

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 615.281.074:543.42

СТАБИЛЬНОСТЬ ДИКАТИОНА ДЕКАМЕТОКСИНА
ПО ДАННЫМ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИМ.В. Косевич¹, В.А. Пашинская¹, З. Шилаги², К. Векей²,
В.С. Шелковский¹, Ю.П. Благой¹¹ Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины,
Харьков-310164, пр. Ленина, 47; e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua² Центральный институт химии Венгерской Академии наук, Будапешт II, Венгрия
Поступила в редакцию 15 июня 1998г.

Изучена стабильность дикатиона антимикробного препарата декаметоксина в условиях действия различных физических факторов. Обнаружены существенные различия путей трансформации декаметоксина под воздействием повышенной температуры и при длительном хранении. С помощью метода вторично-ионной масс-спектрометрии установлено, что изменение препарата со временем при нарушении режимов хранения связано, по-видимому, с удалением противоионов хлора из кристаллического образца с сохранением структуры дикатиона соли, в то время как при термическом воздействии происходит декватернизация четвертичных азотов декаметоксина с образованием нейтральных аминов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: декаметоксин, вторично-ионная масс-спектрометрия, термическая дегградация.

Изучение стабильности биологически-активных химических соединений является необходимым этапом при разработке новых лекарственных средств; соответствующие методы регламентированы в специализированных изданиях, таких как Государственная фармакопея [1]. Одной из высокочувствительных методик, используемых в этих исследованиях, является масс-спектрометрия. Однако ее применение ограничено в основном чисто аналитическими задачами контроля состава и идентификации продуктов дегградации фармакологических препаратов (проводимых по стандартизированным процедурам [1]).

К настоящему времени разработан ряд масс-спектрометрических методик, различающихся по способам ионизации вещества, основанным на различных физических принципах [2-5]. Эти методики позволяют подвергать химические соединения воздействию облучения, температуры, электрического поля высокой напряженности, бомбардировке высокоэнергетичными частицами непосредственно в условиях масс-спектрометрического эксперимента и дают информацию, которая может дополнить данные, получаемые стандартными фармакопейными методиками.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение направлений дегградации антимикробного препарата декаметоксина под воздействием температуры и при длительном хранении (при нарушении рекомендованных правил хранения). В качестве основного метода исследования использовали вторично-ионную масс-спектрометрию (ВИМС) [6-8]. Данные о стабильности, возможных путях распада препарата и продуктах его дегградации представляют интерес не только для фармакологии, но и для дальнейших биофизических исследований механизмов биологического действия декаметоксина и его межмолекулярных взаимодействий с молекулами-мишенями в клетках бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВИМС измерения проводили с использованием масс-спектрометра с двойной фокусировкой VG-ZAB-SEQ («Micromass», Великобритания). Первичный источник ионов обеспечивал формирование первичного бомбардирующего пучка ионов Cs⁺ с энергией 30 кэВ. Ускоряющий потенциал в источнике вторичных ионов составлял 8 кВ.

Образцы растворяли в жидких матрицах - глицерине или нитробензиловом спирте - и вводили во вторичный источник в виде капли объемом 10 мкл посредством штока системы прямого ввода.

В работе использовали препарат декаметоксина, синтезированный в Институте органической химии НАН Украины (Киев). Известно, что декаметоксин отличается повышенной чувствительностью к воздействию света, в связи с чем рекомендуется хранить чистый препарат в посуде из темного стекла [9]. Принадлежность к классу солей (бис)четвертичного аммония обуславливает свойство декаметоксина разлагаться под воздействием высокой температуры путем деалкилирования.

Препарат подвергался воздействиям по следующим трем методам:

- (I) хранение в течение 3-х лет с соблюдением правил, рекомендованных фармакопеей [1], а именно, в сосуде из темного стекла в холодильнике;
- (II) хранение в течение 2-х лет в прозрачном (светлом) пластмассовом сосуде в холодильнике;
- (III) бомбардировка ионами Cs^+ в глицериновом растворе непосредственно в условиях масс-спектрометрического эксперимента в течение 40 минут.

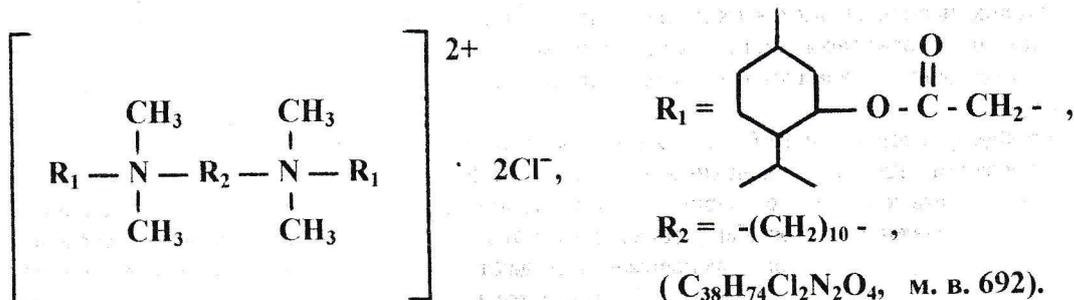
В двух первых случаях контрольные ВИМС масс-спектры снимались с периодичностью в один год. В третьем случае в течение 40 минут проводили сканирование спектров с периодичностью в 10 секунд, результаты которого регистрировали в виде ионных хроматограмм с помощью специального пакета программ компьютерной обработки масс-спектрометрических данных. Ионная хроматограмма представляет собой зависимость интенсивности пика конкретного иона в масс-спектре от времени (отсчитываемого обычно от момента начала бомбардировки образца). Суммирование интенсивностей всех пиков спектра дает величину полного ионного тока (ПИТ). Программа обеспечивает возможность просмотра спектров, относящихся к любой точке ионной хроматограммы.

Использованный прибор обеспечивает высокую точность и воспроизводимость экспериментальных условий, что гарантирует возможность сравнения данных, полученных с интервалом в несколько лет.

Для систематизации путей термического разложения были привлечены данные, полученные с использованием масс-спектрометрической методики с ионизацией электронным ударом (ЭУ). Методика измерений, проводившихся с помощью магнитного масс-спектрометра МИ-1201Б (ПО «Электрон», Сумы, Украина) описана в [10]: кристаллический образец декаметоксина подвергался нагреву в стеклянной ампуле-испарителе до температуры $90^\circ C$; газообразные продукты разложения ионизировали электронами с энергией 70 эВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура молекулы декаметоксина может быть представлена как



В нижеследующих формулах принято обозначение органического дикатиона декаметоксина как M^{++} .

При хранении кристаллического препарата декаметоксина в течение 3-х лет с соблюдением рекомендованных условий (метод (I)) масс-спектры ВИМС, регистрировавшиеся с периодичностью в 1 год, совпадали качественно и количественно и имели вид, представленный на Рис. 1 а. Данный факт свидетельствует о высокой стабильности препарата декаметоксина.

ВИМС масс-спектры препарата, хранившегося с нарушением условий (метод (II)), и зарегистрированные через 1 и 2 года, представлены на Рис. 1 б, в, соответственно. Сравнение Рис. 1 а, б и в позволяет заметить количественные изменения в распределении интенсивности ряда пиков, увеличивающиеся со временем, что указывает на постепенную деградацию исходного препарата.

На Рис. 2 приведена зависимость ПИТ для ВИМС масс-спектров раствора декаметоксина в глицерине, полученных при непрерывной бомбардировке образца ионами Cs^+ в течение 40 минут (метод (III)). Из данного графика следует, что наиболее стабильное распыление ионов происходит в интервале 5-15 минут после начала бомбардировки образца; далее наблюдается монотонное падение ПИТ.

На Рис. 3 а-в представлены ВИМС спектры, зарегистрированные через 10, 25 и 35 минут после начала бомбардировки (см. Рис. 2). Спектр на Рис. 3 а количественно совпадает со спектром на Рис. 1 а, полученным для другого образца через 5 минут после начала измерений, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости спектров и их стабильности в первые 10-15 минут (достаточных для проведения качественного и количественного анализа чистого препарата). При дальнейшем увеличении времени экспозиции становится заметной деградация образца, причины и направления которой будут обсуждаться ниже.

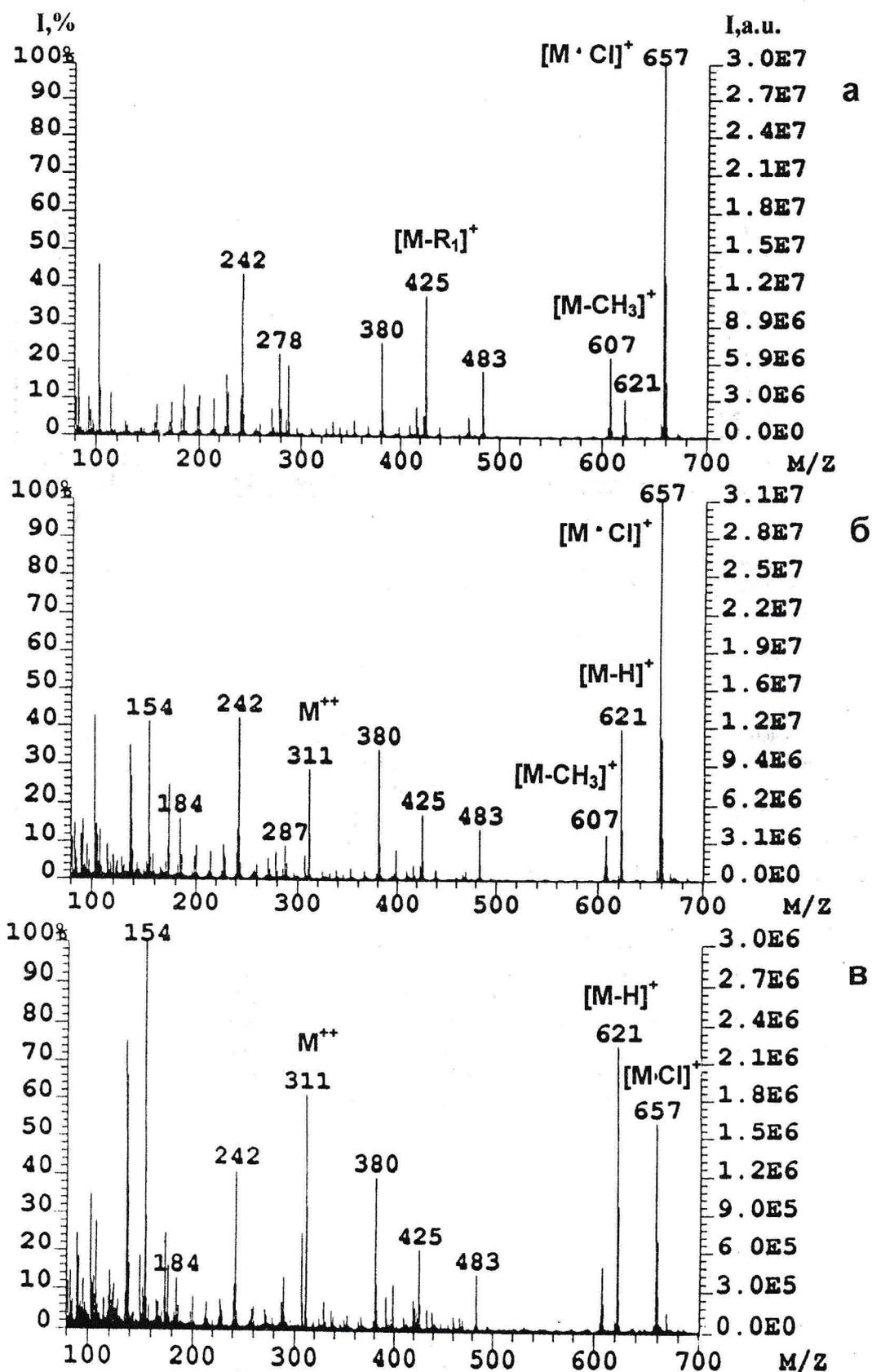


Рис. 1 Масс-спектры ВИМС препарата декаметоксина, хранившегося в течение трех лет соблюдением правил хранения (а) и при нарушении этих правил (см. «Материалы и методы») в течение одного года (б) и двух лет (в).

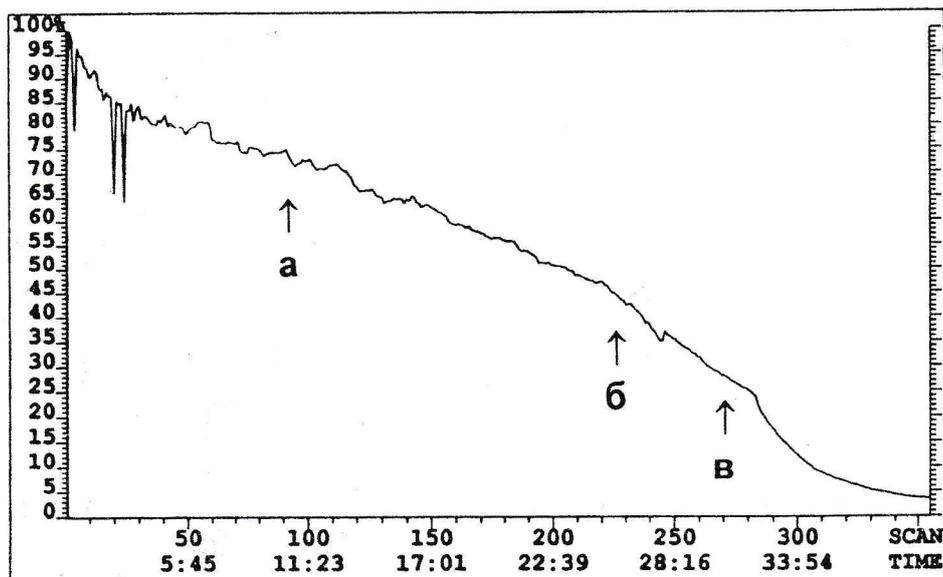
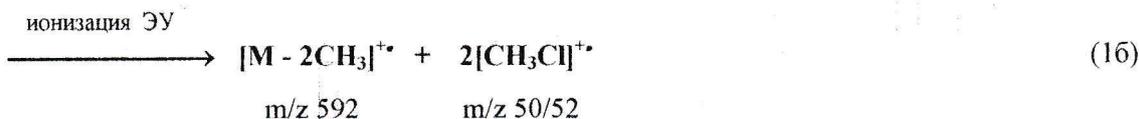


Рис. 2. Зависимость полного ионного тока ВИМС масс-спектров глициринового раствора декаметоксина от времени облучения образца ионами Cs^+ . Стрелками отмечены точки, которым соответствуют спектры, приведенные на Рис. 3 а, б, в.

Следует отметить, что декаметоксин является поверхностно-активным веществом, что находит отражение в его жидкостных ВИМС спектрах в форме полного подавления ионов, соответствующих использовавшимся жидким матрицам [8].

Распыление ионов из жидкой матрицы в методе ВИМС обеспечивает достаточно мягкие условия ионизации и образование молекулярных и квазимолекулярных ионов исследуемых веществ [6-8]. ВИМС, как и другие десорбционные методы, отличается высокой селективностью к так называемым «готовым» ионам. Однозарядный комплекс дикатона с противоионом хлора $[\text{M} \cdot \text{Cl}]^+$, m/z 657, является квазимолекулярным ионом декаметоксина. Он обладает наибольшей интенсивностью в спектре исходного препарата; большинство менее интенсивных пиков в спектре относятся к его фрагментам (Рис. 1 а, 3 а). Высокая интенсивность квазимолекулярного иона свидетельствует о заметной стабильности молекулы декаметоксина в условиях ВИМС.

Перейдем теперь к рассмотрению возможных путей деградации декаметоксина. Известно, что класс солей четвертичного аммония, к которому относится декаметоксин, отличается термической нестабильностью. Основные направления термодегradации соединений данного класса связаны с так называемой декватернизацией: превращением четвертичного аммония в третичный амин путем деалкилирования с элиминированием галогеналкила [4, 5, 11]. Продукты термодеструкции обладают высокой летучестью, могут быть легко переведены в газовую фазу и зарегистрированы с помощью газозонного метода ионизации, например ЭУ. При нагреве кристаллического образца декаметоксина до 90°C такими продуктами являются [10]:



Отщепление наименьшего алкильного радикала является наиболее выгодным процессом [11], однако возможно деалкилирование с отрывом R_1 и R_2 радикалов. Отметим, что в данном случае наблюдается полная декватернизация двух четвертичных групп.

Специфические особенности метода ВИМС позволяют наблюдать термодегradацию препарата в растворе (жидкой матрице). К настоящему времени механизмы образования ионов в жидкостном ВИМС изучены достаточно полно [6-8]; известно, что в зоне удара бомбардирующей частицы в матрице

Стабильность дикатиона декаметоксина ...

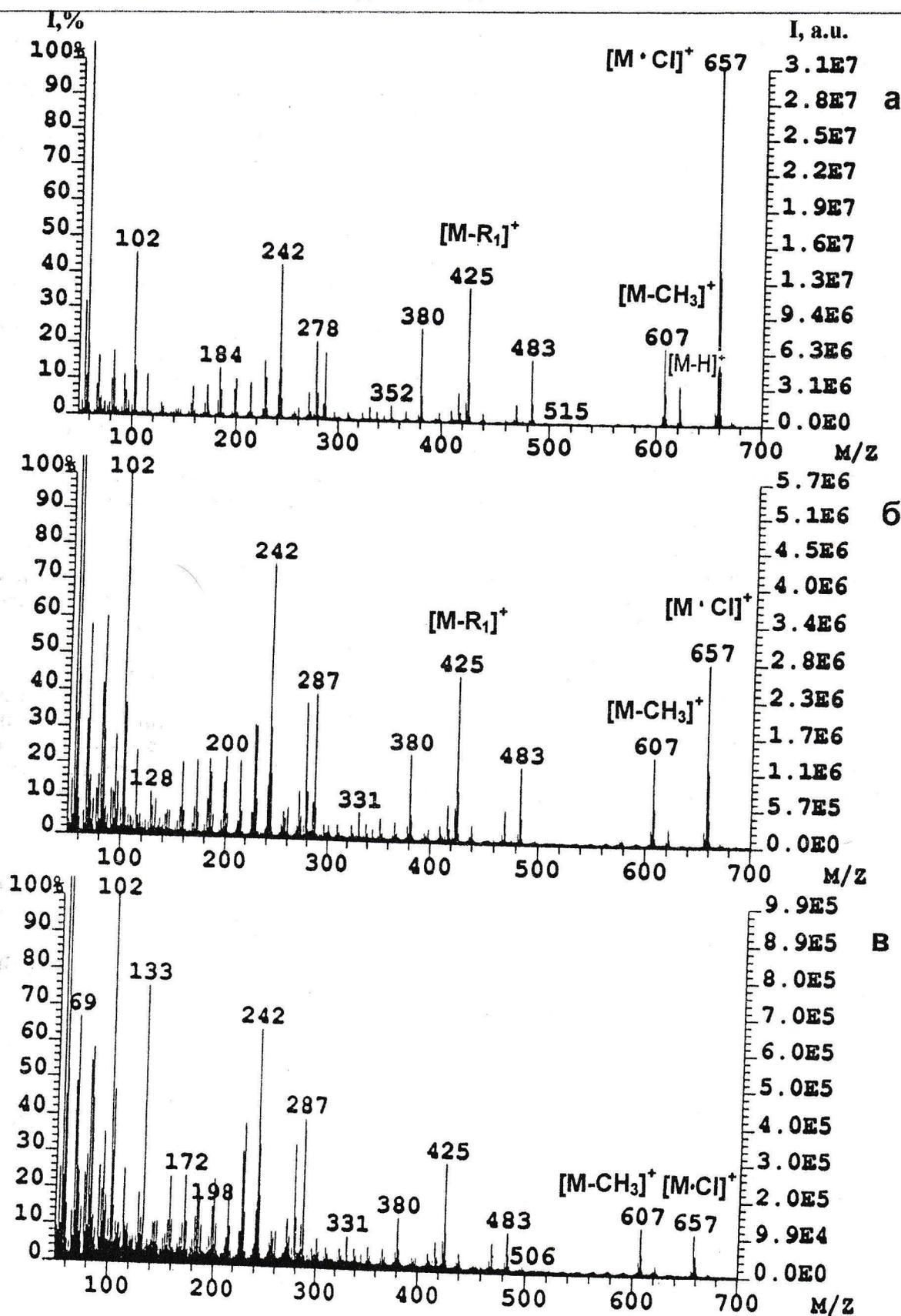
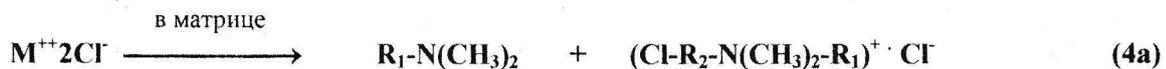


Рис. 3 ВИС масс-спектры раствора декаметоксина в глицерине, соответствующие трем точкам ионной хроматограммы, приведенной на рис.2, и зарегистрированные через а) 10 мин.; б) 25 мин.; в) 35 мин. после начала бомбардировки образца ионами Cs⁺.

образуется так называемое горячее пятно [6], в котором значительная часть кинетической энергии первичного иона трансформируется в энергию термического возбуждения образца. Однако лишь небольшой процент молекул из этой зоны переходит из матрицы в газовую фазу в виде молекулярных ионов [8]; часть молекул разлагается за счет теплового воздействия и некоторых других процессов, индуцированных бомбардировкой. Продукты разложения, как правило, сублимируют с поверхности в нейтральном состоянии или диффундируют вглубь матрицы и не загрязняют спектр [6]. В случае поверхностно-активных веществ продукты термодегградации могут накапливаться в поверхностном слое.

Продукты, образовавшиеся на локальном участке (пятне диаметром около 10 нм) поверхности, могут быть распылены как индивидуальные вещества при попадании в ту же зону следующей бомбардирующей частицы. Теоретические оценки показывают, что при плотности ионного потока порядка 10^{-4} ионов/сек · нм² такое событие (повторный удар) происходит примерно через 8 минут [3]. Это означает, что в первый десяток минут после начала бомбардировки ионы распыляются преимущественно с неповрежденных участков поверхности и соответствуют чистому исследуемому веществу. При превышении этого временного лимита в спектре должны появляться продукты реакций индуцируемых бомбардировкой, что хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей работе для декаметоксина (Рис. 3 б). Дальнейшее увеличение времени бомбардировки приводит к увеличению концентрации продуктов разложения на поверхности (Рис. 3 в). Следует отметить, что термическое возбуждение микроскопической зоны образца является наиболее весомым следствием взаимодействия бомбардирующей частицы с образцом, что позволяет делать, по крайней мере, качественные выводы о путях термодегградации исследуемого вещества в растворе.

Как было указано выше, одним из основных направлений термодегградации солей аммония является декватернизация. Для бисчетвертичных соединений полная декватернизация проходит по реакции (1а), однако ее нейтральные продукты не подвергаются реионизации в условиях ВИМС и в спектрах не регистрируются. В случае декаметоксина достаточно большое расстояние между двумя четвертичными азотами позволяет последним реагировать на локальное термическое воздействие отдельно и независимо, т. е. декватернизация может подвергаться только один из четвертичных азотов. Сохранение заряда на втором азоте обеспечивает возможность регистрации таких «готовых» ионов методом ВИМС (заметим, что моночетвертичная соль также обладает поверхностно-активными свойствами). В принципе, возможны три основных пути декватернизации (в горячем пятне) с отщеплением трех углеводородных радикалов (CH_3 , R_1 , R_2) в комплексе с Cl^- (реакции типа (а)), ионные продукты которых распыляются при повторном попадании бомбардирующей частицы в поврежденную зону (реакции типа (б)):



На Рис. 4 приведены кривые, иллюстрирующие временные зависимости изменения интенсивности ряда пиков в масс-спектрах, соответствующих некоторым продуктам термодегградации. Степень увеличения интенсивности иона с $m/z \ 242$ со временем наиболее высока в сравнении с другими ионами (Рис. 3, 4), поскольку в его образование может вносить вклад не только реакция (4 б), но и продукты фрагментации других ионов, проходящей посредством разрыва связи $\text{N}-\text{R}_2$, сопровождающегося переносом водорода [11].

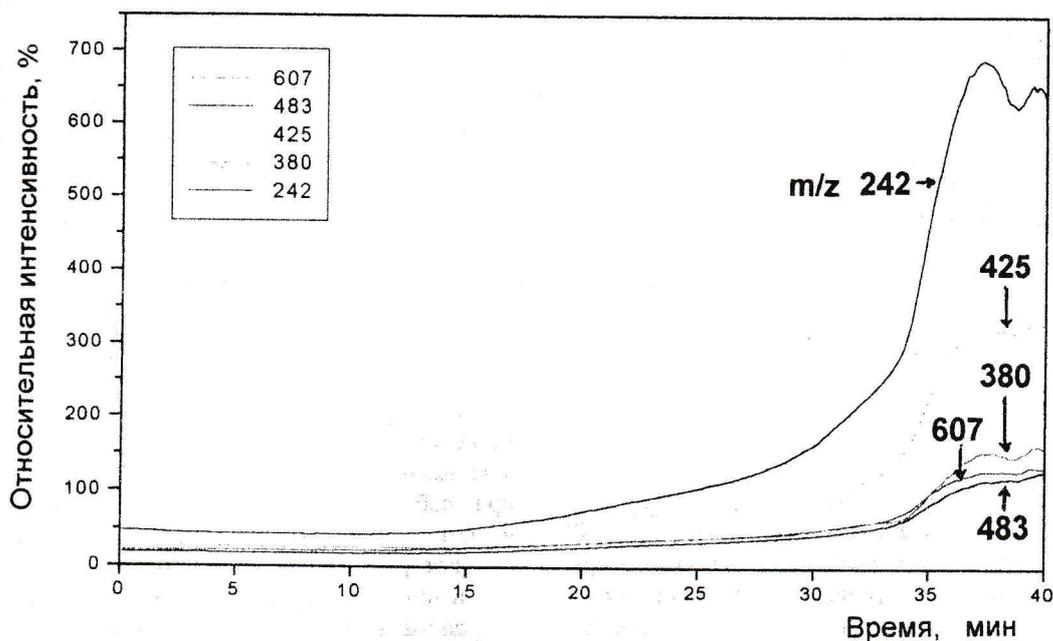


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности (определяемой как отношение интенсивности пика данного иона к интенсивности пика квазимолекулярного иона $[M \cdot Cl]^+$) ряда ионов в спектрах ВИМС, соответствующих продуктам термодегградации декаметоксина, от времени бомбардировки его раствора в глицерине ионами Cs^+ .

Следует отметить, что ионы с m/z 607, 425, а также m/z 416/418 присутствуют и в спектрах чистого (неповрежденного) препарата (Рис. 1 а, 2 а); в этих спектрах они соответствуют фрагментам, образующимся при распаде квазимолекулярного иона M^+Cl^- в газовой фазе по путям, совпадающим с путями термодегградации:



Таким образом, названные пики представляют собой суперпозицию ионов, относящихся к продуктам фрагментации (интенсивность которых, как следует из Рис. 4, практически постоянна в первые 15-20 минут) и продуктам термической деградации; вклад последних и определяет увеличение интенсивности данных пиков со временем (Рис. 4).

Что касается препарата, хранившегося в неправильных условиях, то в его спектрах (Рис. 1 б) также наблюдается заметное возрастание интенсивности ряда пиков (по сравнению со спектром исходного препарата, Рис. 3а). Однако тип соответствующих им ионов качественно отличается от ионов, вклад которых увеличивается при термической обработке препарата. Эти пики соответствуют двухзарядному дикатиону M^{++} , m/z 311, и продукту $[M-H]^+$, m/z 621. Характер этих пиков позволяет предположить, что при длительном хранении противоионы хлора неким путем (механизмы которого требуют дальнейшего изучения) удаляются из кристаллического препарата. При растворении в матрице и последующих процессах, индуцированных ВИМС, в матрице наблюдается недостаток противоионов для комплексообразования, что приводит к увеличению интенсивности пика интактного дикатиона M^{++} . Можно предположить, что элиминирование HCl (в процессе хранения) дает однозарядный продукт $[M-H]^+$. Большинство других пиков в спектрах на Рис. 3 б, в соответствии с фрагментами, качественно совпадающим с наблюдаемыми в спектре исходного препарата (Рис. 3 а). Заметно также увеличение интенсивности ряда пиков в области малых масс, свидетельствующих о более глубоких превращениях первичных продуктов. Сохранение структуры дикатиона даже при удалении противоионов хлора можно рассматривать как положительный факт в плане стабильности препарата, поскольку биологическое

антибактериальное и фунгицидное действие декаметоксина обусловлено наличием в структуре его молекулы четвертичных азотов.

Интересно отметить, что во многих случаях хранение термически нестабильных препаратов при пониженной температуре лишь замедляет ход реакций разложения, но не меняет их направления. В описанном в данной работе случае при хранении декаметоксина при пониженной температуре (но с нарушением других условий) обнаружено нарушение стехиометрии состава соли и изменения, качественно отличающиеся от термодеструкции. Можно предположить, что разложение в данном случае происходило под влиянием света (попадавшего на препарат в ограниченных количествах при открытии холодильника) или при взаимодействии препарата с материалом пластмассового сосуда. Установление природы этих реакций требует дальнейших дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

Проведенные в настоящей работе исследования показывают, что препарат декаметоксина характеризуется достаточно высокой стабильностью. Отсутствие качественных и количественных изменений в ВИМС масс-спектрах декаметоксина, периодически снимавшихся в течение трех лет, указывает на практическое отсутствие деградации препарата при соблюдении рекомендованных условий его хранения. Данные масс-спектрометрии с ЭУ позволяют установить летучие продукты разложения кристаллического препарата декаметоксина при нагреве, которые представляют собой третичные амины и хлорметил, образующиеся в реакции декватернизации четвертичной соли. Использование эффекта локального разогрева поверхности матрицы при бомбардировке ее ускоренными частицами в условиях жидкостного ВИМС позволяет проследить динамику термодegradации препарата в растворе. В отличие от кристаллического образца, в растворе возможно частичное разложение бисчетвертичного соединения, а именно декватернизация одного из двух четвертичных азотов. Достаточно неожиданным оказался обнаруженный характер деградации препарата при нарушении режимов его хранения: значительное повышение интенсивности пика дикатиона в ВИМС спектрах указывает на изменение стехиометрии соли за счет уменьшения содержания противоионов хлора в кристаллическом образце; структура дикатиона, однако, не претерпевает при этом заметной модификации. Таким образом, пути термической деградации декаметоксина и пути его разложения при неправильном хранении качественно различаются. Высокая стабильность квазимолекулярного иона декаметоксина в условиях ВИМС позволяет использовать этот метод в дальнейших исследованиях невалентных взаимодействий декаметоксина с его мишенями в бактериальных клетках и идентификации его супрамолекулярных комплексов с биомолекулами.

БЛАГОДАРНОСТИ: Проведение данных исследований стало возможным благодаря межкаademicской программе научного обмена между Украинской и Венгерской Национальными Академиями наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР, 11-е изд., доп. М. Медицина, 1987. 336 с.
2. Siuzdak G. Mass Spectrometry for Biotechnology. New York. Academic Press, 1996. 161 p.
3. Галль Л.Н., Туркина М.Я. // Успехи химии. 1985. Т. 54. С. 741-764
4. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М. Химия, 1986. 312 с.
5. Терентьев П.Б., Станкявичус А.П. Масс-спектрометрия биологически активных азотистых оснований. Вильнюс. Моклас, 1987. 280 с.
6. Танцырев Г.Д., Баранов Ю.Ф. В сб.: Поверхностные методы ионизации в масс-спектрометрии. Уфа. БФАН СССР. 1986. С.44-57
7. Покровский В.А., Мосин В.Б. // Теорет. и эксперим. химия. 1987. № 1. С. 62-78.
8. Benninghoven A. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1983. V.53. P. 85-99.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - 8-е изд. М. 1978. Ч.2
10. Суходуб Л.Ф., Косевич М.В., Шелковский В.С., Волянский Ю.Л. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т.34. С. 823-827
11. Veith Y.J. // Mass Spectrom. Rev. 1983. V.2. P. 419-446.