



УДК 547.472.062

ВЫДЕЛЕНИЕ, ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ
И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ
2-ОКСИКИСЛОТ В ВИДЕ 1,2-О-ИЗОПРОПИЛИДЕНОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ

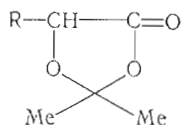
Батраков С. Г., Ушаков А. Н., Садовская В. Л.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Предложен метод количественного разделения жирных 2- и 3-оксикислот, основанный на способности 2-оксикислот давать 1,2-О-изопропилиденные производные при действии ацетона в присутствии кислотных катализаторов и устойчивости 3-оксикислот по отношению к этому реагенту. Описывается методика газохроматографического и масс-спектрометрического анализа ацетонидов жирных 2-оксикислот.

Жирные 2- и 3-оксикислоты входят в состав многих микробных липидов, причем некоторые липиды (например, липополисахариды ряда бактерий [1—7], а также сравнительно недавно открытые бесфосфорные орнитино- и лизинолипиды [8—10]) содержат сразу оба указанных типа кислот. При изучении строения таких липидов оксикислоты, полученные гидролитическим расщеплением или метанолизом, анализируют в форме тех или иных производных методами ГЖХ или комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии. Как правило, производные 2- и 3-оксикислот приходится анализировать раздельно, поскольку при ГЖХ их пики нередко перекрываются. Однако препаративное разделение рассматриваемых типов кислот при помощи ТСХ на силикагеле (в виде метиловых эфиров) [7—10] затруднительно ввиду незначительной разницы в хроматографической подвижности 2- и 3-оксиэфиров. В случае же, когда фракции тех и других оксикислот включают достаточно много гомологов или когда 2-оксикислоты имеют значительно более короткие цепи, чем 3-оксикислоты, их четкое разделение становится практически невозможным.

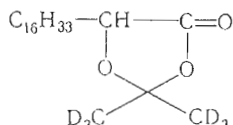
В настоящем сообщении описан новый удобный способ разделения жирных 2- и 3-оксикислот, основанный на способности первых легко реагировать с ацетоном в присутствии кислотных катализаторов и инертности вторых по отношению к этому реагенту [11]. Предлагается также новый метод газохроматографического анализа жирных 2-оксикислот в виде изопропилиденных производных структуры (I).



(Ia) R = C₁₆H₃₃;

(Iб) R = C₁₄H₂₉;

(Iв) R = C₁₀H₂₁



(II)

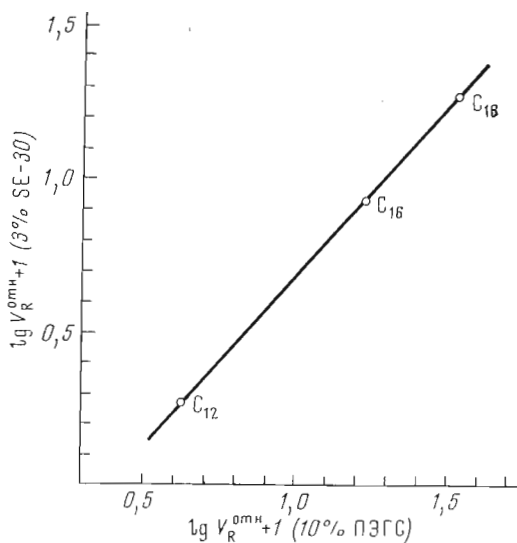


Рис. 1. Зависимость между логарифмами относительных удерживаемых объемов (V_R^{OH}) ацетовидов 2-оксикислот на полисилоксане SE-30 и полиэтиленгликольсукцинате (ПЭГС); С — число углеродных атомов в цепи оксикислоты. Значения V_R^{OH} подсчитаны относительно V_R этилстеарата. Условия анализа см. в «Экспериментальной части»

При разработке указанных методов в качестве модельных соединений использовали 2-оксооктадекановую, 2-оксогексадекановую, 2-оксидекановую и 3-оксооктадекановую кислоты. При препаративной ТСХ смеси метиловых эфиров перечисленных кислот на силикагеле с проявлением хроматограмм хлористым метиленом [12] или гексаном с эфиром [7, 8] отделить 3-оксоэфир от 2-оксоэфиров оказалось невозможным.

В результате обработки ацетоном в присутствии HCl и молекулярных сит 4 А (в качестве водосвязывающего агента) при 20—25° каждая из испытанных 2-оксикислот количественно превращалась в ацетонид (Ia—в) за 40—60 мин, тогда как 3-оксооктадекановая кислота оставалась полностью неизменной даже после 20—25-часовой выдержки реакционной смеси. Таким образом, уже сам факт образования изопропилиденового производного из оксикислоты может служить доказательством α -расположения спиртовой HO-группы по отношению к карбоксилу в ее молекуле. С другой стороны, обнаруженное различие в поведении 2- и 3-оксикислот при кетализации может быть использовано для их разделения. Найденная в ходе наших экспериментов оптимальная методика разделения состоит в следующем: смесь 2- и 3-оксикислот подвергают кетализации, как описано выше, затем реакционную массу обрабатывают избытком диазометана, чем одновременно достигается и нейтрализация смеси в безводных условиях, и превращение свободных 3-оксикислот в соответствующие метиловые эфиры. Отделение последних от ацетонидов 2-оксикислот легко осуществляется путем ТСХ или колоночной хроматографии на силикагеле. Извлечение с адсорбента тех и других производных практически количественное.

Для последующего анализа ацетониды 2-оксикислот действием раствора HCl в метаноле могут быть превращены в соответствующие метиловые эфиры, методы структурного и количественного определения которых посредством ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии хорошо разработаны [13—17]. Однако мы обнаружили, что ацетониды 2-оксикислот сами являются

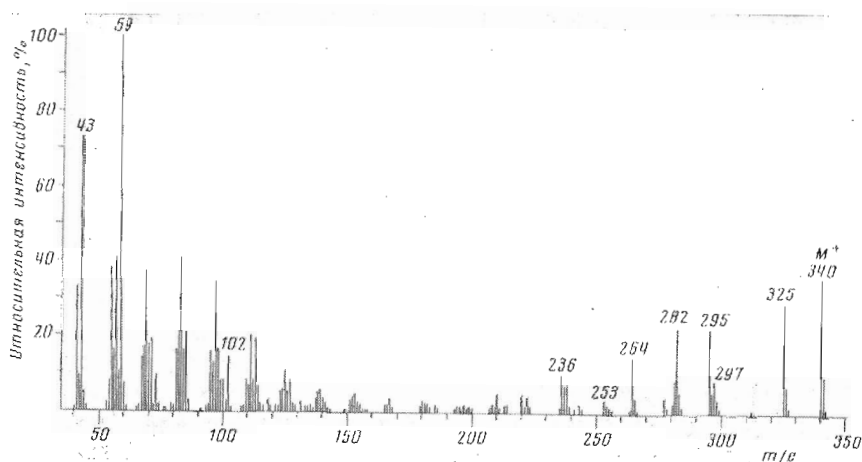


Рис. 2. Масс-спектр ацетонида 2-октоадекановой кислоты (2,2-диметил-4-гексадецил-5-кетодиоксалана-1,3)

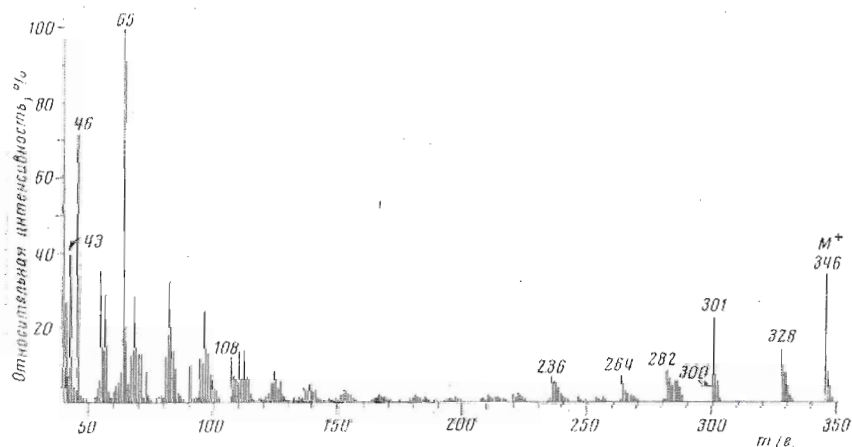


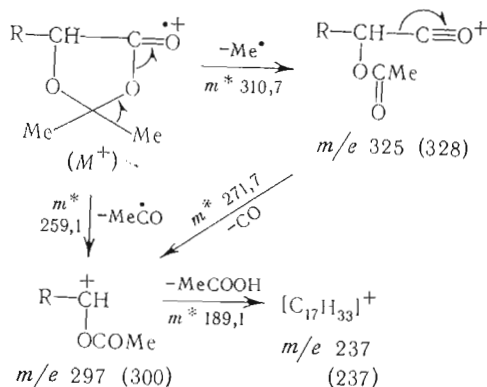
Рис. 3. Масс-спектр гексадейтероацетонида 2-октоадекановой кислоты (2,2-ди(тридейтерометил)-4-гексадецил-5-кетодиоксалана-1,3)

удобными производными для газохроматографического и хромато-масс-спектрометрического анализа. На хроматограммах, полученных при ГЖХ ацетонидов на колонках с полиэфирной (полиэтиленгликольсукцинат — ПЭГС) и полисилоксановой (SE-30) стационарными фазами, этим соединениям отвечают четкие симметричные пики. График зависимости между логарифмами удерживаемых объемов для ацетонидов жирных 2-оксикислот на полярной (SE-30) и неполярной (ПЭГС) фазах приведен на рис. 4.

Масс-спектры изопропилиденных производных 2-оксикислот дают полное представление об их структуре, а следовательно, и о структуре соответствующих оксикислот. Основные направления фрагментации под электронным ударом молекулярных ионов соединений этого класса рассмотрены ниже на примере 2,2-диметил-4-гексадецил-5-кетодиоксалана-1,3 (Ia) — изопропилиденного производного 2-октоадекановой кислоты. Для выяснения некоторых особенностей фрагментации был изучен масс-спектр гексадейтероаналога (II) ацетонида (Ia) (рис. 3), который получали конденсацией той же оксикислоты и гексадейтероацетона. В спектре изопропилиденного производного (Ia) (рис. 2) присутствует довольно

интенсивный пик молекулярного иона с m/e 340* (346; здесь и далее в скобках указывается значение m/e соответствующего иона в масс-спектре гексадейтероацетонида (II)), который дает представление о размере углеводородной цепи исходной оксикислоты. Обычно в масс-спектрах изопропилиденовых производных диолов пик молекулярного иона либо отсутствует, либо имеет незначительную интенсивность (см., например, [18, 19]). Сравнительно высокая интенсивность этого пика в спектрах ацетонидов 2-оксикислот, по-видимому, связана с увеличением стабильности соответствующего иона, что может быть обусловлено наличием карбонильной группы. Отщепление молекулярным ионом метильного заместителя диоксаланового цикла приводит к образованию иона с m/e 325 (328).

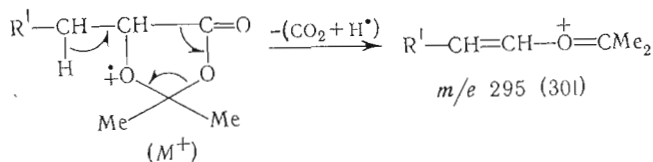
Иону с m/e 297, $[M - 43]^+$, в масс-спектре дейтероацетонида (II) отвечает фрагмент с m/e 300, $[M - 46]^+$, откуда следует, что при образовании этих ионов теряется одна из метильных групп, связанных с диоксалановым циклом. Пик метастабильного иона с m/e 271,7 (274,4) указывает на то, что одним из предшественников фрагмента с m/e 297 (300) является ион $[M - Me]^+$ с m/e 325 (328), из которого первый возникает в результате элиминирования молекулы CO. С другой стороны наличие в масс-спектре пика метастабильного иона с m/e 259,1 (260,1) говорит об образовании фрагмента с m/e 297 (300) также и непосредственно из молекулярного иона. На основании приведенных данных процесс возникновения иона с m/e 297 (300) может быть представлен следующим образом:



Здесь и далее $R = C_{16}H_{33}$.

Отщепляя молекулу уксусной кислоты, ион с m/e 297 дает фрагмент с m/e 237.

Как показывает масс-спектрометрия высокого разрешения, возникновение иона с m/e 295 (301) (измерено: m/e 295,2994; $C_{20}H_{39}O$; вычислено: m/e 295,2999) происходит в результате элиминирования молекулярным ионом атома водорода и молекулы CO_2 . Эту реакцию можно проиллюстрировать схемой:

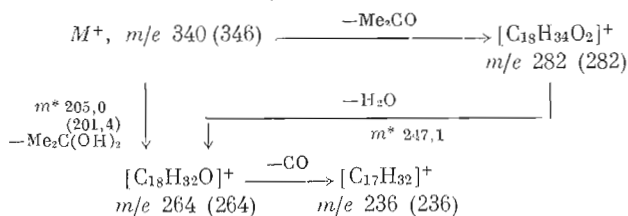


Здесь и далее $R' = C_{15}H_{31}$.

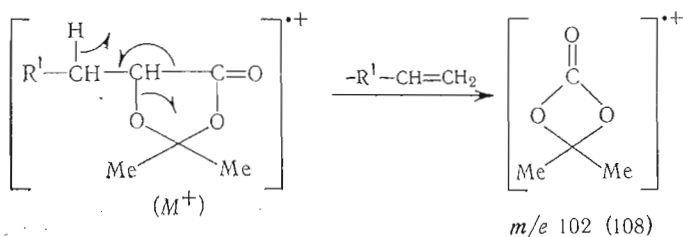
Пик иона с m/e 282 (измерено: m/e 282,2556; $C_{18}H_{34}O_2$; вычислено: m/e 282,2557) сохраняет свое положение в масс-спектре дейтероацетонида

* Измерено: m/e 340,2950; $C_{21}H_{40}O_3$; вычислено: m/e 340,2975.

(II); следовательно, этот ион не содержит метильных групп ацетонидной группировки. Кроме того, измерение точного значения m/e данного иона показывает, что он образуется путем отщепления от молекулярного иона фрагмента с брутто-формулой C_3H_6O . Таким образом, процесс образования иона с m/e 282 скорее всего состоит в элиминировании молекулярным ионом молекулы ацетона. Фрагмент с m/e 264 (измерено: m/e 264,2443; $C_{18}H_{32}O$; вычислено: m/e 264,2452) также не содержит метильных групп диоксаланового цикла, поскольку его пик также сохраняет свое положение в масс-спектре дейтеропродукта (II). В отличие от рассмотренного выше иона с m/e 282 этот ион имеет на 18 массовых единиц меньше, поэтому можно предположить, что он образуется из фрагмента с m/e 282 путем элиминирования молекулы воды. Это предположение подтверждается присутствием в масс-спектре пика метастабильного иона с m/e 247,1. Однако пик метастабильного иона с m/e 205,0, также присутствующий в спектре, указывает и на другой путь образования фрагмента с m/e 264 — отщепление молекулярным ионом гидратированной молекулы ацетона (в масс-спектре дейтеропродукта (II) переходу m/e 346 \rightarrow m/e 264 отвечает пик метастабильного иона с m/e 201,4). Последующая потеря молекулы CO фрагментом с m/e 264 приводит к образованию углеводородного иона с m/e 236 (измерено: m/e 236,3228; $C_{17}H_{32}$; вычислено: m/e 236,3260):



В области низких массовых чисел в масс-спектрах исследованных ацетонидов (Ia — в) содержатся интенсивные пики с m/e 59 (65) и 43 (43, 46). Первый, наиболее интенсивный в спектрах, вероятно, соответствует протонированной молекуле ацетона ($Me_2C=O^+H$). Второй пик отвечает двум ионам, один из которых сохраняет значение m/e в случае дейтероацетонида (II) и, скорее всего, является углеводородным фрагментом; пик другого, по-видимому представляющего собой ацетил-ион, смещается на 3 массовые единицы в сторону больших масс в спектре производного (II). Наличие интенсивных пиков при m/e 43 и 59 — характерная особенность масс-спектров изопропилиденовых производных 1,2-диолов [18, 19]. Менее интенсивный пик при m/e 102 (108), который также наблюдался в спектрах всех трех ацетонидов оксикислот (Ia — в), вероятно, следует считать специфичным для подобных соединений. Смещение пика соответствующего иона в масс-спектре дейтеропродукта (II) на 6 массовых единиц указывает на присутствие в нем обеих метильных групп диоксаланового цикла. Ниже приводится предполагаемая схема образования рассматриваемого фрагмента:



Из изложенного можно сделать вывод, что ацетониды жирных 2-оксикислот не только представляют собой удобную форму для отделения последних от оксикислот иного строения, но, будучи весьма специфичными

и легкодоступными производными, вполне могут конкурировать с производными других типов, обычно используемыми при газохроматографическом и масс-спектрометрическом анализе 2-оксикислот, входящих в состав липидов различных типов.

Экспериментальная часть

Для хроматографии на колонках и для ТСХ использовали силикагель марки КСК* (100—150 и 250—300 меш соответственно).

Пластинки для аналитической и препаративной ТСХ размером соответственно 6×9 и 9×12 см с толщиной слоя адсорбента $\sim 0,2$ и $\sim 0,3-0,4$ мм готовили по ранее описанной методике [20]. Подготовка силикагеля для колонок, а также пластинок для препаративного разделения описана в работе [21]. Для обнаружения веществ на хроматограммах применяли 50%-ную H_2SO_4 с последующим нагреванием пластинок при $180-200^\circ$ и 0,3%-ный раствор морина в спирте (пятна и зоны веществ наблюдали в УФ-свете).

ГЖХ ацетонидов 2-оксикислот и метиловых эфиров 3-оксикислот проводили на хроматографе «Руче-Унисам-104» (модель 24), снабженном сдвоенным пламенно-ионизационным детектором и колонками (1500×4 мм) с 10% ПЭГС и с 3% SE-30 на хромосорбе W (80—100 меш); температура колонок 180° , газ-носитель — аргон (45 мл/мин). Масс-спектры получали на приборе ЛКВ-9000 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ; исследуемые образцы вводили непосредственно в ионный источник. Масс-спектры высокого разрешения измеряли на приборе MS-902. ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 («Zeiss», ГДР), спектры ПМР — на приборе XL-100 («Varian», США) при рабочей частоте 100 МГц с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта.

Ацетонид 2-оксооктадекановой кислоты (2,2-диметил-4-гексадецил-5-кетодидекалан-1,3) (Ia). К смеси 0,64 г (2,2 ммоль) 2-оксооктадекановой кислоты, 1,2 г молекулярных сит 4 А, предварительно активированных при 320° в течение 4 ч, и 20 мл сухого ацетона добавляли 0,2 мл насыщенного при 0° раствора HCl в эфире. Смесь оставляли плотно закрытой на 1,5 ч при $20-22^\circ$ при периодическом встряхивании, после чего фильтровали и фильтрат выливали в охлажденный до $2-5^\circ$ насыщенный раствор $NaHCO_3$ (80—100 мл). Продукт реакции экстрагировали гексаном (3×50 мл), объединенный экстракт промывали 50 мл воды и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл MeOH, раствор оставляли для кристаллизации на 3—4 ч при $0-5^\circ$, после чего отфильтровывали 653 мг (87%) ацетонида (Ia), т. пл. $47-48^\circ$.

ИК-спектр (в KBr; ν_{\max} , cm^{-1}): 1802 ($\nu_{C=O}$), 1238 и 1133 (ν_{C-O}).

Спектр ПМР (в CCl_4 ; δ , м. д.): 0,82, триплет (3H, CH_3CH_2-) J 6 Гц; 1,22, синглет (CH_2 алифатической цепи); 1,46 и 1,52, синглеты (по 3H, $(CH_3)_2C$); 1,65, квадруплет (2H, $C_{(3)}H_2$), J 4 и 6 Гц; 4,18, триплет (1H, $C_{(2)}H$), J 6 Гц.

По аналогичной методике получали: ацетонид 2-оксигексадекановой кислоты (Iб), выход 86%, т. пл. $38,5-39,5^\circ$ (MeOH); ацетонид 2-оксидодекановой кислоты (Iв), выход 88%, т. пл. $36-37^\circ$ (MeOH); гексадейтероацетонид 2-оксооктадекановой кислоты (II), выход 82%, т. пл. $47-48^\circ$ (MeOH). ИК- и ПМР-спектры ацетонидов (Iб) и (Iв) были сходны с соответствующими спектрами ацетонида (Ia).

Катализация и разделение смеси 2- и 3-оксикислот. К смеси, содержащей по 2—3 мг 2-оксидодекановой, 2-оксигексадекановой и 2-оксооктадекановой кислот и ~ 6 мг 3-оксооктадекановой кислоты, добавляли

* Для той же цели можно использовать силикагели других марок, а также нейтральную окись алюминия.

1 мл сухого ацетона, несколько крупинок молекулярных сит 4 А, активированных вышеописанным способом, и 3—5 капель насыщенного при 0° раствора HCl в эфире. Смесь выдерживали плотно закрытой 1 ч при 20—22° при периодическом встряхивании, после чего обрабатывали избытком раствора диазометана в эфире. Раствор декантировали, молекулярные сита промывали декантацией ацетоном (2 × 2 мл). Объединенные ацетоновые растворы упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл смеси гексан — эфир (9 : 1) и раствор наносили на колонку с 1,5—2 г силикагеля, 8—10 мл той же смеси растворителей вымывали ацетониды 2-оксикислот, затем 10 мл системы гексан — эфир (3 : 1) элюировали метиловый эфир 3-оксиоктадекановой кислоты. Количества полученных ацетонидов и оксиэфира определяли при помощи ГЖХ в вышеописанных условиях, в качестве внутреннего стандарта использовали этилстеарат. Выход ацетонидов и оксиэфиров не ниже 97% (по результатам 5 опытов).

В других опытах остаток после упаривания объединенных ацетоновых растворов наносили в 0,1 мл CHCl₃ на пластинку для препаративной ТСХ. Хроматограмму проявляли в CH₂Cl₂ или смеси гексан — эфир (4 : 1) и после высушивания на воздухе (20 мин) опрыскивали раствором морина. Зоны с R_f 0,15—0,20 и 0,75—0,80, флуоресцирующие в УФ-свете, разделяли. С адсорбента из нижней зоны системой CHCl₃ — MeOH (9 : 1) элюировали метиловый эфир 3-оксикислоты, из верхней зоны хлороформом вымывали ацетониды 2-оксикислот. Выход производных не ниже 95% (по результатам трех опытов).

Метаноллиз ацетонидов 2-оксикислот (Ia—e). К смеси, содержащей по 5—6 мг ацетонидов (Ia—v), добавляли 1 мл 3%-ного раствора HCl в MeOH. Смесь нагревали 15 мин при 40°, затем охлаждали до 20—25°, разбавляли 1 мл воды и экстрагировали гексаном (4 × 2 мл). Объединенный экстракт промывали 2 мл воды, упаривали, остаток анализировали методом ГЖХ в вышеописанных условиях. Выход метиловых эфиров жирных 2-оксикислот не ниже 98%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park C. E., Berger L. R. (1967) J. Bacteriol., 93, 230—237.
2. Kaneshira T., Marr A. G. (1963) Biochim. et biophys. acta, 70, 271—277.
3. Roberts N. A., Gray G. W., Wilkinson S. G. (1967) Biochim. et biophys. acta, 135, 1068—1701.
4. Fensom A. H., Gray G. W. (1969) Biochem. J., 114, 185—196.
5. Moss C. W., Samuels S. B., Liddle J., McKinney R. M. (1973) J. Bacteriol., 114, 1018—1024.
6. Wilkinson S. G., Galbraith L. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 331—343.
7. Hancock I. C., Humphreys G. O., Meadow P. M. (1970) Biochim. et biophys. acta, 202, 389—391.
8. Батраков С. Г., Пилипенко Т. В., Бергельсон Л. Д. (1971) Докл. АН СССР, 200, 226—229.
9. Kawanami J. (1971) Chem. and Phys. Lipids, 7, 159—172.
10. Knoche H. W., Shively J. M. (1972) J. Biol. Chem., 247, 170—178.
11. Ayräs P., Pihlaja K. (1970) Tetrahedron Lett., 4095—4096.
12. Mårtensson E. (1966) Biochim. et biophys. acta, 116, 296—308.
13. O'Brien J. S., Rouser G. (1964) Anal. Biochem., 7, 288—296.
14. Kishimoto Y., Radin N. S. (1963) J. Lipid Res., 4, 130—138.
15. Ryhage R., Stenhagen E. (1960) Arkiv för Kemi, 15, 545—560.
16. Eglinton G., Hunneman D. H., McCormic A. (1968) Org. Mass Spectrom., 1, 593—611.
17. Wood R. D., Raju P. K., Feiser R. (1965) J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 81—84.
18. McCloskey J. A., McClella J. M. J. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 5090—5093.
19. Wolff R. E., Wolff G., McCloskey J. A. (1966) Tetrahedron, 22, 3093—3101.
20. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Воронкова В. В. (1961) Докл. АН СССР, 141, 84—86.
21. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) Biochim. et biophys. acta, 337, 29—40.

Поступила в редакцию
30.I.1976

После переработки
11.III.1976

ISOLATION AND GAS CHROMATOGRAPHIC AND MASS SPECTROMETRIC
ANALYSIS OF 2-HYDROXY FATTY ACIDS AS 1,2-ISOPROPYLIDENE
DERIVATIVES

BATRAKOV S. G., USHAKOV A. N., SADOVSKAYA V. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The procedure for quantitative separation of 2- and 3-hydroxy fatty acids of lipid hydrolysates has been developed. The method is based on capability of 2-hydroxy acids to produce 1,2-O-isopropylidene derivatives on treatment with acetone in the presence of acidic catalysts, 3-hydroxy acids being unaffected under these condition. The GLC and mass spectrometric analysis of 2-hydroxy acid acetonides has been also elaborated.
