

П. В. СЕРГЕЕВ, В. Г. МАНУСАДЖЯН, Р. Д. СЕЙФУЛЛА

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХОЛЕСТЕРИНА И ГИДРОКОРТИЗОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

Задачей настоящего исследования являлась качественная и количественная дифференцировка наличия стероидов в хлороформном экстракте печени крысы при помощи масс-спектрометрического анализа. Холестерин при этом являлся основным субстратом изучаемого экстракта. Известно, что гидрокортизон синтезируется из холестерина, претерпевающего при этом ряд метаболических превращений. В то же время введение гидрокортизона, по нашему мнению, должно отразиться на биосинтезе холестерина. Кроме указанного процесса могут происходить и другие биохимические сдвиги, в частности возможно образование продуктов катаболизма вводимого стероида в относительно больших количествах. В работе рассмотрена возможность идентификации холестерина и введенного свободного гидрокортизона по масс-спектрам хлороформного экстракта.

Экспериментальная часть. Масс-спектры снимались на приборе МИ-1305 со специальной системой ввода вещества. Образец вводился в ионный источник на стальной проволоке, к концу которой был прикреплен шарик диаметром 1,5 мм. На него наносился хлороформный экстракт и высушивался при комнатной температуре (1 гамма веществ). Эту оценку можно сделать по интенсивности характерных пиков в стандартных и опытных масс-спектрах, по спаду интегрального ионного тока в течение времени, и, косвенно, по уже известным результатам наличия свободного стероида в исследуемой ткани. В нашем случае она равнялась примерно одной гамме.

Ионный источник был снабжен дополнительной системой обогрева. Спектры снимались при температуре $120 \pm 2^\circ\text{C}$. Температура на поверхности источника измерялась парой хромель-копель. Эффект памяти устранялся при температуре около 300°C в течение двух часов. Масс-спектры снимались при ионизирующем напряжении 60 в, ускоряющем напряжении 4 кВ, на первом усилителе (шкала 0,1 или 0,03 в). Воспроизводимость масс-спектров хорошая в первые полчаса. Время регистрации масс-спектра в области $400-200 \text{ М/е}$ —3 или 6 мин. Аналогично снимались спектры в области $200-70 \text{ М/е}$.

Гидрокортизон фирмы Н. В. Органон-ОСС (Голландия) вводился крысе в дозе 10 мг/кг живого веса. Через один час их забивали, печень извлекалась и гомогенизировалась. После центрифугирования при 1000 g в течение 10 мин к надосадочной жидкости добавляли 2 куб. см очищенного хлороформа и смесь интенсивно встряхивали в течение одной минуты. Экстракт переливался в пробирку и упаривался. Перед анализом к остатку добавляли несколько капель хлороформа, затем его микрошприцем переносили на шарик системы ввода.

Результаты и их обсуждение. Полученные масс спектры в контроле и опыте приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

Общая характеристика приведенных масс-спектров следующая. Наблюдается соответствие спектров рис. 1 и 2а.

Пики слабой интенсивности возрастают в низкомолекулярной области по экспоненте, а средней и сильной интенсивности повторяются в обоих спектрах. Такая воспроизводимость масс-спектров позволяет идентифицировать тождественность хлороформного экстракта.

Интерпретация отдельных пиков может быть произведена на основании литературных данных по масс-спектрам холестерина [2], гидрокортизона [4] и кортизона [7], а также изучением не масс-спектрометрических методов того же самого экстракта из плазмы крови и печени крысы [8, 9]. В последних двух работах, а также в работах Соффера и сотр. [6], Горизонтова и Протасовой [1], Лейтеса с сотр. [3], Юдаева и др. [5] было показано, что хлороформный экстракт содержит примерно в 10 раз больше холестерина, чем кортикостероидов, причем абсолютное количество его возрастает после введения гормонов. Возрастание общей интенсивности пиков было зарегистрировано и нами. При тех же условиях она повышалась примерно в два-три раза (на рис. 1 и 2 масштабы относительных интенсивностей 1:3). Помимо этого, в масс-спектрах на рис. 2. прослеживаются следующие изменения.

Возрастает интенсивность пика 302 М/е, меняется интенсивность пика 256 М/е, который превосходит пик 213 М/е.

Увеличивается интенсивность пиков 227 и 217 М/е на рис. 2 (на рис. 1 они плохо проявлены). Наиболее сильно меняются метастабильные пики в области 227—229 М/е на рис. 1, они сдвигаются в область 229—231 М/е. Хорошо проявленный пик 227,5 М/е на рис. 1 исчезает после введения гидрокортизона и вместо него появляется пик 229,5 М/е.

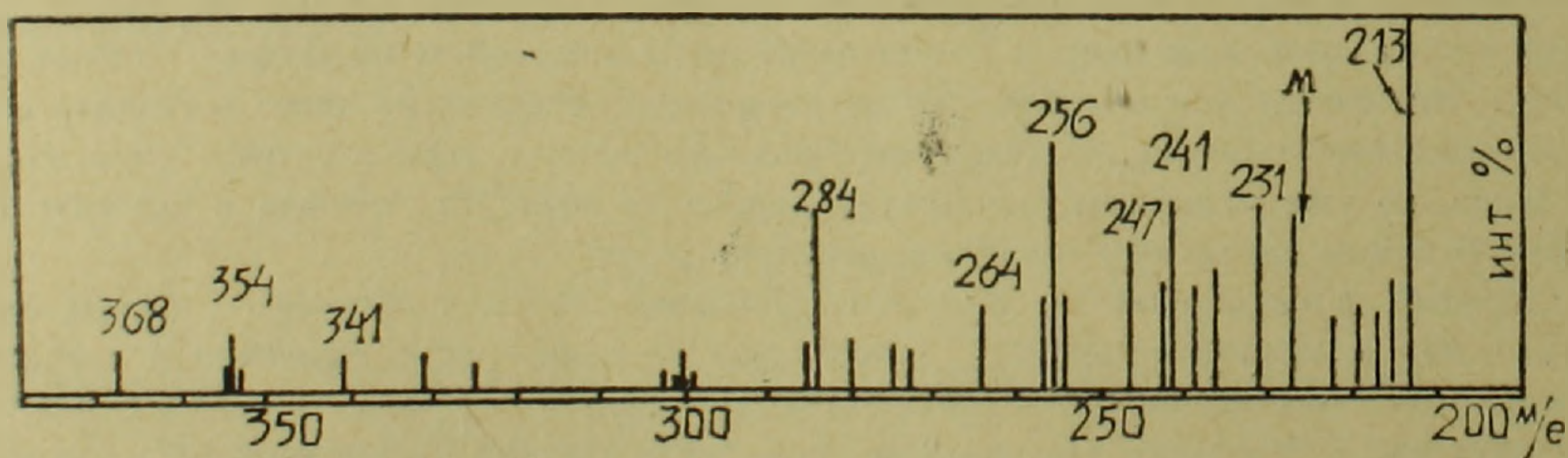
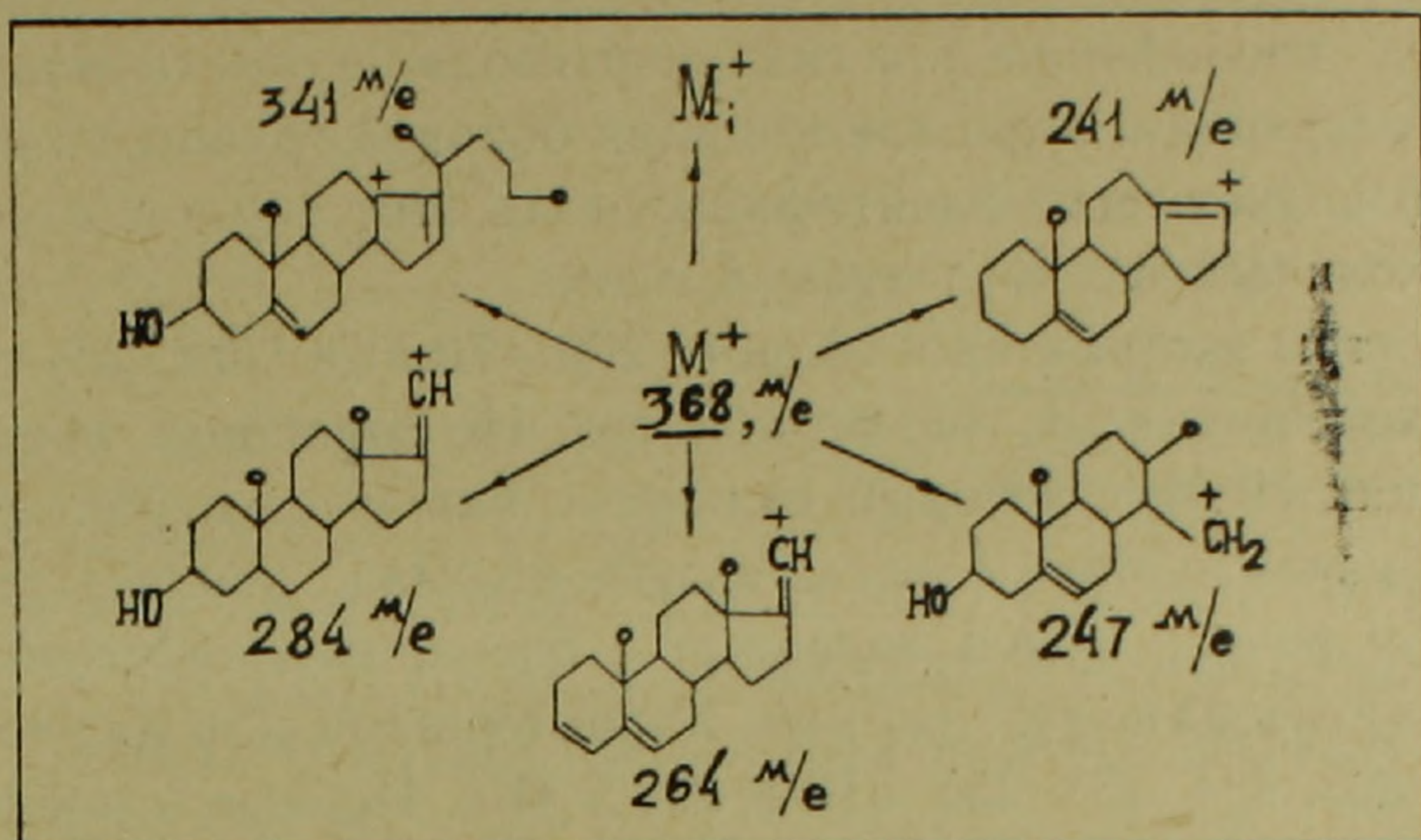


Рис. 1. Масс-спектр хлороформного экстракта печени крысы в контроле.

Интерпретация части наблюдающихся пиков, как соответствующих осколочным ионам холестерина, позволяет отнести пики 386, 371, 368, 353, 354, 301, 275, 273, 255, 256, 231 и 213 М/е к различным фрагментациям молекулярного иона $M^+ = 386$ М/е. Соответствующие структурные формулы приведены в работе Горизонтова и Протасовой [1]. Дополнительные осколочные ионы, соответствующие пикам 341, 284, 264, 247 и 241 М/е, интерпретированы нами как фрагменты с возможной структурной формулой



Интерпретация масс-спектров химически чистого гидрокортизона проведена нами в вышеприведенной работе. Это позволяет провести частичную идентификацию пиков на рис. 2. Возрастание пика 302 М/е может происходить из-за вклада в интенсивность линии 302 М/е фрагмента

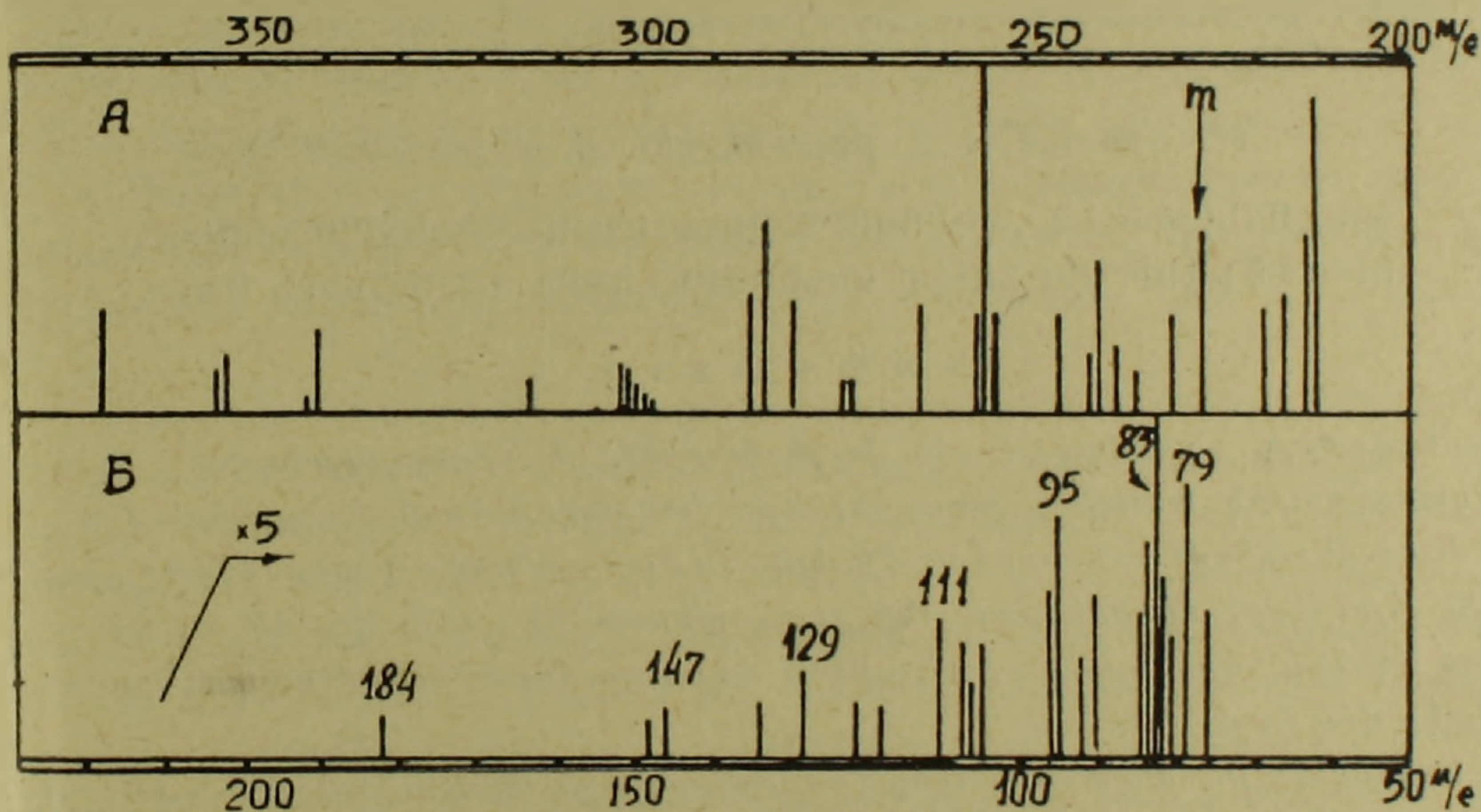
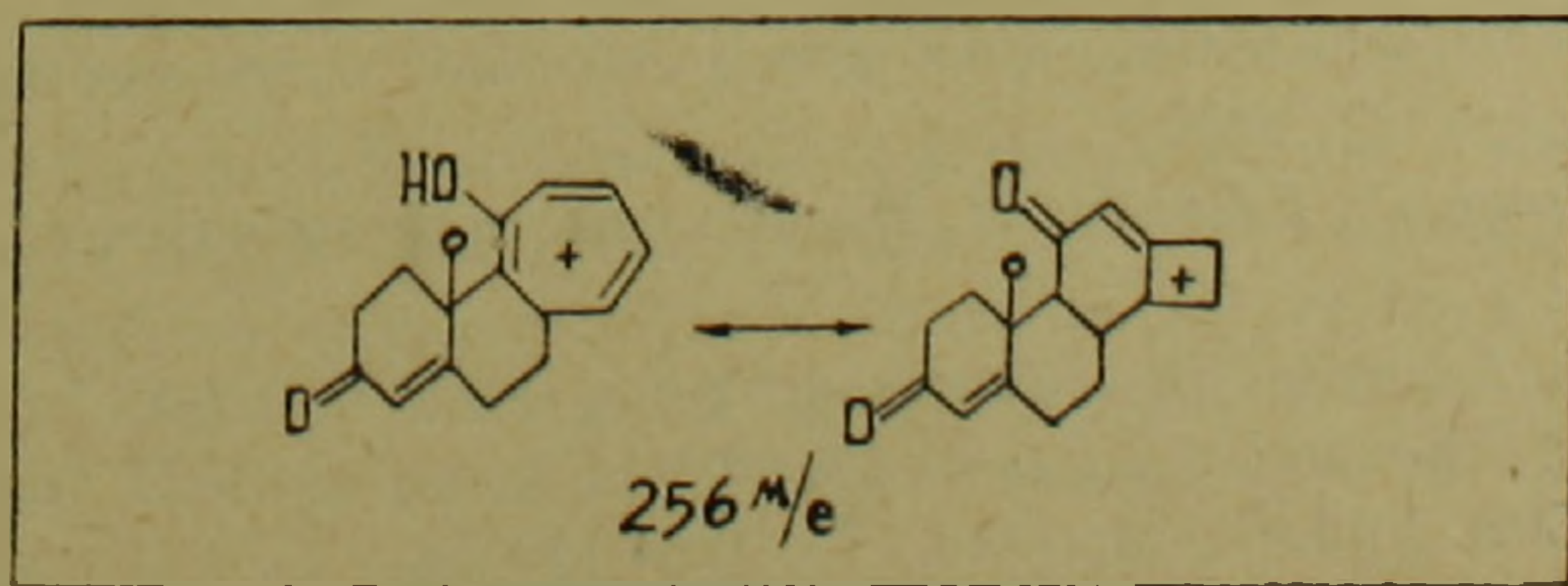


Рис. 2. Масс-спектр хлороформного экстракта после введения гидрокортизона в дозе 10 мг/кг. Места появления диффузных метастабильных пиков слабой-средней интенсивности показаны на спектрах стрелками.

гидрокортизона, соответствующего элюминации боковой группы из молекулярного иона этого стероида. Молекулярный ион и ионы с массовым числом выше 302 М/е плохо стабилизированы, поэтому их вклад в масс-спектр рис. 2 незначительный. Зато возрастание пика 256 М/е легко может быть объяснено вкладом осколочных ионов гидрокортизона со структурной формулой



Наиболее специфична для гидрокортизона метастабильная линия 229,5 М/е, образующаяся при элюминации боковой группы из первичного иона. Она позволяет легко идентифицировать этот гормон и оценить его абсолютное количество в исследуемой ткани.

Масс-спектры экстрактов в области 200—70 М/е (рис. 26) совпадают с таковыми холестерина в той же области. Не совпадает только по интенсивности пик 79 М/е, который сильнее в наших спектрах.

Таким образом, можно сделать вывод, что масс-спектры хлороформного экстракта печени крысы содержат в основном холестерин, а после ввода гидрокортизона и этот гормон. Характерными для них пиками являются пики 302, 284, 255, 256, 213 и 229,5 М/е. Первые и последние линии, а также частично 256 М/е пик, являются специфичными для гидрокортизона. Проведенная работа позволяет считать, что метод масс-спектрометрии с успехом может быть применен для идентификации и анализа изменений этих веществ в организме человека и животных.

Государственный медицинский институт
им. Н. И. Пирогова, г. Москва

Поступило 1.IX 1970 г.

Պ. Բ. ՍԵՐԳԵՎ, Վ. Գ. ՄԱՆՍԱԺՅԱՆ, Բ. Դ. ՍԵՅԳՈՒԼԼԱ

ԽՈՒՆՍԵՐԻՆԻ ԵՎ ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻԶՈՆԻ ՄԱՍՍ-ՍՊԵԿՏՐՈՄԵՏՐԻԿ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԲԱԲԱՆԱԿԱՆ ՆՄՈՒՇՆԵՐԻ ՄԵՋ

Ս. մ ֆ ի ռ լ ի ռ լ մ

Հոգվածում շարադրված են խոլեստերինի և հիդրոկորտիզոնի մասս-սպեկտրոմետրիկ անալիզի արդյունքները կենսաբանական նմուշներում:

Ուսումնասիրվել են նորմալ մկների համար ստացված քլորոֆորմի լյարդային հյուսվածքի: Հիդրոկորտիզոնի ջրա-սպիրտային լուծույթը 10 մգ/կգ դոզայով մկների սրսկելով, այդ հյուսվածքի մեջ ուսումնասիրվել է ազատ հորմոնի քանակը մեկ ժամ հետո:

Ստացված լուսապատկերները (սպեկտրները) հնարավորություն են տալիս որոշելու և նույնականացման (իդենտիֆիկացիայի) ենթարկելու խոլեստերինի և հիդրոկորտիզոնի մոլեկուլները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Горизонтов П. Д., Протасова Т. М. Роль АКТИГ и кортикостероидов в патологии. Медицина, М., 1968.
2. Зарецкий В. И., Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Паперная И. Б. Хим. прир. соедин., 6, 1967.
3. Лейтес С. М., Лаптева Н. И. Медицина, М., 1967.
4. Сергеев П. В., Манусаджян В. Г., Сейфулла Р. Д., Мультановский М. М. Масс-спектрометрический анализ гидрокортизона. Изв. АН АрмССР, серия химическая (в печати).
5. Современные методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. Медицина, М., стр. 39, 1968.
6. Соффер Л., Дорфман Р., Гебрилов Л. Надпочечные железы человека. Медицина, М., 1966.
7. Fitches H. J.—M. Advances of mass-spectrometry, vol. II, 1960.
8. Launghlin J. Mc., Kamiethki T., Gray I. Analgt. Chem., 30, 1517 (1958).
9. Sweet M. L. J. Clin. Endocr. Merabol., 15, 1044 (1955).