

УДК 547.918:547.587.11:543.42

ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-ИОНИЗАЦИОННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ СМЕСЕЙ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ (АСПИРИНОМ)

*Лекарь А.В.¹, Яковишин Л.А.², Борисенко С.Н.¹, Ветрова Е.В.¹, Борисенко
Н.И.³, Гришковец В.И.⁴*

¹*НИИ физической и органической химии Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, Россия*

²*Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина*

³*Эколого-аналитический центр Южного федерального университета, Ростов-на-Дону,
Россия*

⁴*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь,
Украина*

E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением впервые исследовано комплексообразование ацетилсалициловой кислоты (аспирина) с тритерпеновыми гликозидами α -хедерином (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозидом хедерагенина) и хедерасапонином С (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозидом хедерагенина), выделенными из плюща. Гликозиды образуют с ацетилсалициловой кислотой молекулярные комплексы состава 1:1. Комплекс ацетилсалициловой кислоты с α -хедерином более устойчив.

Ключевые слова: масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, тритерпеновые гликозиды, α -хедерин, хедерасапонин С, ацетилсалициловая кислота (аспирин), молекулярный комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

Ацетилсалициловая кислота (аспирин, AcSal, рис. 1) является ненаркотическим анальгетиком-антипиретиком и нестероидным противовоспалительным средством. Из-за обладания противовоспалительной, жаропонижающей и обезболивающей активностью ее часто назначают при лихорадках, головной боли, невралгиях и ревматизме. AcSal проявляет антиагрегационное действие, поэтому находит применение при нарушениях мозгового кровообращения и для профилактики тромбозов. Однако AcSal может вызвать аллергические реакции, поражение слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, желудочные кровотечения и нарушение эмбрионального развития [1].

Известно, что побочные эффекты и терапевтические дозы лекарственных веществ можно существенно снижать за счет молекулярного комплексообразования со стероидными и тритерпеновыми сапонинами [2]. Комплексы гликозидов с различными биологически активными веществами обычно получают путем

инкубирования смесей их водных растворов или растворов с добавкой спирта или ацетона с последующим упариванием [3–7]. Образующиеся комплексы анализируют различными спектральными методами. В частности, для исследования молекулярных комплексов стероидных гликозидов с аминокислотами [4, 8–11], нуклеозидами и аденозин-5'-монофосфатом [10–12] использовали метод масс-спектрометрии.

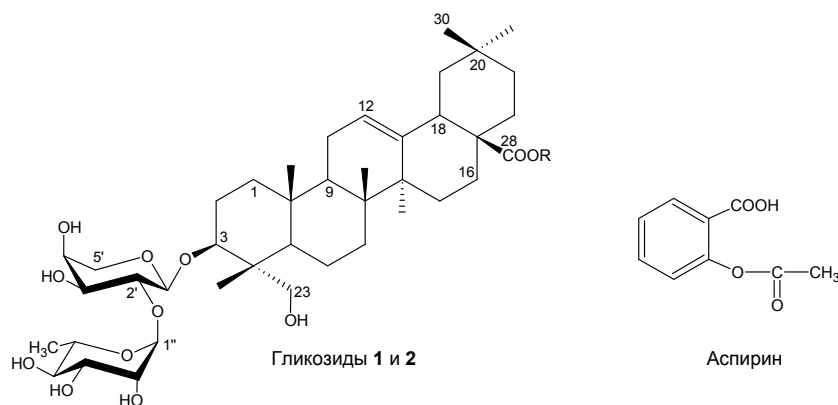


Рис. 1. Строение аспирина и тритерпеновых гликозидов **1** (R=H) и **2** (R= $\leftarrow\beta\text{Glc}_p\text{-(6}\leftarrow\text{1)-}\beta\text{Glc}_p\text{-(4}\leftarrow\text{1)-}\alpha\text{Rha}_p$).

С целью снижения побочных эффектов AcSal были получены в водно-спиртовой среде ее комплексы с глицирризиновой кислотой, являющейся главным тритерпеновым сапонином различных видов солодки *Glycyrrhiza* L. [3, 13, 14]. Комплексы оказались менее токсичными и язвочерогенными, а также обладали большей широтой противовоспалительного действия по сравнению с индивидуальной AcSal [3, 5, 14, 15]. Комплексообразование было подтверждено ИК-спектроскопически [3].

Начато систематическое исследование комплексообразования α -хедерина (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозида хедерагенина, гликозид **1**, рис. 1) и хедерасапонины С (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозида хедерагенина, гликозид **2**, рис. 1) [16]. Гликозиды **1** и **2** являются одними из самых распространенных тритерпеновых гликозидов растений семейства аралиевых (*Araliaceae* Juss.). Они входят в состав препаратов для лечения кашля, содержащих экстракт листьев плюща обыкновенного *Hedera helix* L. [17].

Недавно были получены молекулярные комплексы гликозидов **1** и **2** с AcSal. Комплексообразование между ними рассмотрено методом ИК-спектроскопии [18]. При этом состав комплексов не был установлен. Комплексы гликозидов **1** и **2** с AcSal, полученные в тех же самых условиях, ранее методом масс-спектрометрии не изучались. Настоящая статья посвящена использованию масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для изучения процессов комплексообразования тритерпеновых гликозидов **1** и **2** с AcSal.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тритерпеновые гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей крымского *Hedera taurica* Carr. и канарского *Hedera canariensis* Willd. (Araliaceae Juss.). Методики выделения и установления строения приведены в работах [19, 20].

Комплекс **1** получали путем смешивания растворов, содержащих по 1 ммоль гликозида и 1 ммоль AcSal, а гликозида **2** – в молярном соотношении 1:2 соответственно (растворитель – смесь 70%-ного водного раствора C₂H₅OH и CHCl₃ в соотношении 3:1 по объему). Полученную смесь выдерживали при 40 °С в течение 1.5 ч при постоянном перемешивании. Органические растворители отгоняли в вакууме.

Измерения проведены на масс-спектрометре «Bruker Daltonics micrOTOF-Q» с ионизацией электрораспылением. Использовали программное обеспечение micrOTOFcontrol™2.2. Калибровка масс-спектрометра выполнена с использованием калибровочного раствора для электрораспыления (Electrospray Calibrant Solution) фирмы Fluka. Детектирование отрицательных и положительных ионов выполнено в интервале m/z от 50 до 3000. Согласно характеристикам прибора точность измерений на micrOTOF-Q II достигает выше 1–2 ppm, точность определения масс 2 мДа. Напряжение на капилляре распылителя ± 4200 В, параметры газа-осушителя (азот квалификации “осч”, 5 л/мин, 200 °С) оптимизированы для детектирования пиков ионов ассоциатов. Для прямого ввода использованы растворы веществ в ацетонитриле (фирма Merck, квалификация HPLC/MS) в концентрации до 0.2 мг/мл (10^{-7} – 10^{-6} М). Соотношения m/z и относительные интенсивности пиков ионов ($I_{\text{отн}}$, %) приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В масс-спектре AcSal в режиме положительных ионов зафиксированы пики катионизированных молекул, содержащие Na⁺ и K⁺ (табл. 1). При этом основным является пик иона [M^{AcSal}+Na]⁺ с m/z 203.2, а интенсивности пиков ионов [M^{AcSal}+Na]⁺ и [M^{AcSal}+K]⁺ отличаются в 30 раз. Кроме того, в режиме отрицательных ионов AcSal ионизируется с образованием депротонированной формы моноаниона [M^{AcSal}-H]⁻ с m/z 179.0. Особенности масс-спектров с ионизацией электрораспылением индивидуальных гликозидов **1** и **2** были рассмотрены ранее [21].

В масс-спектре положительных ионов, полученном для смеси AcSal с гликозидом **1**, регистрируются пики ионов компонентов смеси, содержащие катионы Na⁺ и K⁺ (табл. 1). Среди них наиболее интенсивным является пик иона [M^{AcSal}+Na]⁺. Кроме того, обнаружен малоинтенсивный пик [M¹+M^{AcSal}+Na]⁺ с m/z 954.0, соответствующий образованию комплекса состава 1:1. В режиме отрицательных ионов также зафиксирован пик иона комплекса [M¹+M^{AcSal}-H]⁻ с m/z 929.7 (рис. 2), имеющего аналогичное молярное соотношение гликозида **1** и AcSal.

В масс-спектре смеси AcSal с гликозидом **2** в режиме положительных ионов регистрируются сигналы монокатионов AcSal с Na⁺ и K⁺, а для гликозида зафиксированы пики только его моно- и дикатионов с Na⁺. Как и в случае AcSal и

гликозида **1**, в ее смеси с гликозидом **2** преобладает пик иона $[M^{AcSal}+Na]^+$. В режиме регистрации положительных ионов не найдены пики, относящиеся к комплексам AcSal и гликозида **2**. Однако, в масс-спектре отрицательных ионов регистрируется пик иона комплекса $[M^2+M^{AcSal}-H]^-$ (m/z 1399.7), отвечающий составу комплекса 1:1 (рис. 3). Интенсивность пика иона $[M^2+M^{AcSal}-H]^-$ в 2.5 раза меньше интенсивности пика иона $[M^1+M^{AcSal}-H]^-$.

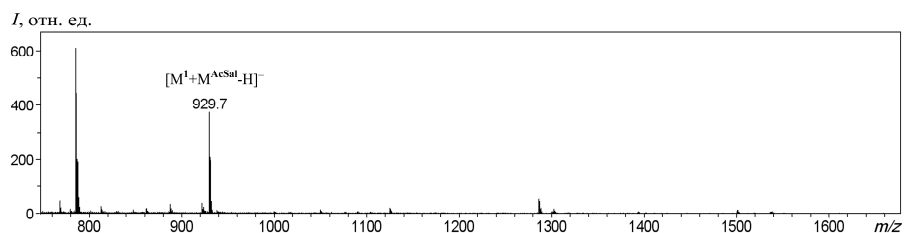


Рис. 2. Масс-спектр отрицательных ионов смеси гликозида **1** с AcSal.

Таблица 1

Масс-спектры смесей AcSal с гликозидами 1 и 2		
Ион	Соотношение m/z	$I_{отн}, \%$
<i>AcSal</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.0	23.37
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	3.34
<i>Смесь AcSal и гликозида 1</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.1	45
$[4M^1-2H]^{2-}$	1500.2	0.02
$[M^1+M^{AcSal}-H]^-$	929.7	1.05
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	1.71
$[M^1+Na]^+$	773.9	0.75
$[M^1+K]^+$	789.8	0.07
$[M^1+M^{AcSal}+Na]^+$	954.0	0.01
<i>Смесь AcSal и гликозида 2</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.1	100
$[M^2+M^{AcSal}-H]^-$	1399.7	0.42
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	1.67
$[M^2+2Na]^{2+}$	633.1	0.36
$[M^2+Na]^+$	1244.2	0.88

Гликозид **1** образует с AcSal более устойчивый комплекс, что, возможно, связано с наличием свободной (негликозилированной) карбоксильной группы в агликонной части его молекулы, тогда как у гликозида **2** карбоксильная группа участвует в образовании ацилгликозидной связи с трисахаридным фрагментом. В молекуле AcSal имеется карбоксильная группа, которая может участвовать в

образовании водородной связи с карбоксильной или гидроксильными группами гликозида **1**. Взаимодействие AcSal с гликозидом **2** может происходить за счет формирования водородной связи между ее карбоксильной группой и гидроксильными группами моносахаридных остатков гликозида. Ранее было показано, что комплексообразование AcSal с глицирризиновой кислотой также сопровождается образованием межмолекулярных водородных связей [3].

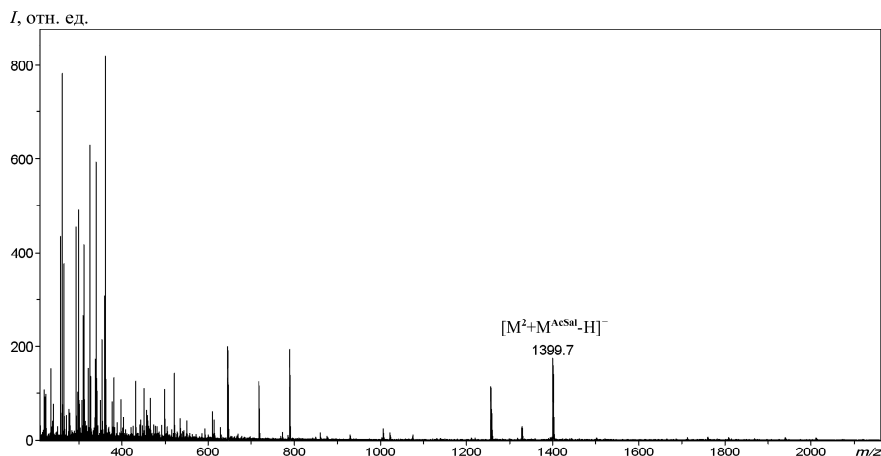


Рис. 3. Масс-спектр отрицательных ионов смеси гликозида **2** с AcSal.

В смесях AcSal с гликозидами **1** и **2** найдены только молекулярные комплексы состава 1:1. Аналогичная закономерность была ранее установлена масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением для комплексов этих гликозидов с парацетамолом [22] и левомецетином [16]. Как и AcSal, их молекулы содержат одно дизамещенное бензольное кольцо. Кроме того, в молекулах AcSal и парацетамола имеется ацетильный остаток. Между данными гликозидами и биологически активными молекулами мы также отмечаем образование комплексов более разнообразного состава. Это было зафиксировано для пуриновых оснований нуклеиновых кислот [23], стрептоцида и ароматических аминокислот [16]. Однако во всех случаях комплексы состава 1:1 преобладали.

ВЫВОДЫ

1. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением впервые использована для изучения молекулярного комплексообразования AcSal с тритерпеновыми гликозидами. Показано, что гликозиды **1** и **2** образуют с AcSal комплексы состава 1:1, ионы которых регистрируются в масс-спектрах.
2. Формирование комплексов с AcSal эквимолекулярного состава подтверждает общую тенденцию, характерную для комплексов данных гликозидов и ряда биологически активных веществ ароматической природы.

3. Комплекс AcSal с монодесмозидным гликозидом **1** оказался более устойчивым, что можно объяснить наличием в его молекуле свободной карбоксильной группы, способной к образованию водородных связей.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 11-03-12141-офи-м-2011, президента РФ МК-4425.2011 и гранта Минобрнауки РФ ДПННТ №: 3.5193.2011.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – [13-е изд.]. – Харьков: Торсинг, 1997. – Т. 1. – 1997. – 560 с.
2. Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 10. – С. 867–874.
3. Комплексы β-глицирризиновой кислоты с нестероидными противовоспалительными средствами как новые транспортные формы / Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, Ю.И. Муринов [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1991. – № 2. – С. 29–32.
4. ²⁵²Cf Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, S.A. Aksyonov [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 819–823.
5. Tolstikova T.G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T.G. Tolstikova, M.V. Khvostov, A.O. Bryzgalov // Mini Rev. Med. Chem. – 2009. – Vol. 9, № 11. – P. 1317–1328.
6. Далимов Д.Н. Молекулярные комплексы моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты с некоторыми лекарственными средствами и их интерферониндуцирующая активность / Д.Н. Далимов, Ю.Т. Исаев, А.М. Сайиткулов // Химия природ. соедин. – 2001. – № 2. – С. 132–134.
7. Антидотная и антирадикальная активность комплексов β-глицирризиновой кислоты с производными пиримидина / Г.А. Толстиков, В.А. Мышкин, Л.А. Балтина [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1996. – № 5. – С. 36–38.
8. Взаємодія стероїдних глікозидів з амінокислотами: дослідження методом плазменно-десорційної мас-спектрометрії / В.В. Пилипенко, С.О. Аксьонов, О.М. Калінкевич, Л.Ф. Суходуб // Biopolym. Cell. – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 212–219.
9. Пилипенко В.В. Мас-спектрометричні дослідження комплексоутворення стероїдних глікозидів з амінокислотами / В.В. Пилипенко, Л.Ф. Суходуб // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна: Біофіз. вісник. – 2004. – № 637, вип. 1–2. – С. 131–137.
10. Pilipenko V.V. Mass spectrometry study of plant steroid glycosides and their interactions with biomolecules / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub // Biopolym. Cell. – 2002. – Т. 18, № 2. – С. 139–141.
11. Суходуб Л.Ф. Стероїдні глікозиди рослинного походження та їх комплексоутворення з біомолекулами (за даними мас-спектрометрії) / Л.Ф. Суходуб, О.М. Калінкевич // Журн. Академії мед. наук України. – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 225–245.
12. Pilipenko V.V. PDMS study of interactions of steroid glycosides with nucleoside and nucleotide / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, A.N. Kalinkevich // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна: Біофіз. вісник. – 2001. – № 528, вип. 2. – С. 103–109.
13. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине / [Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, В.П. Гранкина и др.]. – Новосибирск: Гео, 2007. – 311 с.
14. Толстиков Г.А. Комплексы β-глицирризиновой кислоты с лекарственными веществами как новые транспортные формы / Г.А. Толстиков, Ю.И. Муринов, Л.А. Балтина // Хим.-фарм. журн. – 1990. – № 8. – С. 26–27.
15. Фармакологическая активность комплексов нестероидных противовоспалительных препаратов с глицирризиновой кислотой, полученных методами жидкофазного и твердофазного синтеза / И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, М.П. Долгих [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2002. – № 1. – С. 12–13.
16. Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances /

- L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, G. Schroeder, N.I. Borisenko // Functionalized molecules – synthesis, properties and application; ed. V.I. Rybachenko. – Donetsk: Schidnyj vydavnyczyj dim, 2010. – Chapter 4. – P. 85–103.
17. Зузук Б.М. Площ вьющийся *Hedera helix* L. / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик, Л.И. Зузук // Провизор. – 2003. – № 12. – С. 13–14.
 18. Яковишин Л.А. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с аспирином / Л.А. Яковишин, В.И. Гришковец, Е.Н. Корж // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25, № 2. – С. 288–293.
 19. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение таурозида E из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришковец, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
 20. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение гликозидов L-A, L-B₁, L-B₂, L-C, L-D, L-E₁, L-G₁, L-G₂, L-G₃, L-G₄, L-H₁, L-H₂ и L-I₁ из листьев *Hedera canariensis* / В.И. Гришковец, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковишин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
 21. Самоассоциация и комплексообразование тритерпеновых гликозидов и холестерина / Л.А. Яковишин, Н.И. Борисенко, М.И. Руднев [и др.] // Химия природ. соедин. – 2010. – № 1. – С. 45–48.
 22. Электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия смесей тритерпеновых гликозидов с парацетамолом / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Журн. прикл. спектр. – 2010. – Т. 77, № 5. – С. 668–672.
 23. Масс-спектрометрия молекулярного комплексообразования тритерпеновых гликозидов с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Биоорганич. химия. – 2011. – № 5. – С. 679–684.

Лекарь Г.В. Электроспрей-іонізаційна мас-спектрометрія сумішей тритерпенових глікозидів з ацетилсаліциловою кислотою (аспірином) / Г.В. Лекарь, Л.О. Яковішин, С.М. Борисенко, О.В. Ветрова, М.І. Борисенко, В.І. Гришковець // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 291-297.

Методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням вперше досліджено комплексоутворення ацетилсаліцилової кислоти (аспірину) з тритерпеновими глікозидами α -хедерином (3-*O*- α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-арабінопіранозидом хедерагеніну) та хедерасапоніном С (3-*O*- α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-арабінопіранозил-28-*O*- α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-глюкопіранозидом хедерагеніну), вилучених з плюща. Глікозиди утворюють з ацетилсаліциловою кислотою молекулярні комплекси складу 1:1. Комплекс ацетилсаліцилової кислоти з α -хедерином є більш стійким.

Ключові слова: мас-спектрометрія з іонізацією електророзпиленням, тритерпенові глікозиди, α -хедерин, хедерасапонін С, ацетилсаліцилова кислота (аспірин), молекулярний комплекс.

Lekar A.V. Electrospray ionization mass spectrometry of mixtures of triterpene glycosides with acetylsalicylic acid (aspirin) / A.V. Lekar, L.A. Yakovishin, S.N. Borisenko, E.V. Vetrova, N.I. Borisenko, V.I. Grishkovets // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 291-297.

Using electrospray ionization mass spectrometry, the molecular complexation of acetylsalicylic acid (aspirin) with ivy triterpene glycosides α -hederin (hederagenin 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-arabinopyranoside) and hederasaponin C (hederagenin 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-arabinopyranosyl-28-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranoside) was for the first time investigated. The glycosides form complexes with acetylsalicylic acid in the 1:1 molar proportion. The complex of acetylsalicylic acid with α -hederin is more stable.

Keywords: electrospray ionization mass spectrometry, triterpene glycosides, α -hederin, hederasaponin C, acetylsalicylic acid (aspirin), molecular complex.

Поступила в редакцію 18.09.2012 г.