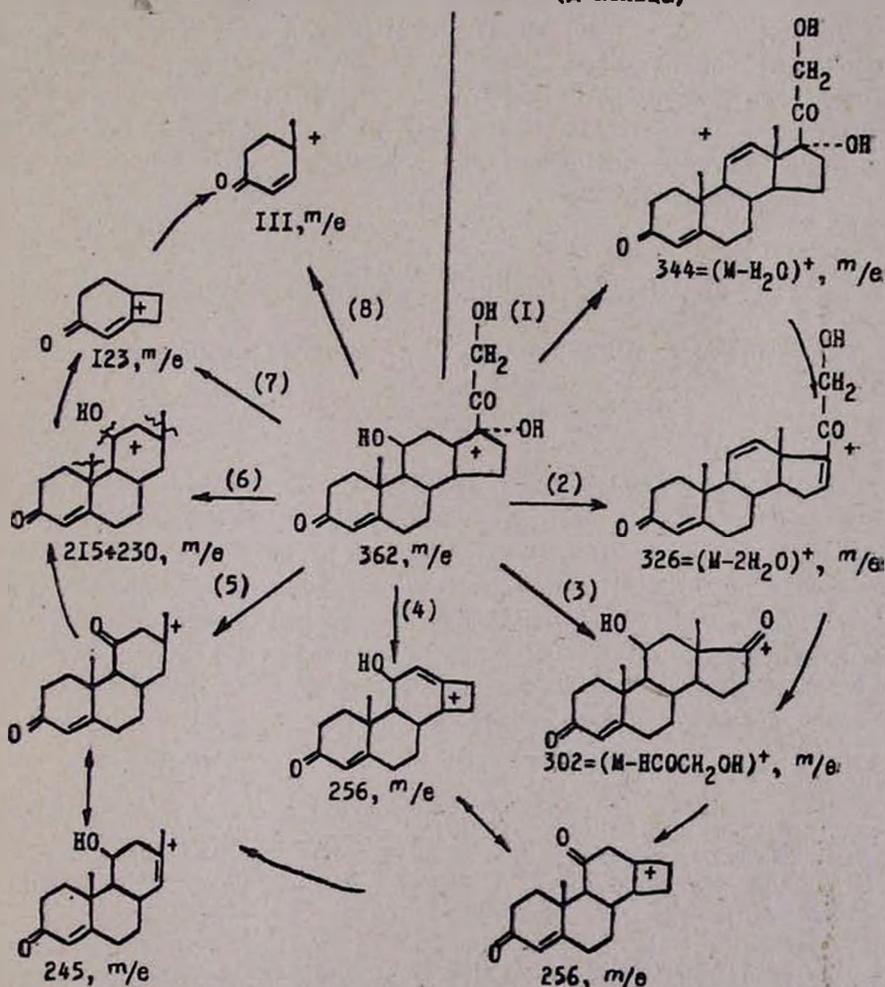
**Ионы  $M^+_{-9}$ .** Ионы, аналогичные предыдущим, но потерявшие одну из боковых групп. Ионы  $M^+_{-10, -11}$  образуются аналогичным образом с потерей остальных боковых группировок и возникновением сопряженных связей в ароматическом остове осколочных ионов.

**Среднемолекулярные ионы (100—200 м/е).** Образуются из молекулярных ионов при потере от 12 до 18 тяжелых атомов. Масс-спектры

были получены только для гидрокортизона, вводимого непосредственно в источник ионов. Ускоряющее напряжение равнялось 4 кв. В этой области лежат осколочные ионы, состоящие главным образом из А- и В-колец. Ионы не специфичны для гидрокортизона, но характерны для всех стероидов. Возможная структура для наиболее интенсивных пиков 111 и 123  $m/e$  следующая:



Основная схема распада  
молекулярного иона гидрокортизона при перегруппировке в  $C^{17}$ -положении (Д-кольца)



Основная стабилизация также, по-видимому, происходит в А-кольце осколков.

*Низкомолекулярная область пиков (100 и ниже м/е).* Эта область содержит две группы пиков 98—90 и 85—75 м/е. Большинство пиков образуется из бензольного кольца и его производных (83, 81, 79 м/е), из боковой группы (76 и 77 м/е) и фенолятов (98, 97, 95 м/е).

Таким образом, можно сделать вывод, что химическая молекула гидрокортизона крайне неустойчива и легко может претерпеть интенсивные переупорядковки при электронном ударе. Наиболее характерными являются пики 362, 344, 302, 227—229, метастабильные пики, 129, 123, 111 и 109 м/е линии. Особенно характерными являются метастабильные пики 227—229 м/е, образующиеся при элиминации боковой группы и одной молекулы воды. Идентификация гидрокортизона по масс-спектрам в общем более затруднительна, чем кортизона или других стероидных гормонов. Однако эта задача все же может быть удовлетворительно решена.

Вероятно, по той же причине—высокой реакционной способности молекулы гидрокортизона и ее производных—невозможно проводить их газохроматографический анализ. Масс-спектрометрия с прямым вводом вещества в этом отношении более благоприятна, поскольку удается установить корреляцию между исходной структурой вещества и наблюдаемыми масс-спектрами.

## ՀԻՂՐՈՎՈՐՏԻՉՈՆԻ ՄԱՍՍ-ՍՊԵԿՏՐԱԶԱՓԱԿԱՆ ԱՆԱԼԻԶ

Պ. Վ. ՍԵՐԳԵԵՎ, Վ. Գ. ՄԱՆՈՒՍԱԶՅԱՆ, Ռ. Դ. ՍԵՅՏՈՒԼԼԱ և Մ. Մ. ՄՈՒԼՏԱՆՈՎՍԿԻ

### Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված և ն հիդրոկորտիզոնի մասս-սպեկտրները փորձի տարբեր պայմաններում, նկատի ունենալով այդ նյութի անկայունությունը՝ տարբեր պայմաններում հեշտություն փոխարկությունների ենթարկվելը:

Տրված է ելալին իոնի քայքայման տարբեր արգասիքների բացատրությունը, բերված է ելալին մոլեկուլային իոնի ճեղքմամբ դոյացած ծանր բեկորների աղյուսակը: Արված է հետևություն, որ հիդրոկորտիզոնի մոլեկուլը շափազանց անկայուն է և էլեկտրոնային հարվածի դեպքում կարող է ենթարկվել ներմոլեկուլային ինտենսիվ վերախմբավորումների:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. В. Г. Зашкин, Автореферат дисс., ИХПС АН СССР, Москва, 1967.
2. Н. С. Вульфсон, И. В. Торгов, В. И. Зарецкий, В. Н. Леонов, С. Н. Ананченко, В. Г. Зашкин, Изв. АН СССР, ХН, 1964, 184.
3. V. I. Zaretskii, N. S. Vulfson, V. G. Zalkin, L. M. Kogan, N. E. Voishillo, I. V. Togov, Tetrahedron, 22, 1399 (1966).

4. В. И. Зарецкий, В. Г. Заикин, Н. С. Вульфсон, С. Н. Ананченко, В. Н. Леонов, И. В. Торгов, Рефераты докладов на IX Менделеевском съезде по общ. и прикл. химии, Киев, 1965, стр. 84.
5. V. I. Zaretskii, N. S. Vulfson, V. G. Zaitin, V. N. Leonov, S. N. Ananchenko, I. V. Torgov, *Tetrahedron Letters*, 1966, 347.
6. H. S. M. Ficher, *Advances of Mass-Spectrometry*, vol. II, 1960.