



стот и диапазоны средних амплитуд (значения параметров R).

Заключение

Изучение биоакустики мирмекофильных жесткокрылых и муравьёв началось относительно недавно. Настоящее исследование является одним из первых в России, в котором объясняется роль акустического канала при взаимодействии муравьёв *F. rufa* и мирмекофильных жесткокрылых *S. hellwigii*. Было установлено, что звуковые сигналы действуют «независимо» от химических сигналов или превосходят их по характеру и направленности деятельности. Выполнялись такие сложнейшие задачи, как: создание и поддержание оптимальных условий для существования колонии муравьёв и мирмекофильных жесткокрылых; конструирование устройства для записи интересных звуков; выбор программного обеспечения для обработки звука; выбор мето-

дов очистки шумов из интересующих записей; непосредственное проведение эксперимента; математическая обработка данных.

Список литературы

1. Гребенников К. А., Рига Е. Ю. История изучения жуков-мирмекофилов Среднего и Нижнего Поволжья // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов, 2014. Вып. 11. С. 26–30.
2. Сажнев А. С., Рига Е. Ю., Забалуев И. А. Новые виды мирмекофильных жесткокрылых для фауны Саратовской области // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов, 2015. Вып. 12. С. 71–74.
3. Рига Е. Ю., Аникин В. В. Использование математического аппарата при изучении акустических сигналов коммуникации муравьёв рода *Formica* (Hymenoptera: Formicidae) и жуков рода *Scydmaenus* (Coleoptera: Staphylinidae) // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов, 2016. Вып. 13. С. 52–55.

Образец для цитирования:

Рига Е. Ю., Аникин В. В. Акустические сигналы при коммуникации муравьёв рода *Formica* (Hymenoptera: Formicidae) и жуков рода *Scydmaenus* (Coleoptera: Staphylinidae) // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 4. С. 428–433. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-4-428-433.

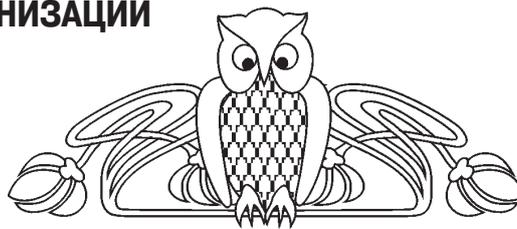
УДК 543.51+ 547.814.5

ФРАГМЕНТАЦИЯ КВЕРЦЕТИНА И НАРИНГЕНИНА, А ТАКЖЕ ФОТОИНДУЦИРУЕМЫЕ ПРОЦЕССЫ В УСЛОВИЯХ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИИ И ИОНИЗАЦИИ

В. С. Гринёв^{1,2}, С. А. Коннова^{1,2}, В. В. Игнатов¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
E-mail: grinev@ibppm.ru



Обнаружено, что в условиях лазерной десорбции и ионизации кверцетин, принадлежащий ряду флавонолов, претерпевает распад путём фотоиндуцируемой реакции с последующей димеризацией образующегося бирадикала и дальнейшей фрагментацией димера. Нарингенин, относящийся к ряду флавононов, также претерпевает аналогичную фрагментацию, однако из-за отсутствия сопряжения в кольце С образующаяся бирадикальная частица не способна к дальнейшей димеризации по аналогичной кверцетину схеме вследствие своей малой устойчивости. В спектрах обнаружены сигналы С–С димера нарингенина и его фрагментарного иона, сделано предположение об их возможных структурах.

Ключевые слова: флавоноиды, масс-спектрометрия, лазерная десорбция и ионизация, фотохимический процесс.

Fragmentation of Quercetin and Naringenin and Photoinduced Processes under Laser Desorption/Ionization Conditions

V. S. Grinev, S. A. Konnova, V. V. Ignatov

We found that under laser desorption and ionization conditions, quercetin, belonging to the flavonol family, undergoes a decay, which occurs through a photoinduced reaction followed by dimerization of the forming biradical and by the subsequent fragmentation of the dimer. Naringenin, belonging to the flavonone family, also undergoes similar fragmentation, but owing to the lack of conjugation in the C ring, the forming biradical particle is not capable of further dimerization in the same way as observed for quercetin



because of its low stability. In the spectra, signals of the naringenin C–C dimer and of its fragment ion were found, and their possible structures were proposed.

Key words: flavonoids, mass spectrometry, laser desorption and ionization, photochemical process.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-4-433-438

Флавоноиды – группа растительных полифенольных соединений, относящихся к вторичным метаболитам, выполняющим в растениях многообразные функции. Флавоноиды участвуют в пигментации растений, исполняют роль мессенджеров химических сигналов в кле-



точной коммуникации, участвуют в процессах репродукции, в том числе в развитии пыльцы, в созревании плодов и семян. Широко исследуется роль флавоноидов в экспрессии генов, регуляции активности белков и клеточного деления, а также защите от неблагоприятных факторов окружающей среды [1, 2].

К одной из наиболее распространённых в природе групп флавоноидов – флавонолам – принадлежит кверцетин. В сравнительном аспекте с кверцетином часто исследуют эффекты флавонона с более низкой биодоступностью – нарингенина (формулы представлены ниже).



Работы, посвящённые анализу флавоноидов с помощью масс-спектрометрии матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации (МАЛДИ-МС), известны, однако в ранних исследованиях для получения таких спектров применялись «классические» матрицы (например, 2,5-дигидроксibenзойная кислота), что приводило к образованию в ходе ионизации целого пула кластеров, построенных как из молекул флавоноидов, так и молекул матрицы, а также их различных комбинаций [3].

Поскольку большинство флавоноидов хорошо поглощают УФ излучение, их МАЛДИ-МС спектры могут быть зарегистрированы при введении образцов флавоноидов напрямую, в «безматричном» варианте – с помощью масс-спектрометрии в условиях лазерной десорбции и ионизации (ЛДИ-МС). Кроме того, флавоноиды сами по себе являются перспективными матрицами для МАЛДИ-МС, имеются сведения об успешном использовании их при анализе комплексов Pt(II) и Pd(II), проявляющих противораковую активность [4], а также Ru(III) [5]. Поскольку флавоноиды известны своей хелатирующей способностью, масс-спектры их комплексов с металлами являлись предметом изучения поведения в условиях ЛДИ [6].

В связи с большим разнообразием выделяемых в настоящее время флавоноидов и их метаболитов задача по установлению их строения является актуальной. Изучение особенностей

фрагментации флавоноидов при различных способах ионизации актуально и вследствие прогностической ценности наблюдаемых закономерностей при интерпретации масс-спектров аналогичных природных и синтетических соединений.

Материал и методы

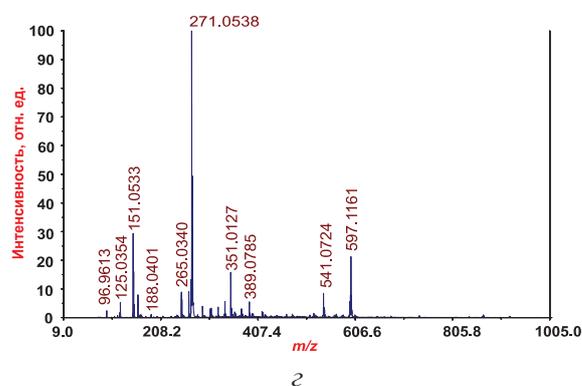
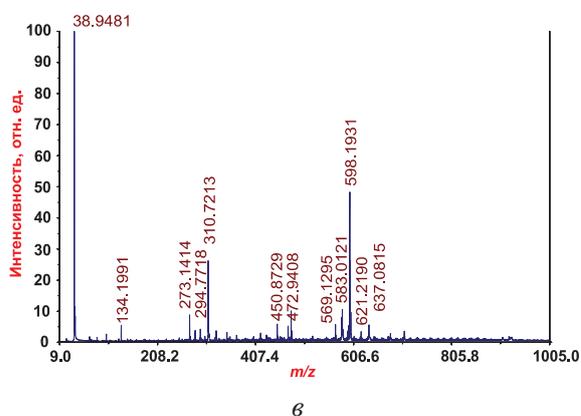
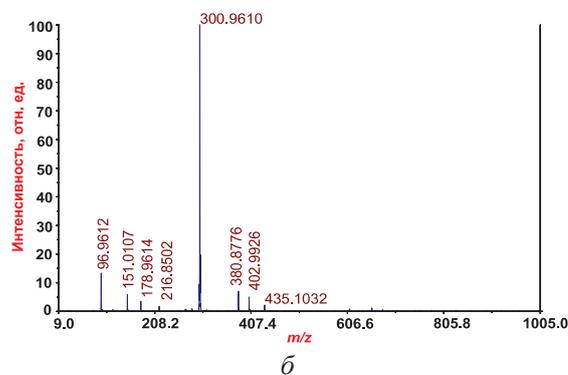
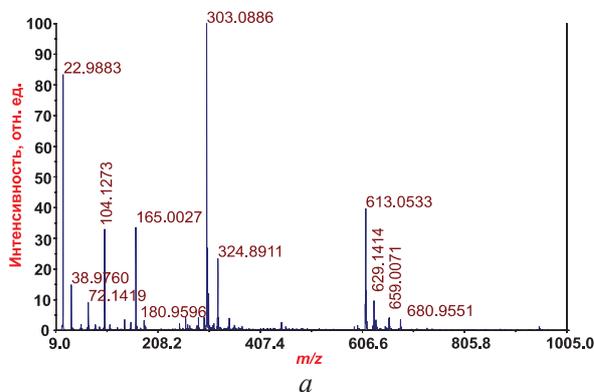
Масс-спектры были зарегистрированы в линейном режиме при детектировании положительных и отрицательных ионов на тандемном времяпролётном масс-спектрометре AB Sciex 5800 TOF/TOF (США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Симбиоз» при ИБФРМ РАН. Метод ионизации – ЛДИ, твердотельный лазер Nd:YAG, длина волны 355 нм, ускоряющее напряжение 20 кВ. На стандартный стальной 384-луночный планшет МАЛДИ наносили 1 мкл раствора кверцетина или нарингенина в ацетонитриле с концентрацией 1 мг/мл, давали капле высохнуть при комнатной температуре. Калибровку масс производили по массово-зарядовым числам известных кластеров α -циано-4-гидроксикоричной кислоты («Sigma-Aldrich», США). В работе был использован кверцетин (98.2%, «Диаэм», Россия) и нарингенин (95%, «Sigma-Aldrich», США), а также ацетонитрил (HPLC-grade, «Panreac», Испания). Чистота использованных препаратов флавоноидов была подтверждена методом ВЭЖХ с УФ детектированием.



Результаты и их обсуждение

В масс-спектрах кверцетина, полученных в условиях ЛДИ в режиме детектирования положительных ионов (рисунок, а), наблюдаются

интенсивные сигналы с m/z 302.99 и 324.80, соответствующие протонированной форме кверцетина $[M + H]^+$ и его натриевому аддукту $[M + Na]^+$. Отмечены пики фрагментарных и кластерных ионов (таблица).



Масс-спектры лазерной десорбции и ионизации кверцетина в режиме положительных (а) и отрицательных (б) ионов и нарингенина в режиме положительных (в) и отрицательных (г) ионов

Интенсивность сигнала тригидрата димера $[2M + 3H_2O]^+$ составляет приблизительно 90%, а его натриевого аддукта $[2M + 3H_2O + Na]^+$ – 80% от интенсивности пика соответствующей протонированной формы $[2M + 3H_2O + H]^+$. Известно, что кверцетин кристаллизуется в виде моно [7] и дигидратов [8], в которых молекулы связаны π - π стэкинговыми взаимодействиями между собой, а с водой – прочными межмолекулярными водородными связями. Наряду с этим катионы щелочных металлов способствуют образованию сложных олигомеров, что было показано, в частности, для кверцетина [9].

В спектре положительных ионов (см. рисунок, в) нарингенина присутствуют пики протонированной формы $[M + H]^+$ при m/z 273.14, а также его натриевого и калиевого аддуктов при m/z 294.77 и 310.72 соответственно, причём сигнал последнего наиболее интенсивен из них (см. таблицу).

В отличие от кверцетина в спектре нарингенина практически отсутствуют фрагментарные ионы, за исключением иона с m/z 134.20. Причиной отсутствия сигналов структур, аналогичных таковым кверцетина с m/z 165 и 181, может быть отсутствие сопряжения в кольце С и, как следствие, относительно низкая устойчивость образующихся ионов в условиях ЛДИ.

Сигналы димеров нарингенина довольно представительны в спектре. Так, отмечаются сигналы перегруппировочных ионов при m/z 450.87 и 472.94, которые, вероятно, следует отнести к $[2M - C_6H_5O]^+$ и натриевому аддукту $[2M - C_6H_6O + Na]^+$ соответственно. Аналогично кверцетину в спектре нарингенина присутствуют интенсивные сигналы калиевого аддукта димера молекулы $[2M + K]^+$ при m/z 583.01, а также сигналы, соответствующие тригидратированным формам димера нарингенина, его протонированной форме, натриевому и калиевому аддуктам с

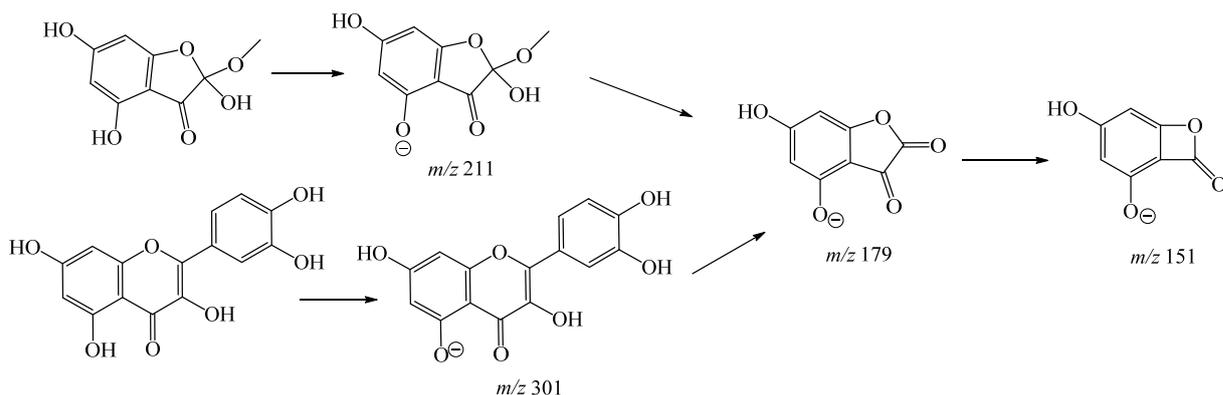
**Ионы, наблюдаемые в масс-спектрах лазерной десорбции и ионизации кверцетина и нарингенина, и их предполагаемые структуры**

Теоретическое m/z	Экспериментальное m/z	Отнесение
Кверцетин		
<i>положительные ионы</i>		
303.05	303.09	$[M + H]^+$
325.03	324.89	$[M + Na]^+$
613.04	613.05	$[2M + 3H_2O]^+$ $[2M + 3H_2O + H]^+$ $[2M + 3H_2O + Na]^+$
629.09	629.14	
658.12	658.04	
659.12	659.01	
681.11	680.96	
<i>отрицательные ионы</i>		
96.9601	96.96	гидросульфат-анион
151.00	151.01	
178.99	178.96	
217.01	216.85	
301.04	300.96	$[M - H]^-$
380.99	380.88	
403.05	402.99	
435.04	435.10	
Нарингенин		
<i>положительные ионы</i>		
273.08	273.14	$[M + H]^+$
295.06	294.77	$[M + Na]^+$
311.03	310.72	$[M + K]^+$
451.10	450.87	$[2M - C_6H_5O]^+$ $[2M - C_6H_6O + Na]^+$
473.08	472.94	
569.14	569.13	$[2M + K]^+$ $[2M + 3H_2O]^+$ $[2M + 3H_2O + H]^+$ $[2M + 3H_2O + Na]^+$ $[2M + 3H_2O + K]^+$
583.10	583.01	
598.17	598.19	
599.18	599.16	
621.16	621.22	
637.13	637.08	
<i>отрицательные ионы</i>		
96.96	96.96	гидросульфат-анион
151.00	151.05	
188.05	188.04	
271.06	271.05	$[M - H]^-$
351.02	351.02	сульфат нарингенина димер нарингенина $[2M - 3H - 152]^-$ димер нарингенина $[2M - 3H]^-$ $[2M + 3H_2O - H]^-$
389.10	389.08	
541.11	541.07	
597.16	597.12	

m/z 598.19, 599.16, 621.22, 637.08 соответственно.

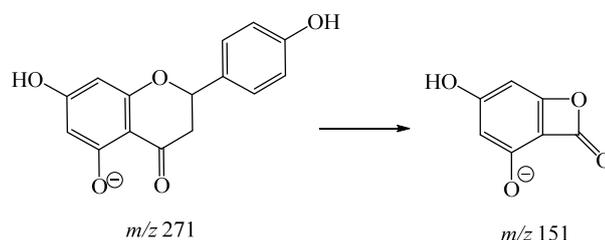
Таким образом, образование тех или иных ионов при фазовом переходе кристалл–газ под действием лазерного излучения, вероятно, не в последнюю очередь зависит от особенностей кристаллической структуры флавоноида (в частности, наличия сольватированной воды в кристалле, её локализации), характера и положения заместителей в молекуле, а также от примесей соединений щелочных металлов. Говорить о том, насколько эта закономерность общая для флавоноидов разных классов, позволит дальнейшее изучение их спектров ЛДИ.

В масс-спектре кверцетина, записанном в режиме детектирования отрицательных ионов, наблюдаются интенсивный пик депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 300.96, а также сигналы более низкой интенсивности (см. рисунок, б, таблица). Сигнал с m/z 380.88 относится к примеси сульфата кверцетина в образце [10], что подтверждается наличием сигнала гидросульфат-аниона с m/z 96.96. Наличие сигналов с m/z 151.01 и m/z 178.96 согласуется с данными других исследований [11], что позволяет предположить следующую схему фрагментации данного соединения:



В ходе фрагментации нарингенина анион с m/z 151.50, очевидно, образуется непосредствен-

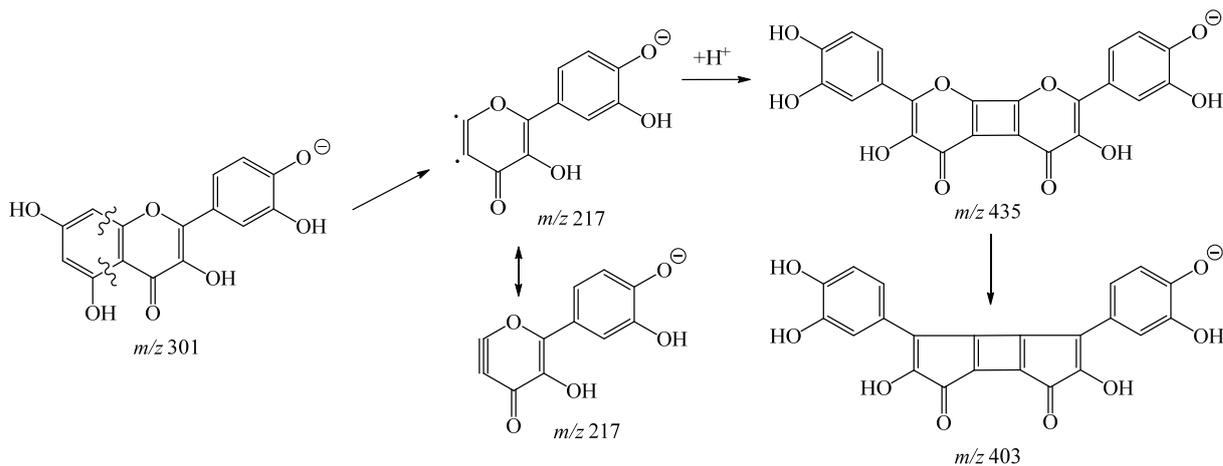
но путём элиминирования молекулы 4-винилфенола (см. рисунок, 2, таблица):



Поскольку данные фрагменты являются общими для флавоноидов различного строения (происходят при фрагментации аннелированных колец А и С молекул полифенолов), эти сигналы могут быть использованы как индикаторные для отнесения того или иного пика к ряду флавоноидов или метаболиту, предшественником которого была молекула флавоноида. Метоксизамещённые в кольцо А флавоноиды также могут быть идентифицированы по характерным пикам с m/z 193 и 165 соответственно. Совокупность этих данных

может быть полезна при идентификации неизвестных флавоноидов, полученных из различных растительных источников.

Сигналы с m/z 216.85 и 435.10 нами отнесены к фрагментам, получающимся в результате воздействия УФ лазера, что ранее в литературе для флавоноидов, насколько нам известно [12], описано не было. В дальнейшем бирадикал-анион с m/z 216.85 образует димер с m/z 435.10, который, теряя молекулу кислорода, превращается в анион с m/z 402.99:



В методах ионизации электронным ударом и электрораспылением первоначальный разрыв связи $=C-O-$ также происходит достаточно часто [13], главным образом, в соединениях, проявляющих фотохромные свойства [14], дальнейшее

успешное протекание данной фотохимической реакции по описанному нами пути, на наш взгляд, обусловлено возможностью пространственного сближения атомов кислорода, а также сопряжением у образующихся интермедиатов.



В случае нарингенина в тех же условиях происходят аналогичные кверцетину процессы, что подтверждается наличием сигнала анион-радикала с m/z 188.04 в спектре, однако его дальнейшей димеризации не происходит – в спектре отсутствуют сигналы с m/z 375.09 и 343.10. Вероятно, это связано с наличием в кольце С нарингенина sp^3 -гибридизованного атома углерода, прерывающего цепь сопряжения, аналогичную таковой в системе кверцетина. В то же время следует отметить, что слабоинтенсивные сигналы при m/z 339.30 и 373.05 могут иметь отношение к похожим структурам, стабилизированных более протяжёнными цепями сопряжения, возникающими вследствие элиминирования водорода.

В спектре регистрируются сигналы аниона тригидратированного димера нарингенина $[2M + 3H_2O - H]^-$ с m/z 597.12, а также аниона, предположительно, С–С димера нарингенина $[2M - 3H]^-$ с m/z 541.07. При потере фрагмента массой 152.01 а.е.м. образуется фрагментарный ион С–С димера, сигнал которого отмечен при m/z 389.08. Таким образом, структурно С–С димер может быть построен либо симметрично (при участии только колец В), либо несимметрично, при этом в одном из фрагментов нарингенина могут быть кольца А и С, атомы углерода которых, очевидно, не могут участвовать в образовании межфлавоновой связи.

Таким образом, при воздействии лазерного излучения на кверцетин и нарингенин помимо фрагментации происходят и фотохимически индуцированные процессы димеризации образующихся ионов, которые могут претерпевать дальнейшую фрагментацию. Одной из предпосылок данного процесса является наличие системы сопряжённых кратных связей в кольце С флавоноидов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 14-04-01685 и 15-04-00353) и в рамках государственного задания Минобрнауки России в сфере научной деятельности (проектная часть, задание 17.488.2014К).

Список литературы

1. Pollastri S., Tattini M. Flavonols: old compounds for old roles // *Ann. Botany*. 2011. Vol. 108, № 5. P. 1225–1233.
2. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды : биохимия, биофизика, медицина. Пушино : Synchronbook, 2013. 310 с.
3. Madeira P. J. A., Florencio M. H. Flavonoid – matrix cluster ions in MALDI mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2009. Vol. 44, № 5. P. 1105–1113.
4. Petković M., Vujačić A., Schiller J., Bugarčić Z., Savić J., Vasić V. Application of flavonoids – quercetin and rutin – as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt(II) and Pd(II) complexes // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009. Vol. 23, № 10. P. 1467–1475.
5. Damjanović B., Petrović B., Dimitrić-Marković J., Petković M. Comparison of MALDI-TOF mass spectra of $[PdCl(dien)]Cl$ and $[Ru(en)_2Cl_2]Cl$ acquired with different matrices // *J. Serb. Chem. Soc.* 2011. Vol. 76, № 2. P. 1–15.
6. Fesenko T., Laguta I., Kuzema P., Stavinskaya O. Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometric Analysis of Some Synthetic Flavonoids and Their Complexes with Zn and Fe // *Materials Science (Medžiagotyra)*. 2010. Vol. 16, N 3. P. 272–275.
7. Domagala S., Munshi P., Ahmed M., Guillot B., Jelsch C. Structural analysis and multipole modelling of quercetin monohydrate – a quantitative and comparative study // *Acta Cryst. Sect. B*. 2011. Vol. 67, № 1. P. 63–78.
8. Jin G.-Z., Yamagata Y., Tomita K. Structure of Quercetin Dihydrate // *Acta Cryst. Sect. C*. 1990. Vol. 46. P. 310–313.
9. Croley T. R., Hughes R. J., Hao C., Metcalfe C. D., March R. E. Observation of Na⁺-bound oligomers of quercetin in the gas phase // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. Vol. 14, № 23. P. 2154–2157.
10. Jones D. J. L., Lamb J. H., Verschoyle R. D., Howells L. M., Butterworth M., Lim C. K., Ferry D., Farmer P. B., Gescher A. J. Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity // *Brit. J. Cancer*. 2004. Vol. 91, № 6. P. 1213–1219.
11. Buchner N., Krumbein A., Rohn S., Kroh L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20, № 21. P. 3229–3235.
12. Fabre N., Rustan I., Hoffmann E. de, Quetin-Leclerc J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavonone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 2001. Vol. 12, № 6. P. 707–715.
13. McGillivray D. L., Poulton G. A. Pyrones. II - The Mass Spectra and Fragmentation Mechanisms of Methyl Maltol (3-Methoxy-2-methyl-4H-pyran-4-one) and Methyl Al-lomaltol (5-Methoxy-2-methyl-4H-pyran-4-one) // *Org. Mass Spectrom.* 1978. Vol. 13. P. 296–301.
14. Oliveira M. M., Carvalho L. H., Peixoto F. P., Oliveira-Campos A. M., Reis A., Domingues P., Domingues M. R. Cleavage of photochromic compounds derived from heterocycles under electrospray tandem mass spectrometry: study of the influence of the heteroatom in fragmentation mechanisms // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. Vol. 24, № 14. P. 2171–2174.

Образец для цитирования:

Гринёв В. С., Коннова С. А., Игнатов В. В. Фрагментация кверцетина и нарингенина, а также фотоиндуцируемые процессы в условиях лазерной десорбции и ионизации // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2016. Т. 16, вып. 4. С. 433–438. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-4-433-438.