



УДК 577.175.82/85.088:543.51

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ И ТРОМБОКСАНА В₂
МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВТОРИЧНЫХ ИОНОВ*Садовская В. Л., Ракитин Л. Ю., Голованова Н. К.*,
Когтев Л. С.**, Безуглов В. В.**, Бергельсон Л. Д.****Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, Москва;*** Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва;**** Институт биоорганической химии им. И. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва*

Изучены масс-спектры, полученные методом масс-спектрометрии вторичных ионов, простагландинов E, F, I₂ и тромбоксана В₂. Показано, что данный метод пригоден для прямой идентификации этих соединений как в виде свободных кислот, так и в виде их натриевых солей. Для последних из данных масс-спектров может быть получена информация о молекулярных массах, а из спектров нативных кислот — о структурных особенностях молекул. Предел детектирования при работе в режиме вторично-ионной масс-спектрометрии составляет ~1 мкг, что позволяет анализировать растворы простагландинов с концентрацией 1 мкг/мкл, применяемые при фармакологических испытаниях.

Идентификацию и количественное определение простагландинов и их основных метаболитов в различных природных объектах проводят в настоящее время преимущественно методом хроматомасс-спектрометрии (ХМС) [1]. С этой целью применяют способ регистрации отрицательных ионов, полученных химической ионизацией [2], и обычный вариант ХМС с использованием летучих производных [3], для приготовления которых необходимо провести соответствующие химические превращения. Это связано со значительными потерями анализируемых веществ. Поэтому большой интерес представляют методы прямого масс-спектрометрического анализа простагландинов без их предварительных превращений.

Среди таких методов в последнее время при анализе малолетучих и термически нестабильных веществ широкую популярность приобрели масс-спектрометрия с ионизацией ускоренными атомами (Fast atom bombardment — FAB) и вторично-ионная масс-спектрометрия (Secondary ion-mass spectrometry — SIMS). В обоих методах анализируемый образец, растворенный в глицерине и помещенный на специальный держатель-мишень, бомбардируют пучком частиц с кинетической энергией 6—8 кэВ, причем при использовании FAB бомбардирующий пучок состоит из нейтральных атомов, таких, как Ar, Xe или Kr, а в случае SIMS — из ионов Ar⁺, Xe⁺ или Kr⁺ [4, 5].

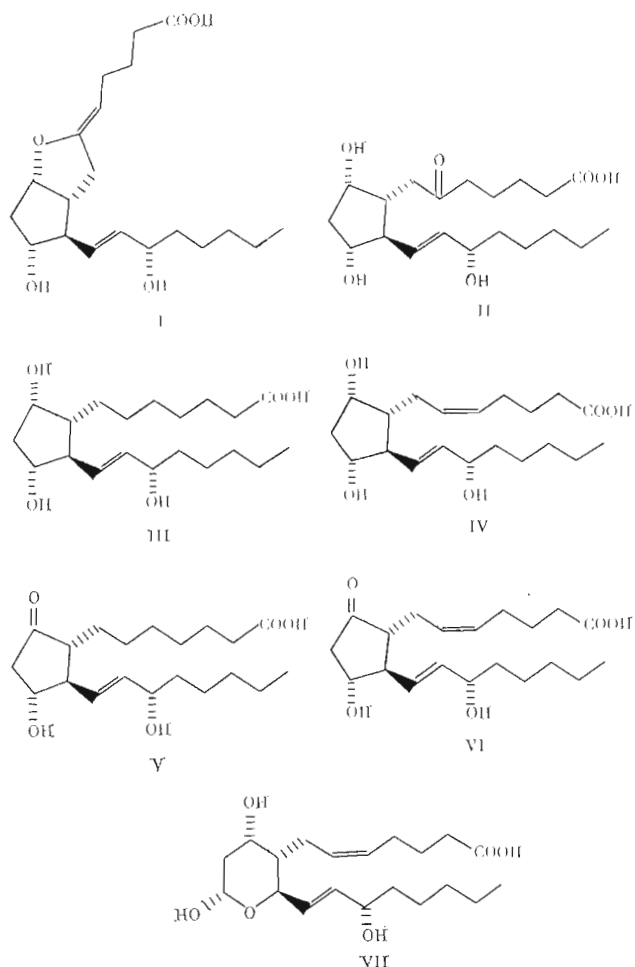
По сравнению с другими методами «мягкой» ионизации (химическая и полевая, а также полевая десорбция) методы FAB и SIMS обладают рядом преимуществ: 1) вещества анализируют без предварительной химической модификации при комнатной температуре; 2) в масс-спектрах, как правило, обнаруживаются интенсивные пики квазимолекулярных, а в ряде случаев и осколочных ионов; 3) методы пригодны для анализа высокомолекулярных и полярных соединений; 4) оба метода обладают высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью спектров.

В настоящее время эти методы широко применяют для определения молекулярных масс и отдельных элементов структуры различных классов биологически активных соединений, в первую очередь, пептидов и белков [6, 7], сложных антибиотиков [8], глико- и фосфолипидов [9—11], сульф-

фатов и конъюгатов стероидов [12, 13] и др., но до сих пор не использовались в области простагландинов.

Предметом настоящего сообщения является изучение масс-спектров, полученных методом SIMS, для простаглицлина, простагландинов серий E и F и тромбосана B₂ с целью выяснения возможности использования данного метода для прямого анализа простаноидов в различных природных объектах и лекарственных препаратах.

В табл. 1 представлены основные характеристики масс-спектров SIMS простаглицлина (PGI₂, I), 6-кето-простаглицлина F_{1α} (6-кето-PGF_{1α}, II), простаглицлина F_{1α} (PGF_{1α}, III), простаглицлина F_{2α} (PGF_{2α}, IV), простаглицлина E₁ (PGE₁, V), простаглицлина E₂ (PGE₂, VI) и тромбосана B₂ (TXB₂, VII).



Как видно из табл. 1, масс-спектры соединений (I)—(VII) не содержат пиков молекулярных протонированных ионов $[M + H]^+$, а наиболее интенсивными в спектре являются ионы $[M - H_2O + H]^+$ или $[M + Na]^+$. Ионы $[M + Na]^+$ наблюдались в случае PGI₂ и TXB₂, так как эти соединения анализировали в виде растворов их натриевых солей. В спектрах также присутствует ряд фрагментных ионов, образующихся в результате последовательного элиминирования молекул воды из иона $[M - H_2O + H]^+$.

Отличительная особенность масс-спектров 9-кето-простаглицлинов (V, VI) заключается в наличии интенсивных ионов $[(M - H_2O + H) - 71]^+$. Элиминирование радикала C₅H₁₁[•] (71 а.е.м.) на различных стадиях масс-спектрометрической фрагментации — наиболее характерный путь распада производных простаглицлинов (метильных эфиров, ТМС-производ-

Основные характеристические ионы в масс-спектрах SIMS, полученных с добавлением NaHCO_3 к глицериновым растворам соединений (I)–(VII)

Тип иона	m/z (относительная интенсивность, %)						
	PGI ₂ (I)	6-кето- PGF _{1α} (II)	PGF _{1α} (III)	PGF _{2α} (IV)	PGE ₁ (V)	PGE ₂ (VI)	TXB ₂ (VII)
$[M+\text{Na}]^+$	375 (50)	393 (36)	379 (96)	377 (28)	377 (24)	375 (24)	393 (68)
$[M+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$	—	375 (25)	—	—	359 (12)	357 (4)	375 (12)
$[M+2\text{Na}-\text{H}]^+$	397 (100)	415 (100)	401 (100)	399 (40)	399 (100)	397 (100)	415 (100)
$[M+3\text{Na}-2\text{H}]^+$	419 (15)	437 (10)	423 (5)	—	—	—	—
$[2M+2\text{Na}-\text{H}]^+$	—	785 (1)	757 (1,5)	—	—	—	785 (1,6)
$[2M+3\text{Na}-2\text{H}]^+$	771 (2)	807 (2,5)	779 (3,5)	—	775 (4,5)	771 (8,5)	807 (38)

ных и др.) при электронном ударе. Однако, как было показано ранее [14], в масс-спектре метилового эфира PGE₂ были обнаружены два различных по строению иона $[M-\text{H}_2\text{O}-71]^+$: $[M-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$ и $[M-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2]^+$, причем образование той или иной структуры определяется положением С=С-связи в ионе-предшественнике $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Образование $\text{C}_{(15)}=\text{C}_{(16)}$ -связи в ионе $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ затрудняет отрыв пентильного радикала, в результате чего происходит расщепление циклопентанового кольца и элиминирование фрагмента $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2$.

Наличие ионов $[(M-\text{H}_2\text{O}+\text{H})-71]^+$ только в масс-спектрах SIMS простагландинов PGE₁ и PGE₂, молекулы которых содержат циклопентановое кольцо, позволяет предположить, что образование рассматриваемого иона обусловлено элиминированием фрагмента этого кольца $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2$ из иона-предшественника $[M-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. Аналогичную фрагментацию с образованием иона $[(M-\text{HF}+\text{H})-71]^+$ мы наблюдали также в масс-спектре SIMS 15-фтор-15-дезоксипростагландина E₂ (спектр не приведен).

Отсутствие ионов типа $[(M-\text{H}_2\text{O}+\text{H})-71]^+$ в масс-спектрах SIMS для PGF_{1α}, PGF_{2α} и 6-кето-PGF_{1α}, по-видимому, связано с тем, что в условиях вторично-ионной масс-спектрометрии процесс отщепления радикала C_5H_{11} вообще не протекает.

Добавление NaHCO_3 к глицериновому раствору свободных кислот (II)–(IV) существенно меняет параметры масс-спектров SIMS: в них появляются интенсивные пики положительных молекулярных ионов типа $[M+\text{Na}]^+$, $[M+2\text{Na}-\text{H}]^+$ и $[M+3\text{Na}-2\text{H}]^+$, последующая фрагментация которых выражена очень слабо (табл. 2). Интенсивность наблюдаемого в отдельных случаях пика иона $[M+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$ не превышала 25% от наиболее интенсивного пика иона $[M+2\text{Na}-\text{H}]^+$.

Кроме того, спектры вторичных ионов соединений (I)–(VII) характеризуются наличием ряда кластерных ионов типа $[2M+\text{H}]^+$, $[2(M-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$, $[2M+2\text{Na}-\text{H}]^+$, $[2M+3\text{Na}-2\text{H}]^+$ и др., m/z которых приведены в табл. 1 и 2. Как правило, интенсивности пиков этих ионов невелики и составляют 1–2% от интенсивностей пиков квазимолекулярных ионов.

Полученные результаты показали, что метод SIMS пригоден для прямой идентификации простагландинов и тромбксана B₂ как в виде свободных кислот, так и в виде их натриевых солей в водных или спиртовых растворах. При этом надежная информация о молекулярных массах исследованных соединений может быть получена из рассмотрения спектров натриевых солей по значениям m/z интенсивных ионов типа $[M+\text{Na}]^+$ и $[M+2\text{Na}-\text{H}]^+$. В то же время структурные особенности веществ более явно проявляются в масс-спектрах свободных кислот. Так, в последнем случае удается четко различить простагландины типа E и простагландины типа F при наличии одинаковой молекулярной массы.

Чувствительность рассмотренного метода позволяет анализировать непосредственно растворы простагландинов, применяемые при фармакологических испытаниях, что дает возможность контролировать чистоту этих препаратов. Например, масс-спектр PGI₂ (I) был получен из 2 мкл спиртового раствора натриевой соли с концентрацией 1 мкг/мкл.

Экспериментальная часть

Простагландины PGF_{1α}, 6-кето-PGF_{1α} и TXB₂ предоставлены фирмой Upjohn (США), а простагландины E₁, E₂ и F_{2α} — Институтом химии АН ЭССР. Масс-спектры SIMS сняты на масс-спектрометре M80-A (Hitachi, Япония), снабженном ионным источником, работающим в режимах масс-спектрометрии электронного удара и вторичных ионов (SIMS) и компьютерной системой обработки данных M-003. В качестве бомбардирующего пучка первичных ионов применяли Хе⁺ с энергией 8 кэВ, температура ионизационной камеры 30° С, ускоряющее напряжение 3 кВ, диапазон массовых чисел от 1 до 1500 а. е. м. Калибровку массоотметчика проводили, используя в качестве реферного вещества смесь глицерина с Ultra mark (PCR, Florida, США) в режиме SIMS.

Образцы для анализа готовили прибавлением 1—2 мкл водного или спиртового раствора вещества с концентрацией 1 мг/мл (или смеси, состоящей из 1 мкл раствора вещества и 1 мкл раствора NaHCO₃ одинаковой концентрации) к 1 мкл глицерина, помещаемого на серебряный держатель-мишень.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer C., Frolich J. C. Adv. Lipid Research., 1982, v. 19, p. 185—202.
2. Pace-Asciak C. R., Micallef S. J. Chromatogr., 1984, v. 310, № 2, p. 233—242.
3. May J., German B., Kinsella J. E. J. Chromatogr., 1983, v. 254, № 1, p. 91—107.
4. Martin S. A., Costello C. E., Biemann K. Anal. Chem., 1982, v. 54, № 13, p. 2362—2368.
5. Kambara H., Hishida S. Anal. Chem., 1981, v. 53, № 14, p. 2340—2345.
6. Barber M., Bordoli R. S., Elliot C. J., Tyler A. N., Bill J. C., Green B. N. Biomed. Mass Spectrom., 1984, v. 11, № 4, p. 182—186.
7. Barber M., Bordoli R. S., Sedgewick R. D., Tyler A. N. In: Recent developments in mass spectrometry in biochemistry, medicine and environmental research/Ed. Frigerio A. Netherlands. Elsevier Sci. Publ. Company, 1983, p. 233—240.
8. Pramanik B. N., Mallams A. K., Bartner P. L., Rossman R. R., Morton J. B., McGlottter J. H. J. Antibiot., 1984, v. 37, № 7, p. 818—827.
9. Hemling M. E., Yu R. K., Sedgewick R. D., Rinehart K. Biochemistry, 1984, v. 23, № 24, p. 5706—5713.
10. Arital M., Iwamori M., Higuchi T., Nagai Y. J. Biochem., 1983, v. 93, № 1, p. 319—322.
11. Ohashi Y. Biomed. Mass Spectrom., 1984, v. 11, № 8, p. 383—385.
12. Liehr J. G., Becken C. F., Ballatore A. M., Caprioli R. M. Steroids, 1982, v. 39, № 6, p. 599—607.
13. Shackleton C. H. L., Straub K. M. Steroids, 1982, v. 40, № 1, p. 35—51.
14. Когтев Л. С., Садовская В. Л., Розынов Б. В., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1260—1270.

Поступила в редакцию
3.1.1986

ANALYSIS OF PROSTAGLANDINS AND THROMBOXANE B₂ BY SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY

SADOVSKAYA V. L., RAKITIN L. Yu., GOLOVANOVA N. K.*,
KOGTEV L. S.**, BEZUGLOV V. V.**, BERGELSON L. D.**

All-Union Research Institute of Applied Molecular Biology and Genetics,
V. I. Lenin All-Union Academy of Agricultural Sciences, Moscow;

* All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow; ** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Prostaglandins E, F, I₂ and thromboxane B₂ have been studied by secondary ion mass spectrometry. It is shown that the method is suitable for direct identification of these compounds either as free acids or as their sodium salts. The spectra of the former reveal their structural features, while with the latter information on the molecular weight can be obtained. The limit of detection (about 1 μg) allows the analysis of prostaglandin solutions of 1 μg/μl concentrations used in pharmacological tests.