

Мас-спектрометричне вивчення складу і структури стероїдних глікозидів з *Tribulus terrestris L.* та *Agave sisalana L.*

В. В. Пилипенко, Л. Ф. Суходуб

Інститут прикладної фізики НАН України
Вул. Петропавлівська, 58, Суми, 40030, Україна
E-mail: iaruas@gluk.apc.org та vic@rbcmil.ru

Методом часопротіної плазмово-десорбційної мас-спектрометрії з іонізацією уламками поділу ^{252}Cf (TOF-PDMS) досліджено стероїдні глікозиди — похідні гекогеніну та діосгеніну. Встановлено їхню молекулярну масу, шляхи фрагментації вуглеводного ланцюга та стероїдного компонента молекули стероїдного глікозиду.

Вступ. Рослина — це багатюще джерело різноманітних біологічно активних сполук, у тому числі сапонінів. Молекула сапоніну складається з гідрофобного компонента (аглікону або геніну) та приєднаного до неї гідрофільного компонента одного чи декількох вуглеводних ланцюгів [1]. В залежності від будови геніну сапоніни поділяють на такі групи: тритерпеноїдні глікозиди, у яких аглікон має олеанановий, урсановий чи дамарановий скелет; стероїдні глікозиди (СГ), аглікон яких представлений стероїдами — похідними спіростану чи фуростану; стероїдні алкалоїдні глікозиди, у яких кисень у спіростані заміщений на азот [1].

Зацікавленість дослідників у виявленні та вивченні активності сапонінів та СГ зумовлена можливістю їхнього використання в різноманітних галузях діяльності людини. Насамперед це стосується фармакології та сільського господарства. На сьогодні існує понад 200 різноманітних фармакологічних препаратів на основі сапонінів [1]. Кількість новітніх лікувальних засобів, які містять СГ, невпинно зростає. У першу чергу, це лікувальні засоби з таких рослин, як *Dioscorea caucasica Lipsky*, *Dioscorea nipponica Makino*, *Quillaja saponaria Molina*, *Tribulus terrestris L.*, *Yucca shedigera L.*, *Trigonella foenum graecum L.*, *Agave sisalana L.* та ін. [1]. Певними труднощами при вивченні СГ залишаються їхнє виділення, очищення та встанов-

лення складу і структури. Одночасне застосування декількох інструментальних методів дослідження може забезпечити повну інформацію про склад та будову молекули СГ, але кожний з методів має своє поле чутливості і не може бути використаний для дослідження усіх типів СГ. Повний цикл аналізу потребує також великої кількості часу, реактивів та значних витрат дослідної речовини, яка присутня у рослині в мізерних кількостях і є досить дорогою. Великим недоліком є й практична неможливість проведення досліджень рослинних екстрактів без попереднього очищення та розділення, що в свою чергу також значно ускладнює процес аналізу.

У роботі [2], де розглядаються переваги мас-спектрометрії перед традиційними аналітичними методами, вказано на три «S» (specificity, sensitivity and speed) — специфічність, чутливість та швидкість. Дійсно, оскільки будь-яка природна сполука має молекулярну масу як базову характеристику речовини, мас-спектрометрію можна вважати універсальним методом ідентифікації природних сполук [1–2]. Одним із них є часопротіна плазмово-десорбційна мас-спектрометрія з іонізацією уламками поділу ^{252}Cf (TOF-PDMS). В літературі описано подібні дослідження структури і складу СГ. Успішне використання TOF-PDMS представлено в роботі [3] при вивченні СГ з *Cornus florida*. TOF-PDMS застосовано при вивченні сапонінів з

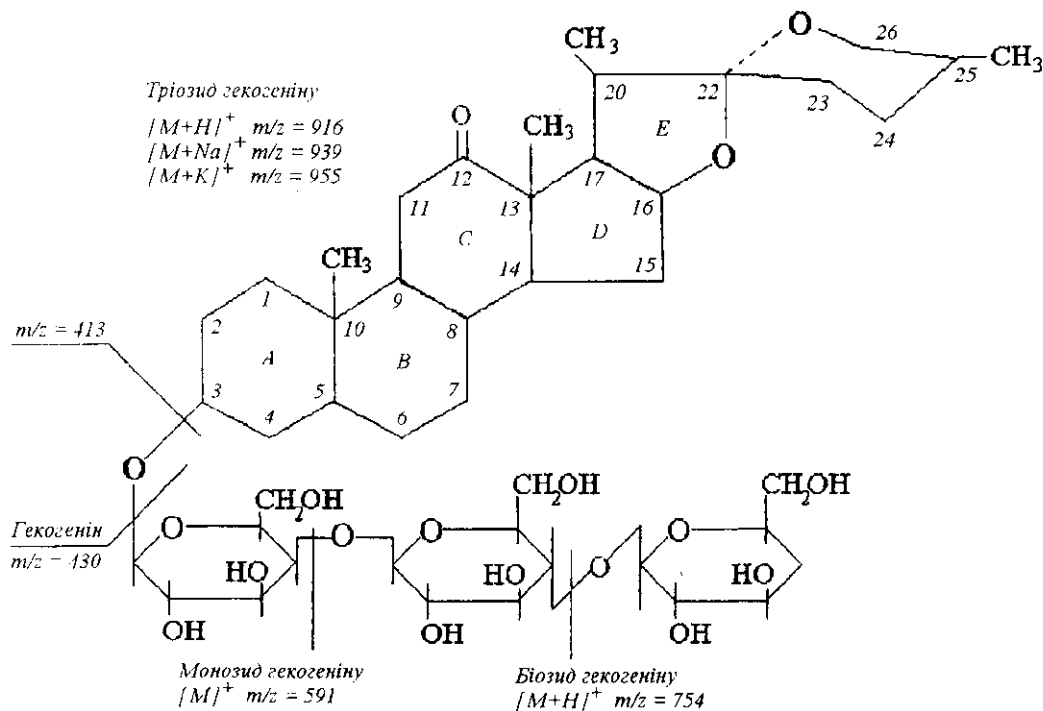


Рис. 1. Хімічна структура стероїдних глікозидів — похідних геніну і гекогеніну. Нумерація атомів стандартна, як для холестерину

Хімічна структура і склад стероїдних глікозидів

Стероїдний глікозид	Хімічна номенклатура	Молекулярна маса
Тріозид діосгеніну (з <i>Tribulus terrestris</i>)	α -L-Rha- α -L-Rha- β -D-Glc-3-25R-spirost-5-en-3b-ol	868
Агавозид А (монозид гекогеніну)	β -D-Gal-3-25R-5 α -spirostan-12-keto-3 β -ol	591
Агавозид В (біозид гекогеніну)	β -D-Glc-4 β -D-Gal-3-25R-5 α -spirostan-12-keto-3 β -ol	753
Агавозид С (тріозид гекогеніну)	β -D-Glc- β -D-Glc-4 β -D-Gal-3-25R-5 α -spirostan-12-keto-3 β -ol	915

Beta vulgaris [4] та *Tridesmostemon claessenssi* [5]. У роботі [6] структуру сапонінів з *Steganotaenia araliacea* також досліджено за допомогою TOF-PDMS.

Матеріали і методи. У попередній роботі [7] нами було представлено методику вивчення структури та складу СГ та генінів за допомогою TOF-PDMS. В цій роботі викладаються результати її подальшого застосування при дослідженнях СГ з *T. terrestris* L. та *A. sisalana* L.

Хімічну структуру досліджуваних СГ представлено на рис. 1 і в таблиці.

Мас-спектри СГ записували на мас-спектрометрі МСБХ (АО «Selmi», Україна), реєструючи їх в інтервалі m/z до 2000 а. о. м. з прискорюючою напругою +15 кВ або -15 кВ, що забезпечувало

роздільність ~250 на 10 %-й висоті піка. Центроїди піків знайдено з помилкою ± 1 в інтервалі мас 100—500 а. о. м. і ± 2 в інтервалі, більшому за 500 а. о. м. Кожне вимірювання повторювали п'ять разів. Процедура підготовки зразків була такою: СГ розчиняли у водно-метанольному розчині (1:1 за об'ємом) при концентрації 1 мг/мл. Позолочений диск, який містив пробу, попередньо промивали у концентрованому розчині гідроксиду натрію протягом 24 год, потім декілька разів промивали дистильованою водою, протирали безворсовою ватою, змоченою послідовно н-бутанолом та етанолом, насамкінець промивали ацетоном класу «о. с. ч.». Краплю (10—20 мкл) розчину для аналізу наносили на позолочений диск, який містить пробу, таким чином, щоб розчин утворив пляму рівномірної товщини загальною площею не більш ніж 1—1,5 см². Далі диск просушували в струмені теплого повітря до утворення на ньому сухого осаду і аналізували за допомогою МСБХ.

Результати і обговорення. В мас-спектрах СГ зафіксовано інтенсивні піки молекулярного або протонного іонів та піки аддуктів з іонами лужних металів $[M+Na]^+$ та $[M+K]^+$. Для TOF-PDMS досліджень СГ характерним є також певний тип фрагментації молекули, який являє собою розрив у місці з'єднання аглікону і вуглеводного ланцюга з відокремленням геніну від СГ та відщеплення однієї чи декількох молекул вуглеводів, внаслідок чого вуглеводна частина СГ стає дещо

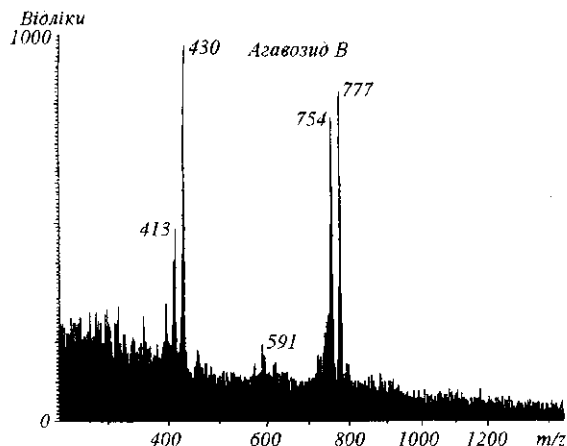


Рис. 2. Мас-спектр агавозиду В (біозиду гекогеніну), записаний при позитивній напрузі. Інтенсивні піки відповідають таким іонам: [аглікон - OH]⁺ m/z = 413, [аглікон]⁺ m/z = 430, [M - гексоза]⁺ m/z = 591, [M]⁺ m/z = 754, [M + Na]⁺ m/z = 777

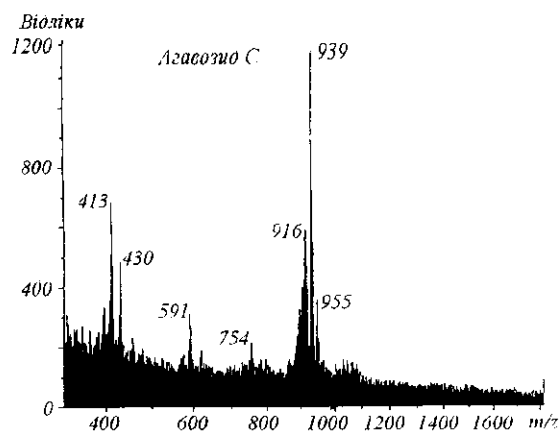


Рис. 3. Мас-спектр агавозиду С (тріозиду гекогеніну), записаний при позитивній напрузі. Інтенсивні піки відповідають таким іонам: [аглікон - OH]⁺ m/z = 413, [аглікон]⁺ m/z = 430, [M - 2 гексози]⁺ m/z = 591, [M - гексоза]⁺ m/z = 754, [M + H]⁺ m/z = 916, [M + Na]⁺ m/z = 939, [M + K]⁺ m/z = 955

коротшою. У мас-спектрах СГ це проявляється в утворенні піків в області молекулярної маси аглікону СГ та піків в області мас, що відповідають СГ з меншим вуглеводним ланцюгом у порівнянні із зразком. Крім цього, для мас-спектрів СГ характерна також наявність піків, які належать фрагментам агліконів. Частіше за все, ці піки відповідають утворенню іона аглікону з відщепленою від нього гідроксильною групою чи молекулою води або протона. Наявність піків фрагментів СГ дозволяє визначити склад вуглеводного ланцюга СГ та ідентифікувати аглікон, тобто повністю визначити склад молекули СГ. Розрахунки складу вуглеводного ланцюга СГ похідних гекогеніну — агавозиду А (монозид гекогеніну), агавозиду В (біозид гекогеніну), агавозиду С (тріозид гекогеніну) та тріозиду діосгеніну здійснювали, виходячи з даних мас-спектрів. Різниця в масі між протонованим молекулярним іоном агавозиду А [M + H]⁺ m/z = 592 та піком його аглікону [аглікон]⁺ m/z = 430 (гекогенін) складає 162, тобто в даному випадку маємо гексозу.

В разі мас-спектра агавозиду В різниця між протонованим молекулярним іоном [M + H]⁺ m/z = 754 та молекулярним іоном аглікону [аглікон]⁺ m/z = 430 складає 324, що засвідчує наявність двох молекул гексози у вуглеводному ланцюзі. Мас-спектр агавозиду В також демонструє інтенсивний пік [M - гексоза]⁺ m/z = 591, який відповідає молекулярній масі монозиду гекогеніну (рис. 2). Мас-спектр агавозиду С також свідчить про наявність агліконового фрагмента [аглікон]⁺ m/z = 430 і протонованого молекулярного іона [M + H]⁺ m/z = 916,

різниця мас яких дорівнює 486, що вказує на наявність третьої гексози. Крім цього, спектр агавозиду С демонструє фрагментні іони біозиду гекогеніну з m/z = 754 і монозиду гекогеніну m/z = 591 (рис. 3).

Мас-спектр тріозиду діосгеніну з *T. terrestris* L. продемонстрував інтенсивні піки таких іонів: [аглікон - H₂O]⁺ m/z = 397, [аглікон + H]⁺ m/z = 415, [M + H]⁺ m/z = 869, [M + Na]⁺ m/z = 891, [M + K]⁺ m/z = 907. Отже, різниця в масі між іоном протонованого аглікону та протонованого СГ складає 454, що відповідає такому складу вуглеводного ланцюга: Rha-Rha-гексоза (Glc). Порівнявши дані, отримані методом кислотного та ферментативного гідролізу щодо складу вуглеводного ланцюга СГ, з мас-спектрометричними результатами, можна зробити висновок про їхню ідентичність.

Висновки. Таким чином, дослідження СГ методом TOF-PDMS дозволяють одержати інформацію про: 1) їхню молекулярну масу; 2) шляхи фрагментації молекули СГ, що дає змогу отримати з мас-спектрів дані про молекулярні маси агліконів та про масу і склад вуглеводних ланцюгів; 3) фрагментацію агліконів СГ у мас-спектрах, тобто про структуру аглікону, зокрема, про наявність у ньому гідроксогруп.

V. V. Pilipenko, L. F. Sukhodub

Mass-spectrometric investigation of composition and structure of steroid glycosides from *Tribulus terrestris* L. and *Agave sisalana* L.

Summary

²⁵²Cf time-of-flight plasma desorption mass-spectrometry (TOF-PDMS) was applied for investigation of hecogenine and diosgenine

steroid glycosides. Their molecular masses and the pathways of fragmentation of carbohydrate chain and steroid component of the molecule were established.

В. В. Пилипенко, Л. Ф. Суходуб

Масс-спектрометрическое исследование состава и структуры стероидных гликозидов из *Tribulus terrestris L.* и *Agave sisalana L.*

Резюме

Методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (TOF-PDMS) исследованы стероидные гликозиды — производные гекогенина и диосгенина. Установлена их молекулярная масса, пути фрагментации углеводной цепи и стероидного компонента молекулы стероидного гликозида.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hostettmann K., Marston A. Saponins.—Cambridge Univ. press 1995.—548 p.
2. Loo J. A. Studying noncovalent protein complexes by electro-spray ionization mass spectrometry // *Mass Spectrometry Rev.*—1997.—16.—P. 1—23.

3. Hostettmann K., Hostettmann-Kaldas M., Nakanishi K. Molluscicidal saponins from *Cornus florida L.* // *Helv. chim. acta.*—1978.—61.—P. 1990—1995.
4. Massiot G., Dijoux M., Lavaud C., Men-Olivier L., Connoly J., Sheeley D. Seco-glycosides of oleanolic acid from *Beta vulgaris* // *Phytochemistry.*—1994.—37, N 6.—P. 1667—1670.
5. Massiot G., Lavaud C., Le Men-Olivier L., van Binst G., Miller S. P. F., Fales H. M. Structural elucidation of alfalfa root saponins by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*—1988.—N 1.—P. 3071—3079.
6. Lavaud C., Massiot G., Le Men-Olivier L., Viari A., Vigny P., Delaude C. Saponins from *Steganotaenia araliacea* // *Phytochemistry.*—1992.—31.—P. 3177—3181.
7. Pilipenko V. V., Sukhodub L. F., Kalinichenko T. G., Kalinkevich A. N., Aksyonov S. A., Kintia P. K., Bobeyko V. A., Shvets S. A., Guryeva L. S. 252-Cf PDMS study of plant steroid glycosides // *Вісн. Харківськ. ун-ту (Біофіз. вісн.).*—2001.—№ 525, Вип. 1(8)—P. 113—120.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 22.07.02