

В. Г. МАНУСАДЖЯН, М. М. МУЛЬТАНОВСКИЙ

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ХЛОРОФОРМНОГО ЭКСТРАКТА ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В ИОННОМ ИСТОЧНИКЕ МАСС- СПЕКТРОМЕТРА

Фракционирование хлороформного экстракта печени крысы в ионном источнике масс-спектрометра позволяет идентифицировать холестериную, жирнокислотную и стероидную фракции смеси.

Исследование хлороформного экстракта печени крысы представляет интерес при изучении липидного обмена в организме. В настоящей работе представлены результаты по фракционированию указанной биопробы в ионном источнике масс-спектрометра. Такой анализ позволяет проводить исследование различных компонент биопробы без предварительного разделения смеси на газ-жидкостном хроматографе, когда необходимо превращение исходных продуктов в летучие производные. Связанные с этим манипуляции приводят не только к дополнительному расходу вещества, но и связаны с возможной деструкцией некоторых компонент [1]. Прямой ввод сложного образца, хотя и дает довольно сложную картину масс-спектров, является, на наш взгляд, перспективным при анализе следовых количеств веществ.

Материал и методика. Хлороформный экстракт был получен из печени белых крыс-самцов. Производилась декапитация животных, печень извлекалась и гомогенизировалась в приборе Поттера с тefлоновым пестиком. К гомогенату добавлялось 3 см³ очищенного хлороформа, смесь интенсивно встряхивалась в течение 5 мин, после чего она отстаивалась, и хлороформный слой переливался в пробирку и упаривался. Перед масс-спектрометрическим анализом к остатку добавлялось несколько капель хлороформа, и раствор вносился с помощью микрошприца в тигель печного источника ионов.

Опыт был проведен на приборе типа МИ-1305; ускоряющее напряжение—2 кВ, ионизирующее—70 В, развертка спектра производилась в течение 15 мин в диапазоне масс 320—70 м/е, начиная от высокомолекулярной области спектра. Первый анализ проводился через 5 мин после введения образца в источник. Диапазон регистрируемого сигнала лежал в области 1—30 мВ (сопротивление входа $5 \pm 2 \cdot 10^{11}$ ома). Давление в источнике ионов не превышало $5 \cdot 10^{-6}$ тор.

Спектры снимались при температурах 22, 400, 800 и 1100°. Масс-спектры регистрировались непрерывно в течение 4 час. до полного исчезновения пиков в области выше 200 м/е.

Результаты и обсуждение. Полученные масс-спектры представлены на рис. 1 и 2. Характер изменения масс-спектра смеси в течение анализа меняется довольно сильно. До прогрева тигля он практически отсутствует. Аналогичная картина наблюдается и после проведения полного анализа, когда во всей анализируемой области не удается зарегистриро-

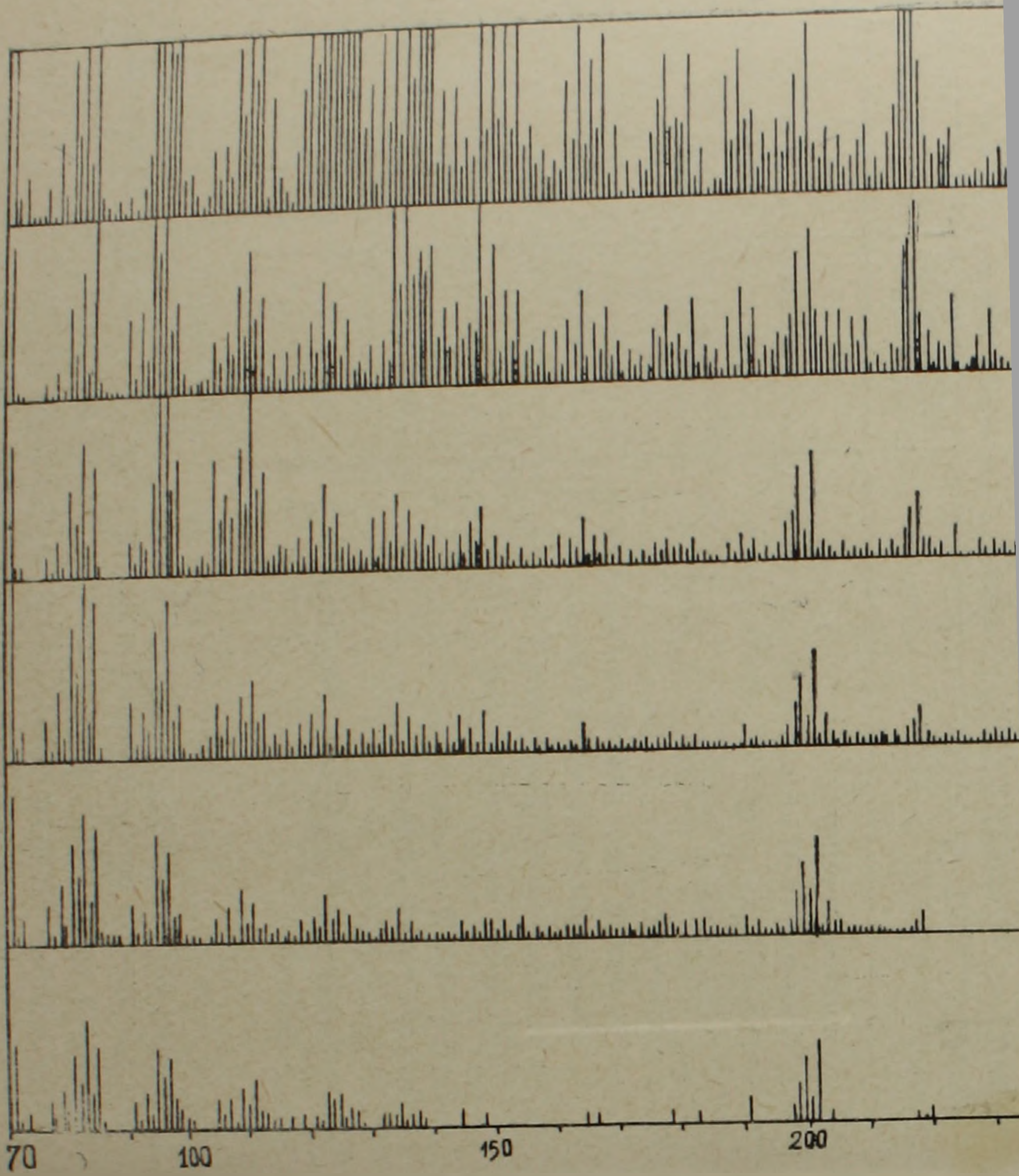
вать ни одного пика. После повышения температуры до 400° появлялся интенсивный спектр. Наиболее характерной особенностью первого спектра (рис. 1а) является наличие в области 218—220 м/е группы пиков с интенсивностью более 0,06 в, спадающих за 15 мин до значений 0,03 в, а еще через 15 мин достигающих значения 0,01 в. Значительное изменение картины масс-спектра в течение всего анализа позволяет сделать некоторые выводы о составе образца. В работе Хидена и др. [1] с помощью тонкослойной хроматографии было показано, что хлороформ-метаноловый экстракт содержит почти все основные липидные компоненты: холестериновые эфиры, свободные жирные кислоты и их сложные эфиры, свободный холестерин, моно-, ди- и триглицериды, фосфолипиды, а также стероидные компоненты. Кроме того, в экстракте можно ожидать наличие следовых количеств жирорастворимых продуктов метаболизма. Все это затрудняет проведение анализа и интерпретацию отдельных пиков.

Известно, что наибольшее количество в экстрагенте приходится на долю свободного холестерина и жирных кислот, особенно олеиновой, стеариновой и пальмитиновой кислот и стероидной фракции [1—3]. Это позволяет прежде всего сделать попытку интерпретировать те пики, которые относятся к холестериновой, стероидной и жирнокислотной фракции. В табл. 1 приведены основные характеристики некоторых веществ.

Таблица 1
Физические характеристики некоторых липидов

	Молекулярный вес а. е. м.	$T_{пл}^{\circ}C$
Жирные кислоты:		
Олеиновая C-18 : 1	282	16
Стеариновая C-18	284	70
Пальмитиновая C-16	256	56
Эфиры сложные:		
Метиловый эфир пальмитиновой кислоты	270	29,5
Метиловый эфир стеариновой кислоты	298	40
Этиловый эфир пальмитиновой кислоты	264	24
Этиловый эфир стеариновой кислоты	312	31,7
Холестерин	386	148
Стероидная фракция	260—350	150—300
Глицериды		
Тристеарин, трипальмитин, триолеин	выше 800	72—4,65
Лецитины	выше 700	выше 250

Приведенные данные показывают, что наиболее интенсивно испаряются в первые минуты жиры и жирные кислоты, а затем холестерин, стеронды и лецитины. Следовательно, следует ожидать наличие в масс-спектрах пиков прежде всего C-16 и C-18, C-18:1 жирных кислот. Прак-



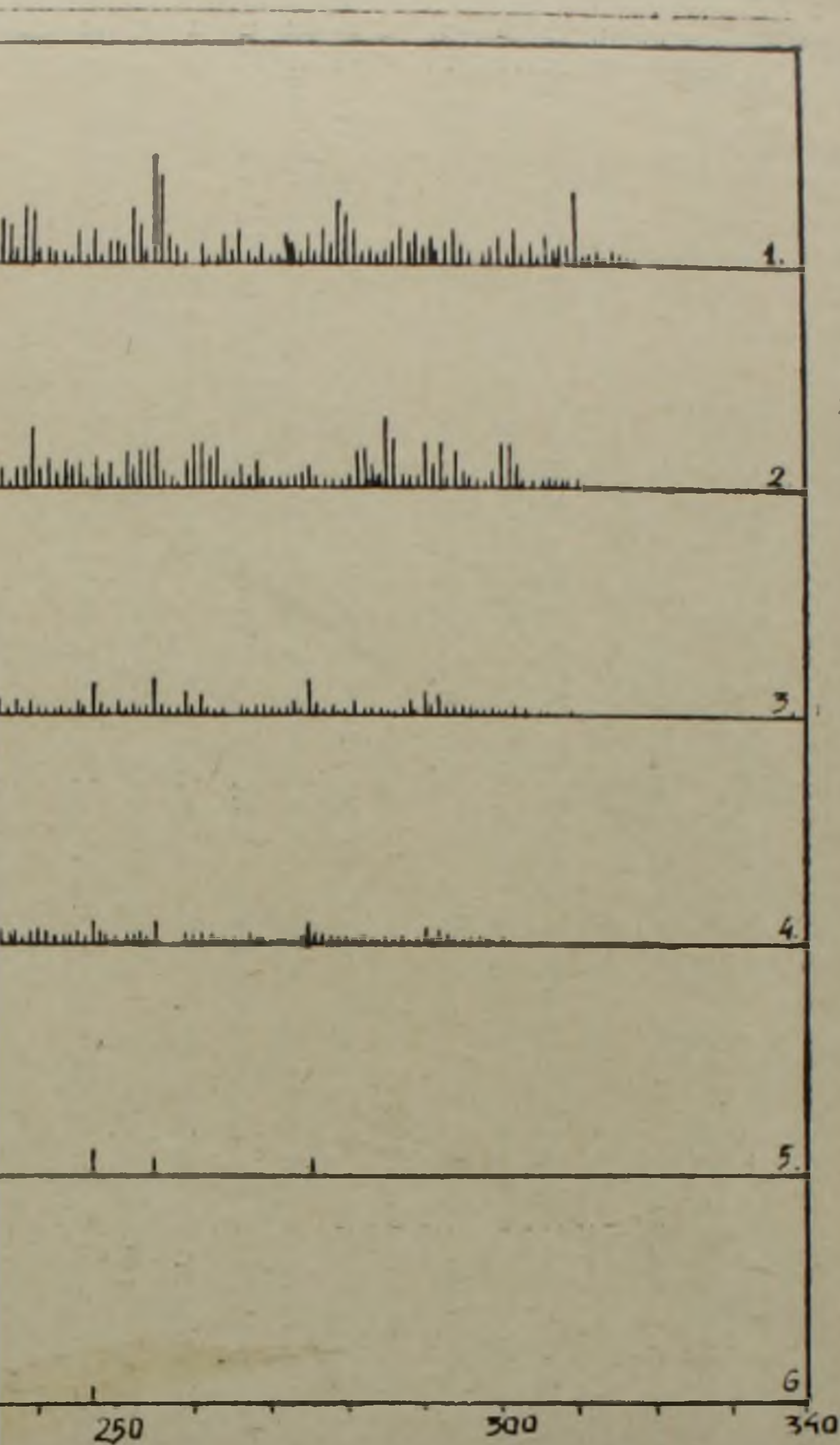


Рис. 1 — Масс-спектры хлороформного экстракта из печени крысы (запись спектра от 320 m/e начинается на 6 минуте после ввода образца: температура подогревателя тигля 400° ; вся шкала ординат соответствует 30 мв; развертка от 320 до 70 m/e происходит в течение 15 минут; порядок спектров 1, 2....соответствует началу записи через 6, 21, 36, 51, 66, 81 минут после ввода образца).

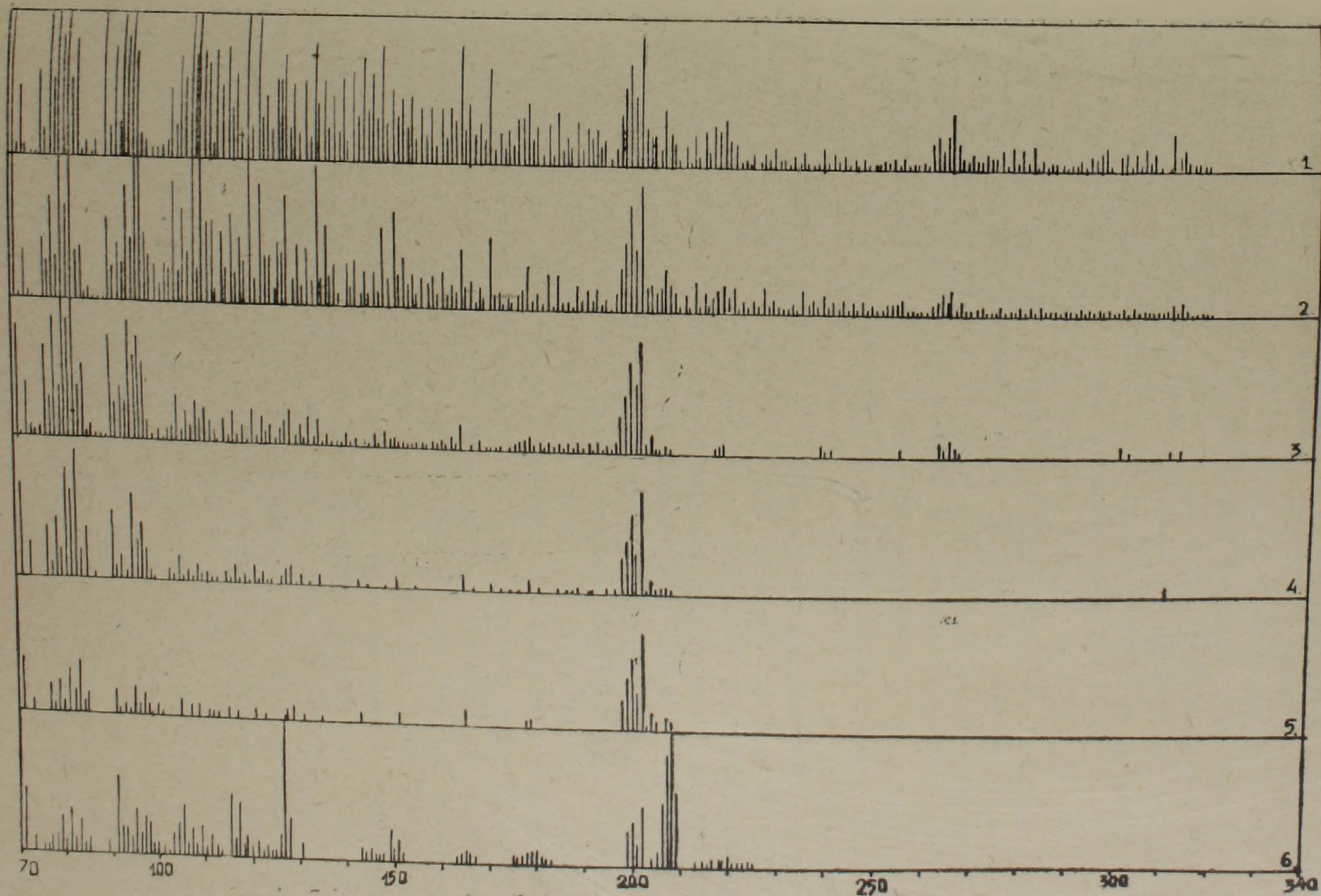


Рис. 2.— Масс-спектр хлороформного экстракта из печени крысы (1—5 сняты при $T_{\text{подогр.}} = 800^\circ$; 6—при $T_{\text{подогр.}} = 1100^\circ$; порядок спектров 1, 2, 3... соответствует 96, 111, 126, 141, 156 и 171 минутам после ввода образца с началом записи от 320 m/e . Шкала ординат та же).

тически такого идеального разделения в вакууме не происходит, а будет иметь место одновременное испарение всех веществ. Заметим, что возрастание температуры на подогревателе тигля приводит к распространению обогреваемого участка в источнике ионов и к десорбции осажденных веществ. На рис. 2.6 в масс-спектрах появляются пики изотопов свинца 206—207 м/е при прогреве тигля 1100°. При этом свинцовый шарик находится вне источника ионов—в трубке ввода вещества, т. е. находится на расстоянии 1 см от области ионизации. Присутствие ионов Рв служит характеристикой прогрева ионизационной камеры около шарика (температура плавления свинца 327,3°). Следовательно, в самом источнике ионов температура во время анализа не превышает 300°, хотя на подогревателе тигля она имеет значительно более высокое значение. Это замечание следует учесть при рассмотрении температурной десорбции вещества со стенок ионизационной камеры сконденсированных на ней липидных компонент. Таким образом, учитывая физические свойства возможных имеющихся фракций в исследуемом экстракте, а также масс-спектрометрические данные чистых веществ [4—6], можно представить процессы, происходящие при введении биопробы в ионный источник. Масс-спектрометрическое изучение стероидов производилось в работе [4]. Жирные кислоты были изучены в работе Мак-Лафферти [6]. Согласно данным этой работы, молекулярные пики указанных кислот наблюдаются в масс-спектрах и имеют интенсивность около 5% от общего ионного тока. Это же относится и к эфирам соответствующих кислот. Жирные кислоты могут терять ОН и COOH-группы; в случае стеариновой кислоты такой потери не происходит [6]. Масс-спектр стеариновой кислоты содержит очень интенсивные пики в исследованной нами области (71, 73 м/е), пики средней интенсивности 83, 85, 97 и 129 м/е и слабой 111, 115, 143, 157, 172, 185, 199, 213, 231, 255 и 284 м/е. Пик 284 м/е соответствует молекулярному иону, а пик 255 м/е содержится в спектрах большинства стероидов и холестерина. Метиловый эфир стеариновой кислоты в масс-спектре содержит пики 73, 86, 143, 255 и 298 м/е. В одной из наших работ [3] была сделана попытка идентифицировать по масс-спектрам хлороформного экстракта холестерин и гидрокортизон. Описание масс-спектра гидрокортизона дано в предыдущей работе [5]. Пики стероидной и холестериновой фракций находятся выше 300 м/е. Разложение жиров приведет к появлению пиков, лежащих ниже 300 м/е, а прямое испарение жиров даст пики в масс-спектрах в области 20—1200 м/е. Совокупность приведенных данных позволяет произвести пробную интерпретацию полученных спектров.

Как уже было отмечено, в первые 30 мин быстро спадают пики 217—219, 255, 279 и 310 м/е. Если отнести эти пики к одному классу веществ, то молекулярным весом 310 а. е. м. обладает этиловый эфир олеиновой кислоты—наиболее летучий из эфиров олеиновой, стеариновой и пальмитиновой кислот. Ион с 279 м/е может образовываться из молекулярного иона этилового эфира олеиновой кислоты при реакции М-31. Пик 255 м/е присутствует в масс-спектрах жирных кислот и

их эфиров, но он не является характерным для жирных кислот или их эфиров. Появление указанного пика может произойти не только при ионизации свободного эфира. Его можно отнести к осколочным ионам триглицерида, содержащего олеиновую цепь. Как видно из табл. 1, триолеиновая кислота также имеет низкую температуру плавления. В этом плане процесс фракционирования служит дополнительным доказательством наличия олеиновой кислоты в смеси. Отнесение пиков 217—219 м/е к фрагментам сложного эфира олеиновой кислоты в этом плане допустимо. Отщепление осколка $\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OC}_2\text{H}_5$ (м/е 88) дает пик м/е 222. Последующая потеря атомов Н дает группу пиков 217—219 м/е. Аналогично ведут себя пики 151, 153, 155 м/е, которые также быстро спадают во время анализа. Аналогичные пики присутствуют в масс-спектрах стеариновой кислоты, но они сдвинуты на 2 а. е. м. в высокомолекулярную область [6]. Таким же образом можно интерпретировать пики в области 70—150 м/е.

На спектре рис. 1.2 пики 285, 255, 231, 183, 111, 97, 85, 83, 71 м/е можно отнести также к стеариновой кислоте [6]. Такая пробная интерпретация полученных масс-спектров и отнесение основных пиков в масс-спектрах к стеариновой, пальмитиновой и олеиновой кислотам, а также холестерину, гидрокортизону и кортизону приведена в табл. 2.

Таблица 2

Масс-спектральные характеристики некоторых липидов

Вещество	Пик м/е
Стеариновая кислота [6]	$\left\{ \begin{array}{l} 284, 255, 231, 213, 199, 185, 172, 157, \\ 129, 115, 111, 97, 87, 85, 83, 73, 71 \end{array} \right\}$
Холестерин [4]	301, 275, 255, 231, 213, 145
Кортизон [7]	300, 285, 257, 258, 124
Гидрокортизон [5]	$\left\{ \begin{array}{l} 302, 285, 269, 256, 231, 219-217, 213, \\ 185, 163, 141, 129, 123, 111, 98, 83, 71 \end{array} \right\}$

Приведенные в табл. 2 пики в области 310—70 м/е имеют среднюю интенсивность, а наиболее интенсивные пики даны курсивом.

На основании этих данных (табл. 2), а также сведений по физическим свойствам жирных кислот и их эфиров (табл. 1), данных по газовой хроматографии хлороформ-метаноловых экстрактов из биопроб [2, 8], составлена табл. 3.

Таким образом, процесс фракционирования биопробы в ионном источнике масс-спектрометра позволяет, по-видимому, сделать заключение, что предварительно испаряются жиры, жирные кислоты и их эфиры, затем стероиды и холестеринная фракция.

Пробная интерпретация масс-спектров

Характерные пики и их интерпретация

- 310 на всех спектрах рис. 1 и 2 — этиловый эфир олеиновой кислоты.
 302 и 300 на всех спектрах — гидрокортизон и кортизон соответственно.
 279 — рис. 1.1 — этиловый эфир олеиновой кислоты.
 255 на всех спектрах — не характерен для отдельного вещества, характерен для липидной фракции.
 275 (1.3—1.5) — холестерин.
 285 (1.2) — гидрокортизон.
 239, 247 (рис. 1 и 2) — пики не интерпретированы.
 231 (1.2—1.3) — гидрокортизон, стеариновая кислота, холестерин.
 225 (1.2—1.3) — стеариновая кислота.
 217—219 (рис. 1 и 2) — гидрокортизон и олеиновая кислота.
 213 (2.1 и 2) — холестерин, гидрокортизон.
 207 (2.1—3) — гидрокортизон, кортизон.
 Ниже 200 м/е пики не характерные.

II Московский медицинский
институт

Поступило 15.XI 1972 г.

Վ. Գ. ՄԱՆՈՒՍԱԶՅԱՆ, Մ. Մ. ՄՈՒԼՏԱՆՈՎՍԿԻ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՔԼՈՐՈՖՈՐՄԱՅԻՆ ՀՅՈՒԹԻ ԹՈՐՈՒՄԸ
ՄԱՍՍ-ՍՊԵԿՏՐՈՄԵՏՐԻ ԻՈՆԱՅԻՆ ԱՂՔՅՈՒՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Աշխատության մեջ քննվում է առնետների լյարդի քլորոֆորմային հյուսիս ֆրակցիոնացման կինետիկան ՄԻ-1305 տիպի մասս-սպեկտրոմետրի իոնային աղբյուրում՝ նյութի ուղղակի ներմուծման ժամանակ:

Սպեկտրերը ստացվել է 70—340 m/e:

Ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց փոփոխվում է մասս-սպեկտրի բնույթը համապատասխան ցածրաբեռ ֆրակցիաների գոլորշիացմանը:

Հողվածում փորձ է արվում իդենտիֆիկացնել մի քանի յուղային թթուներ, ստերիններ և ստերոիդներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хиден Г., Сняк К., Рюхаге Р., Сняк Л., Фри Г. Изв. АН СССР, БН, 3, 1971.
2. Берчфилд Г., Серрс Э. Газовая хроматография в биохимии, М., 1964.
3. Сергеев П. В., Манусаджян В. Г., Сейфулла Р. Д. Биологический журнал Армения, 24, 7, 1971.
4. Зарецкий В. И., Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Паперная И. Б. Химия природн. соедин., 6, 1967.
5. Сергеев П. В., Манусаджян В. Г., Сейфулла Р. Д., Мультановский М. М. Арм. хим. журн., 24, 2, 1971.
6. McLafferty F. W. Appl. Spectr., 11, 148, 1956.
7. Flier H. S. M. Adv. of Mass-Spectrometry, 2, 1960.
8. Товбин И. М. Краткая хим. энци., Изд. СЭ, 1, стр. 710—711, М., 1961.