



УДК 547.953 : 543.51

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВИДОВ ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ ПО МАСС-СПЕКТРАМ МЕТАСТАБИЛЬНЫХ ИОНОВ

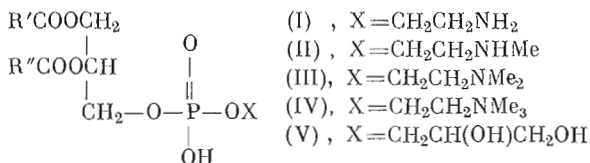
II. ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДЫ

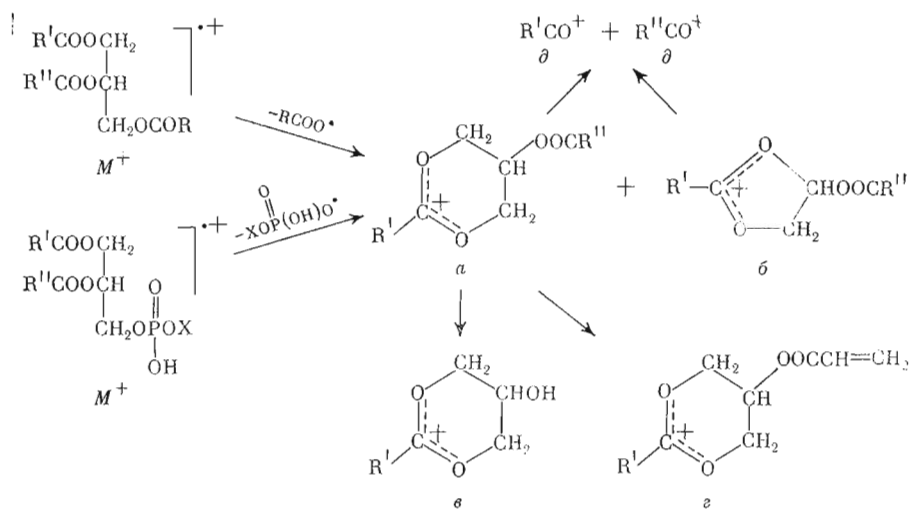
*Батраков С. Г., Садовская В. Л., Галашин В. Н.,
Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д.*

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

Разработан масс-спектрометрический метод определения молекулярно-видового состава природных глицерофосфолипидов, основанный на выявлении индивидуальной последовательности распада каждого имеющегося в масс-спектре липидной фракции диглицеридного фрагмента путем прямого анализа дочерних ионов (DADI). Эффективность предложенного метода демонстрируется на примере фракций фосфатидилглицерина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, а также N-метил- и N,N-диметил-фосфатидилэтаноламинов, выделенных из различных природных источников.

В предыдущем сообщении [1] мы описали масс-спектрометрический метод анализа молекулярно-видового состава природных триглицеридов. Предложенный метод основан на выявлении в масс-спектре липидной фракции индивидуальной последовательности фрагментации молекулярного иона каждого из компонентов этой фракции, что достигалось путем исследования распада метастабильных ионов в первой и второй бесполовых областях двухфокусного масс-спектрометра. Исследование проводили двумя способами: при помощи метастабильной дефокусировки, а также прямого анализа дочерних ионов (DADI). Первым способом изучали начальный этап распада молекулярного иона триглицеридного компонента — элиминирование ацилоксильного радикала, приводящее к диглицеридному фрагменту *a* (схема). В результате идентифицировали один из жирнокислотных остатков этого компонента (RCO). Информацию о природе двух других ацильных остатков (R'CO и R''CO) оказалось возможным получить при анализе дальнейшей фрагментации иона *a*, а также второго диглицеридного иона — *b* — методом DADI, поскольку соответствующие ацил-ионы *d* являются, как было показано, непосредственными продуктами распада названных диглицеридных ионов. В настоящем сообщении описывается применение масс-спектрометрии метастабильных ионов для определения молекулярно-видового состава глицерофосфолипидов (I) — (V).

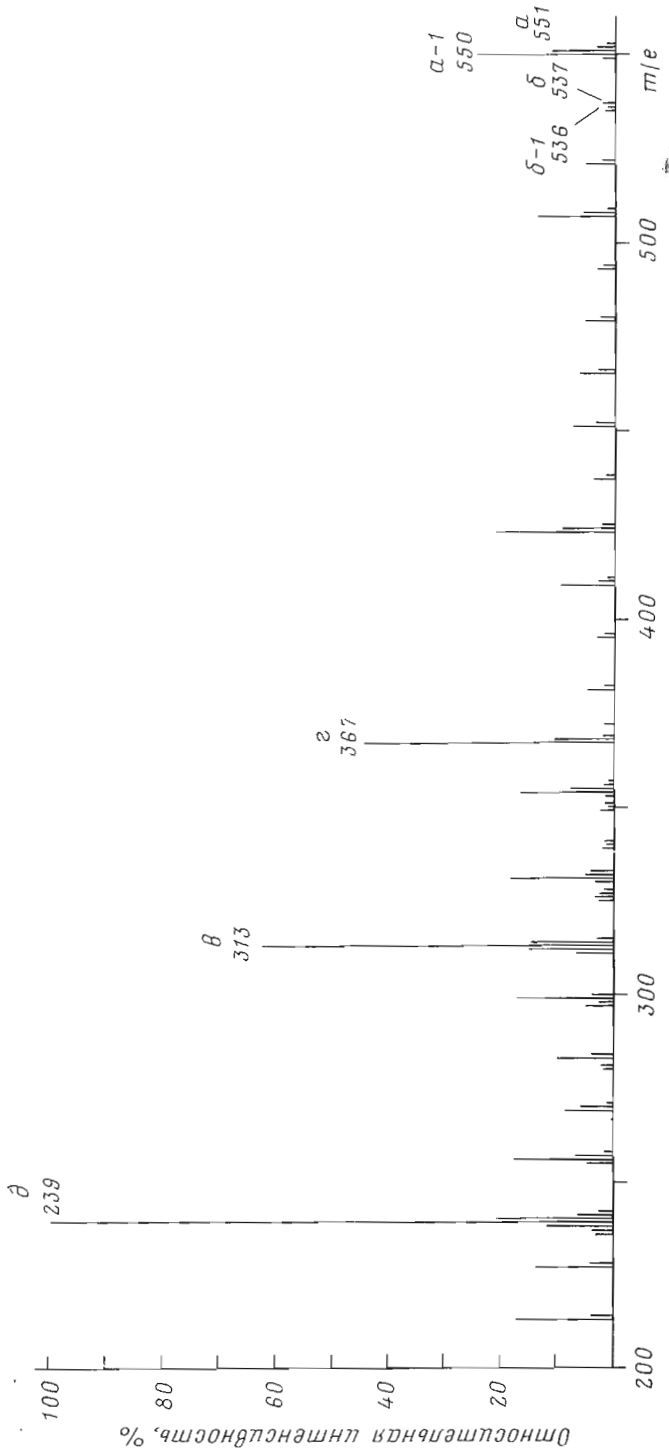




Масс-спектрометрическое поведение некоторых фосфатидиламиноспиртов ранее изучалось [2—4], и было отмечено, что оно во многом аналогично поведению триглицеридов. Одним из первичных продуктов распада молекулярного иона фосфатидилхолина (IV) является фрагмент типа *a*, который образуется в результате отщепления остатка фосфохолина и которому приписана резонансно-стабилизированная циклическая структура. Последующая фрагментация иона *a* протекает одинаково как для глицерофосфолипидов, так и для триглицеридов (см. схему).

Проведенный нами анализ масс-спектра синтетического 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IV, $\text{R}' = \text{R}'' = \text{C}_{15}\text{H}_{31}$) (рисунок) показал, что при диссоциации молекулярного иона этого соединения образуется четыре типа ионов, содержащих оба имеющихся в молекуле жирнокислотных остатка: фрагменты *a* (m/e 551), [*a* — 1] (m/e 550), *b* (m/e 537) и [*b* — 1] (m/e 536); интенсивность двух последних ионов крайне низка, а наибольшую интенсивность имеет ион [*a* — 1]. Методом DADI установлено, что все четыре фрагмента являются непосредственными предшественниками пальмитоил-иона, причем интенсивность пика этого иона в DADI-спектре фрагмента [*b* — 1] более чем в 25 раз превосходит интенсивность пика того же иона в DADI-спектрах фрагментов *a* и [*a* — 1] (см. табл. 1). Поэтому в том случае, когда при масс-спектрометрии смеси гомологичных фосфолипидов возникают ионы [*a* — 1] и [*b* — 1] (а также *a* и *b*) с одинаковыми массовыми числами, вклад первых в образование ацил-ионов типа *d* может не учитываться.

Разнокислотные глицерофосфолипиды в отличие от триглицеридов содержат два ацильных остатка, и оба они входят в состав ионов *a*, [*a* — 1], *b* и [*b* — 1]. Это обстоятельство значительно облегчает определение молекулярно-видового состава природных глицерофосфолипидов: достаточно идентифицировать либо ацил-ионы *d*, либо ионы типа *e*, образующиеся при распаде хотя бы одного из четырех перечисленных диглицеридных фрагментов. Такого рода анализ легко осуществим методом DADI, который и был использован в настоящей работе. В качестве примеров для демонстрации эффективности метода были избраны глицерофосфолипиды различных классов (I) — (V) с различным характером жирнокислотного состава: фосфатидилэтаноламин (I) из *Actinomyces streptomycini* 773 [5], *N*-метил- и *N,N*-диметилфосфатидилэтаноламины (II) и (III) и фосфатидилглицерин (V) метанооксилюющей бактерии *Methylosinus trichosporium* 44 [6], а также фосфатидилхолин (IV) яичного желтка. Жирнокислотный состав исследованных липидов (данные ГЖХ-масс-спектрометрии) приводятся в табл. 2.



Масс-спектр 1,2-дипальмитойл-*sn*-глицерил-3-фосфохолина (IV, R, R' = R'' = *n*-C₁₅H₃₁); 70 эВ

Таблица 1

Данные спектров DADI синтетического 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IV, R=R'=n-C₁₅H₃₁)

Ион-предшественник		Дочерние ионы		
Тип иона	<i>m/e</i>	Тип иона	<i>m/e</i>	Интенсивность относительно иона-предшественника, 10 ⁻³ %
<i>a</i>	551	<i>v</i>	313	7
		<i>z</i>	367	7
		<i>∂</i>	239	4
[<i>a</i> -1]	550	<i>v</i>	313	8
		<i>∂</i>	239	3
<i>б</i>	537	<i>∂</i>	239	13
[<i>б</i> -1]	536	<i>∂</i>	239	83

Таблица 2

Жирнокислотный состав исследованных глицерофосфолипидов: фосфатидилэтаноламина (I) из *Act. streptomycini* 773, N-метил- и N,N-диметилфосфатидилэтаноламинов (II) и (III) и фосфатидилглицерина (V) из *M. trichosporium* 44 и фосфатидилхолина (IV) яичного желтка

Жирные кислоты	Относительное содержание, %				
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
C _{14:0}	7	—	—	—	—
C _{15:0}	41	—	—	—	—
C _{16:0}	36	1,5	1,8	15,3	1,9
C _{16:1}	2	8,8	12,1	15,0	3,6
C _{17:0}	12	—	—	—	—
C _{18:0}	1	—	—	14,8	—
C _{18:1}	1	89,7	86,1	53,0	94,5
C _{18:2}	Следы	—	—	1,9	—

Фосфолипиды из *M. trichosporium* 44 (II), (III), (V) имеют наиболее простой набор жирных кислот, он включает практически лишь две кислоты — C_{16:1} и C_{18:1}. Масс-спектры этих трех липидов в области *m/e* > 200 весьма сходны и содержат только пики ионов, образующихся из диглицеридных остатков молекулярных ионов. Диглицеридным фрагментам типа *a* и [*a* - 1] в масс-спектрах отвечают пики при *m/e* 603, 575 и 602 574 соответственно. Поскольку ацильные остатки липидов различаются на две метиленовые группы, массовые числа фрагментов *a* и *б*, [*a* - 1] и [*б* - 1], возникающих из гомологичных молекулярных ионов, не совпадают. Изучение распада ионов с *m/e* 602 и 603 (см. табл. 3) показало, что этот процесс приводит к иону *v* с *m/e* 339, содержащему остаток кислоты C_{18:1}, и ацил-иону *∂* с *m/e* 265 (264)*, соответствующему той же кислоте. Кроме того, среди продуктов фрагментации указанных диглицеридных ионов *a* и [*a* - 1] идентифицирован ион типа *z* с *m/e* 393, в состав которого также входит остаток кислоты C_{18:1}. Все эти данные говорят о том, что один из компонентов фракции фосфолипидов (II), (III), (V) имеет жирнокислотный состав — C_{18:1}, C_{18:1}.

Диглицеридные ионы *a* и [*a* - 1] с *m/e* 575 и 574 распадаются с образованием двух фрагментов типа *v* с *m/e* 311 и 339, первый из которых со-

* Для глицеролипидов, содержащих остатки ненасыщенных жирных кислот, характерна фрагментация с образованием двух ионов, соответствующих каждому из ненасыщенных жирноацильных остатков, — *∂* и [*∂* - 1] [7, 8].

Данные спектров DADI и жирнокислотный состав компонентов фракции N-метилфосфатидилэтанолamina (II), N,N-диметилфосфатидилэтанолamina (III) и фосфатидилглицерина (V) из *M. trichosporium* 44

Диглицеридный ион-предшественник		Дочерние ионы в спектрах фосфолипидов				Жирнокислотный состав компонента фракции
Тип иона	<i>m/e</i>	Тип иона	(II) <i>m/e</i>	(III) <i>m/e</i>	(V) <i>m/e</i>	
<i>a</i>	603	<i>g</i>	—	393,5	394,3	$C_{18:1}, C_{18:1}$
		<i>e</i>	339,5	339,4	339,4	
		<i>g</i>	265,2	264,2	266,5	
[<i>a</i> -1]	602	<i>g</i>	—	392,9	394,0	$C_{16:1}, C_{18:1}$
		<i>e</i>	338,7	339,0	339,1	
		<i>g</i>	264,3	265,8	264,6	
<i>a</i>	575	<i>e</i>	338,7	339,0	338,9	$C_{16:1}, C_{18:1}$
		<i>g</i>	311,1	311,2	311,8	
		<i>g</i>	—	264,5	—	
[<i>a</i> -1]	574	<i>e</i>	339,1	338,9	339,2	$C_{16:1}, C_{18:1}$
		<i>g</i>	311,0	310,6	310,7	
		<i>g</i>	—	264,1	—	

держит остаток кислоты $C_{16:1}$, а второй — $C_{18:1}$. Среди других осколочных ионов удалось обнаружить только один ацил-ион δ с *m/e* 265 (264) — $C_{17}H_{33}CO^+$; тем не менее приведенные выше массовые числа ионов *e* однозначно доказывают, что в структуру второго компонента фосфолипидных фракций (II), (III), (V) входят жирнокислотные остатки $C_{16:1}$ и $C_{18:1}$.

Яичный фосфатидилхолин (IV) имеет более сложный жирнокислотный состав, в котором доминируют кислоты $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{16:0}$ и $C_{16:1}$. В его масс-спектре присутствуют четыре пика основных диглицеридных ионов [*a* — 1] с *m/e* 604, 602, 576 и 574. Для ацил-ионов δ , образующихся при распаде диглицеридного фрагмента с *m/e* 604 (см. табл. 4), мы получили значение *m/e* 266,3, промежуточное между массовыми числами ацил-ионов $C_{17}H_{35}CO^+$ (*m/e* 267) и $C_{17}H_{33}CO^+$ (*m/e* 265). Можно предположить, что в составе иона [*a* — 1] с *m/e* 604 и соответствующего компонента фосфолипидной фракции находятся ацильные остатки $C_{16:0}$ и $C_{18:1}$. Это предположение полностью подтверждается присутствием в DADI-спектре пика иона типа *e* с *m/e* 341, содержащего остаток кислоты $C_{18:0}$ и, очевидно, возникающего в результате потери ионом [*a* — 1] молекулы жирного кетена $C_{17}H_{32}=C=O$. О трудности идентификации ацил-ионов δ , различающихся на 2 массовые единицы, говорилось в предыдущем сообщении [1]. Там же отмечалось, что для определения жирнокислотного состава компонента в этом случае целесообразно использовать другие ионы (например, типа *e*, как описано выше).

Второй диглицеридный фрагмент [*a* — 1] с *m/e* 602 в масс-спектре фосфатидилхолиновой фракции (IV) дает при распаде единственный ион *e* (*m/e* 339) с остатком кислоты $C_{18:1}$ и единственный ацил-ион δ (*m/e* 264), отвечающий той же кислоте. Таким образом, этот компонент фракции содержит два ацильных остатка $C_{18:1}$. В структуру третьего компонента, которому в масс-спектре соответствует диглицеридный фрагмент [*a* — 1] с *m/e* 576, очевидно, входят жирнокислотные остатки $C_{16:0}$ и $C_{18:1}$, так как распад указанного диглицеридного фрагмента приводит к образованию двух ионов типа *e* с *m/e* 313 и 339, содержащих остатки кислот $C_{16:0}$ и $C_{18:1}$, и двух ацил-ионов δ с *m/e* 239, $C_{15}H_{31}CO^+$, и 265, $C_{17}H_{33}CO^+$. Наконец, четвертый компонент фракции должен иметь жирнокислотный состав — $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, так как продуктами распада соответствующего диглицеридного фрагмента [*a* — 1] с *m/e* 574 являются ионы типа *e* с *m/e* 311 и 339, в составе которых находятся ацильные остатки $C_{16:1}$ и $C_{18:1}$, и ацил-ион δ с *m/e* 264, отвечающий кислоте $C_{18:1}$.

Таблица 4

Данные спектров DADI и жирнокислотный состав компонентов
фракции фосфатидилхолина (IV) яичного желтка

Ион-предшественник [a-1], m/e	Дочерние ионы		Жирнокислотный состав компонентов фракции
	Тип иона	m/e (измерено)	
604	<i>в</i>	341,2	C _{18:0} , C _{18:1}
	<i>д</i>	266,3	
602	<i>в</i>	339,7	C _{18:1} , C _{18:1}
	<i>д</i>	264,0	
576	<i>в</i>	338,6	C _{16:0} , C _{18:1}
	<i>в</i>	313,3	
	<i>д</i>	264,9	
	<i>д</i>	238,4	
574	<i>в</i>	337,7	C _{16:1} , C _{18:1}
	<i>в</i>	311,9	
	<i>д</i>	263,8	

Таблица 5

Данные DADI-спектров и жирнокислотный состав компонентов
фракции фосфатидилэтаноламина (I) из *Act. streptomycini* 773

Ион-предшественник		Найденные m/e дочерних ионов <i>д</i>	Структура ацил-иона <i>д</i>	Жирнокислотный состав компонента фракции
Тип иона	m/e			
<i>б</i>	537	253,7	C ₁₆ H ₃₃ CO+	C _{15:0} , C _{17:0} и C _{16:0} , C _{16:0}
		224,8		
[<i>б</i> -1]	536	252,4	C ₁₆ H ₃₃ CO+	
		238,4	C ₁₅ H ₃₁ CO+	
		224,0	C ₁₄ H ₂₉ CO+	
<i>б</i>	523	240,2	C ₁₅ H ₃₁ CO+	C _{15:0} , C _{16:0}
		225,3		
[<i>б</i> -1]	522	238,2	C ₁₄ H ₂₉ CO+	
		224,4	C ₁₃ H ₂₇ CO+	
<i>б</i>	509	239,3	C ₁₅ H ₃₁ CO+	C _{15:0} , C _{15:0} и C _{14:0} , C _{16:0}
		225,6		
[<i>б</i> -1]	508	210,6	C ₁₄ H ₂₉ CO+	
		238,2	C ₁₃ H ₂₇ CO+	
		224,4	C ₁₅ H ₃₁ CO+	
		210,2	C ₁₄ H ₂₉ CO+	
[<i>б</i> -1]	494	223,9	C ₁₄ H ₂₉ CO+	C _{14:0} , C _{15:0}
		210,5	C ₁₃ H ₂₇ CO+	

Еще более сложный набор жирных кислот имеет фракция фосфатидилэтаноламина (I) (см. табл. 2). Отличие фосфолипида (I) от рассмотренных выше соединений (II) — (V) состоит также в том, что входящие в его состав гомологичные жирные кислоты различаются на одну метиленовую группу. Вследствие этого в масс-спектре фракции имеет место совпадение массовых чисел ионов *а* и *б*, [*а* - 1] и [*б* - 1], относящихся к ближайшим гомологам. Как уже говорилось, в таких случаях достоверные сведения о жирнокислотном составе компонентов фракции дает анализ продуктов фрагментации ионов *б* и [*б* - 1]. В масс-спектре исследованного нами фосфатидилэтаноламина (I) присутствуют четыре пары пиков диглицеридных фрагментов [*а* - 1] и *а* с m/e 550 и 551, 536 и 537, 522 и 523, 508 и 509. Отвечающие им ионы [*б* - 1] и *б* имеют m/e 536 и 537, 522 и 523, 508 и 509, 494 и 495. Идентификация методом DADI ацил-ионов *д*, образующихся при распаде ионов *б* и [*б* - 1], дала возможность однозначно уста-

новить жирнокислотный состав компонентов фракции. Результаты анализа сведены в табл. 5.

Выше мы описали примеры качественного анализа основных компонентов природных глицерофосфолипидных фракций. Вывод о количественном соотношении компонентов может быть сделан на основании соотношения интенсивности пиков диглицеридных ионов a и $[a - 1]$ в масс-спектре, как это предложено Клейном [4]*. Им также указано на необходимость принимать во внимание при таком подходе зависимость интенсивности пиков диглицеридных ионов от их жирнокислотного состава. Для учета этой зависимости определены соответствующие поправочные коэффициенты («факторы молекулярной коррекции») для некоторых молекулярных видов глицерофосфолипидов — насыщенных, моноеновых и диеновых [4] (ср. [9]). С учетом поправочных коэффициентов соотношение идентифицированных нами основных компонентов в фосфолипидных фракциях (II), (III) и (V) из *M. trichosporium* 44 ($C_{18:1}$, $C_{13:1}/C_{16:1}$, $C_{13:1}$) определено как 78/15, 70/20 и 90/6 соответственно, что хорошо согласуется с данными о жирнокислотном составе этих липидов (табл. 2).

Рассмотренные примеры применения масс-спектрометрии метастабильных ионов для определения молекулярных видов природных глицерофосфолипидов приводят к следующим выводам относительно преимуществ и ограничений предлагаемого метода (ср. [1]). Основное преимущество предложенного способа по сравнению с применяемым в настоящее время методами определения молекулярных видов фосфолипидов, включающими хроматографическое разделение фракций, деградацию компонентов и анализ жирных кислот в продуктах деградации, состоит в быстроте и простоте операций. Количество образца, требуемое для анализа, не превышает 100 мкг. Существенно также, что при этом анализу глицерофосфолипидов не мешают примеси других веществ, молекулы которых не содержат диглицеридных группировок (сфинголипиды, лизолипиды и т. п.). Главные ограничения метода — трудность анализа минорных компонентов и неудовлетворительное разрешение пиков дочерних ионов, различающихся на 2 массовые единицы. Оба недостатка связаны с пределами чувствительности и разрешающей способности современных масс-спектрометров и поэтому, очевидно, носят временный характер.

Пока данные масс-спектрометрического анализа не позволяют различать позиционные изомеры — для этого необходимо проведение детального масс-спектрометрического исследования серии стандартных разнокислотных фосфолипидов с известным расположением ацильных остатков. Однако приблизительная оценка позиционного распределения жирных кислот в компонентах фракции возможна на основании результатов ферментативного гидролиза фосфолипида фосфолипазой A_2 и последующего анализа отщепившихся жирных кислот методом ГЖХ или ГЖХ-масс-спектрометрии. Эта дополнительная операция увеличила бы размер пробы не более чем в 2 раза.

Применявшиеся в настоящей работе приборы и методы описаны в предыдущем сообщении [1]; испарение образцов фосфолипидов осуществляли при 200—220°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батраков С. Г., Садовская В. Л., Галяшин В. Н., Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д. (1978) Биоорг. химия, 4, 1220—1231.
2. Klein R. A. (1971) J. Lipid Res., 12, 123—131.
3. Klein R. A. (1971) J. Lipid Res., 12, 628—634.
4. Klein R. A. (1972) J. Lipid Res., 13, 672—679.
5. Батраков С. Г., Корницкая Е. Я., Саркисян Ш. Т., Бергельсон Л. Д. (1977) Изв. АН СССР. Сер. биол., 226—234.

* Аналогичный подход к количественному анализу компонентов триглицеридных фракций предложен в работе [9].

6. Батраков С. Г., Быстрова М. Г., Нестеров А. И., Садовская В. Л. (1977) Био-
органик. химия, 3, 1647—1655.
7. Lauer W. M., Aasen A. J., Graff G., Holwan R. T. (1970) Lipids, 5, 861—868.
8. Aasen A. J., Lauer W. M., Holman R. T. (1970) Lipids, 5, 869—877.
9. Hites R. A. (1970) Anal. Chem., 42, 1736—1740.

Поступила в редакцию
27.III.1978

MOLECULAR SPECIES CHARACTERIZATION OF NATURAL LIPIDS BY METASTABLE ION MASS SPECTRA. II. GLYCEROPHOSPHOLIPIDS

BATRAKOV S. G., SADOVSKAYA V. L., GALYASHIN V. N.,
ROSYNOV B. V., BERGELSON L. D.

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

A mass spectrometric method for characterization of the molecular species composition of natural glycerophospholipids has been elaborated. The method involves no separation or degradation stage and is based on determination of the individual fragmentation pattern for each diglyceride ion present in the mass spectrum of the lipid fraction under examination. This is realized by virtue of direct analysis of daughter ions (DADI). As examples of efficacy of the developed analytical approach, the molecular species determination is described for phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, as well as for N-methyl and N,N-dimethyl phosphatidylethanolamine fractions from different natural sources.
