

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ставрианиди Андрей Николаевич

**РАЗВИТИЕ МЕТОДОЛОГИИ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО
ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Специальность – 1.4.2 — Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Официальные оппоненты

Григорьев Андрей Михайлович

доктор химических наук

ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны
Российской Федерации, старший научный сотрудник

Савельева Елена Игоревна

доктор химических наук

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены
профпатологии и экологии человека» ФМБА России, зав.
лабораторией

Вирюс Эдуард Даниэлевич

доктор химических наук

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии», ведущий научный
сотрудник

Защита диссертации состоится 17 мая 2023 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/537086409/>

Автореферат разослан «14» марта 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Натуральные продукты (natural products), источниками которых служат растения, морские организмы, а также колонии грибов и микробов, и содержащие их средства традиционной медицины используют для лечения разнообразных заболеваний. Натуральные продукты также используются в качестве структурной основы для разработки новых лекарств. Так, около 50% лекарств, вводимых на рынок в течение последних 20 лет, получают прямо или косвенно из небольших биогенных молекул растительного происхождения. Однако идентификация новых соединений – кандидатов на роль действующих веществ в лекарственных препаратах (drug leads) среди всего многообразия химического состава живых организмов — чрезвычайно сложная задача, требующая применения современных высокоинформативных методов анализа. Одним из самых часто используемых и многофункциональных среди этих методов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрическим (МС) детектированием. ВЭЖХ-МС платформы используют как для поиска лекарственных веществ, так и для контроля качества и безопасности существующих средств традиционной медицины, биологически активных добавок и функциональных продуктов питания. Придя на смену традиционным, включенным в фармакопеи ВЭЖХ-УФ методикам, основанные на ВЭЖХ-МС подходы активно применяются для комплексной оценки химического состава таких объектов. Более того, большие массивы ВЭЖХ-МС данных, генерируемые в случае анализа большого числа биологических образцов, служат источником незаменимой информации при проведении скрининговых, метаболомных, протеомных и других мультидисциплинарных исследований. Извлечением этой информации с помощью различных методов анализа данных и статистических инструментов занимаются как химики-аналитики, так и специалисты по биоинформатике.

В применении метода ВЭЖХ-МС доминируют две парадигмы — целевого (целенаправленного, targeted) и ненаправленного (untargeted, non-targeted) анализа. В целевом анализе, как правило, используют индивидуальные стандартные образцы определяемых соединений, стоимость которых в фитохимических исследованиях очень велика, поскольку их получают препаративным хроматографическим выделением из тех же растительных материалов. Возможности такого подхода ограничены, поскольку в растительных экстрактах содержатся сотни основных и минорных компонентов, однако его преимуществом является обоснованность и достоверность получаемых выводов. Ненаправленный анализ, напротив, предполагает регистрацию как можно большего числа сигналов на хроматограммах каждого образца, интерпретация которых является довольно сложной задачей, что часто приводит к ложной идентификации и, как следствие, ошибочным выводам. Тем не менее, применение статистических методов обработки данных и анализ больших выборок образцов, содержащих достаточное количество биологически одинаковых представителей в каждой исследуемой группе, позволяет выявлять значимо различающиеся сигналы соединений – маркеров, которые впоследствии могут быть выбраны мишенями целевого анализа.

Третьей альтернативой является групповой ВЭЖХ-МС анализ, который позволяет сфокусироваться на обнаружении, идентификации и определении структурно близких соединений. Вторичные метаболиты в растительных объектах традиционно разделяют на фитохимические группы: флавоноиды, кумарины, фенилпропаноиды, стероидные и тритерпеновые гликозиды и т.д., а содержание отдельных соединений из этих групп не всегда коррелирует с общей ценностью и лекарственными свойствами сырья или конечного продукта. Так, например, некоторые сапонины корня женьшеня переходят друг в друга при обработке паром, а их малонил-содержащие предшественники, как правило, расщепляются еще на стадии извлечения.

Таким образом, актуальным является создание новых высокоинформативных способов обнаружения и определения фитокомпонентов в лекарственном растительном сырье и продуктах на его основе методом ВЭЖХ-МС.

Цель диссертационной работы заключалась в создании и развитии методических подходов к извлечению, обнаружению и определению компонентов растительного сырья из разных фитохимических групп с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии для повышения информативности и селективности процедур анализа за счет регистрации сигналов выбранных диагностических ионов и ионных переходов.

Для достижения поставленной цели решали **следующие задачи**:

- Оценить возможности и ограничения применения целевого ВЭЖХ-МС анализа для идентификации и определения соединений – маркеров в растительных материалах;
- Разработать способ оптимизации условий группового извлечения фитокомпонентов из растительных материалов и клеточных культур;
- Изучить масс-спектрометрическое поведение исследуемых групп гликозидов в условиях электрораспылительной ионизации и диссоциации, индуцированной соударениями, и выявить закономерности фрагментации и диагностические фрагментные ионы, позволяющие обнаруживать принадлежащие этим группам соединения на масс-хроматограммах;
- Разработать алгоритмы обработки исходных ВЭЖХ-МС данных для выделения характеристичных групповых сигналов и сравнения хроматографических «отпечатков пальцев» образцов, содержащих определяемые группы соединений;
- Разработать способы разделения и определения групп фитокомпонентов с общим агликоном методом количественного ВЭЖХ-МС анализа многокомпонентной системы;
- Разработать схемы выделения индивидуальных агликонов для идентификации и оценки суммарного содержания соответствующих гликозидов в условиях проведения гидролиза исследуемых объектов.

Научная новизна. Созданы новые методические подходы к извлечению и ВЭЖХ-МС обнаружению и определению компонентов растительного сырья из разных фитохимических групп, обеспечивающие повышение информативности и селективности процедур анализа.

Унифицирован предложенный ранее автором способ обнаружения и групповой идентификации сапонинов, основанный на регистрации образующихся в источнике электрораспылительной ионизации характеристичных сигналов фрагментных ионов, образующих паттерн фрагментации сапогенина, для групп тритерпеновых и стероидных соединений женьшеня, солодки, абруса, диоскореи и якорцев.

Предложен способ построения, обработки и сопоставления масс-хроматограмм по сигналам выбранных характеристичных фрагментных ионов, образующихся в источнике ионизации, использование которых в качестве «отпечатков пальцев» может применяться для контроля качества исследуемых растительных материалов.

Предложен способ предобработки и преобразования трехмерных массивов ВЭЖХ-МС данных низкого разрешения для выявления характеристичных групповых сигналов фрагментных ионов и кластеризации образцов путем тензорного разложения по методу параллельного факторного анализа (ПФА, PARAFAC), который апробирован на модельном наборе образцов индивидуальных экстрактов абруса, женьшеня и солодки и их смесей, а также образцах чая с добавками этих растений.

Предложены способы оптимизации группового извлечения стероидных гликозидов, сахаров и полиолов (сахароспиртов) с использованием параметра D_n (групповой выход) и схем

экспериментального дизайна Тагучи, позволяющие одновременно с высокой эффективностью извлекать полярные и менее полярные компоненты, принадлежащие этим группам. Показано, что в выбранных оптимальных условиях ультразвуковой экстракции групповой выход при извлечении протодиосцина и диосцина из растительного материала и клеточной культуры диоскореи дельтовидной достигает 98-99%. Аналогичный подход позволил добиться 96%-го группового извлечения сахароспиртов и сахаров из хвои.

Изученный методами ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МСВР и ЯМР-спектроскопии состав гликозидной фракции, выделенной из женьшеневого улуна, позволил идентифицировать ранее не описанные производные абрусогенина.

Выявлены условия высокоселективного группового разделения протопанаксатриольных и протопанаксадиольных сапонинов женьшеня на силикагелевом сорбенте с пентафторфенильными группами при градиентном элюировании ацетонитрилом и водой с добавлением муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы.

Предложены оригинальные способы группового определения тритерпеновых и стероидных сапонинов в экстрактах из женьшеня и якорцев стелющихся, соответственно, позволяющие сократить расход индивидуальных стандартных образцов благодаря стабильности относительных факторов отклика, рассчитываемых по площадям пиков на масс-хроматограммах по сигналам диагностических фрагментных ионов.

Предложен способ оценки группового состава протопанаксадиольных (ППД), протопанаксатриольных (ППТ) и окотиллольных (ОТ) сапонинов женьшеня на основе гидролиза с последующим ВЭЖХ-МС определением их агликонов. Показано, что, в отличие от гидролиза в кислой среде, где происходит циклизация в боковой цепи агликонов и образование многочисленных побочных продуктов, щелочной гидролиз с метилатом натрия в среде ацетонитрила позволяет достичь количественного выхода агликонов разной структуры.

Практическая значимость:

Предложены способы:

- скринингового определения 52 маркеров качества в экстрактах из лекарственного растительного сырья методом ВЭЖХ-МС в режиме мониторинга заданных реакций (МЗР) с пределами их обнаружения в диапазоне 0.2 – 43 нг/мл;
- сравнения групповых хроматографических профилей компонентов, построенных по сигналам диагностических фрагментных ионов, позволивший обнаружить отличия в профилях гликозидов, отвечающих за сладкий вкус и аромат продуктов и препаратов на основе женьшеня, солодки и абруса молитвенного. Коэффициенты корреляции для образцов одной группы при этом превышали 0.7;
- обработки исходных ВЭЖХ-МС данных низкого разрешения, включающий устранение шумов, выравнивание шага для шкалы времени и шкалы m/z , с последующим разложением по методу ПФА, позволивший выявить сигналы групп гликозидов, характеристичных для проанализированных образцов растительных экстрактов. Применение разработанного подхода позволило уточнить качественный состав образцов коммерческого продукта – ароматизированного улуна;
- полного ($R > 98\%$) извлечения стероидных сапонинов (диосцина и протодиосцина) из надземных частей растений якорцы стелющиеся и диоскорея дельтовидная с использованием экстракции кипящим растворителем при нормальном и пониженном давлении, а также в аппарате Сокслета;
- быстрого и максимального группового извлечения ($D_2 > 99\%$) ультразвуковой экстракцией стероидных сапонинов из культуры клеток растения диоскорея дельтовидная;

- группового извлечения сахаров и сахароспиртов ($R = 94 \pm 8 \%$) из хвои растений разных видов из 5 самых распространенных на территории Российской Федерации родов хвойных деревьев;
- одновременного определения 17 сахаров и сахароспиртов методом гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга выбранных ионных реакций с пределами их обнаружения от 0.1 до 20 нг/мл;
- ВЭЖХ-МС-КАМС определения гинсенозидов женьшеня, который позволял многократно снизить затраты на приобретение индивидуальных стандартных образцов соединений. Стабильность относительных факторов отклика на разных приборах варьировалась в пределах от 5 до 20% в зависимости от определяемого соединения. Относительная ошибка метода (в сравнении с методом внешнего стандарта) при проведении измерений не превышала 13% на одном приборе, и 17% в максимально близких условиях определения на трех разных приборах;
- ВЭЖХ-МС-КАМС определения стероидных сапонинов якорцев стелющихся. Пределы обнаружения составили от 5 до 20 нг/мл. Относительная ошибка метода была на уровне 5 – 10%;
- определения валового группового содержания гинсенозидов ППТ, ППД и ОТ типов в растительных материалах на основе женьшеня с использованием щелочного гидролиза метилатом натрия в среде ацетонитрила с последующим ВЭЖХ-МС определением образующихся агликонов. Выход реакции гидролиза для индивидуальных гинсенозидов составил 85 – 95%.

На основании интерпретации сигналов в масс-спектрах ЭРИ с использованием линейной ионной ловушки предложены фрагментарные-формулы гликозидов, входящих в состав женьшеня, солодки, абруса молитвенного, якорцев стелющихся, и диоскореи дельтовидной, которые позволяют расширить число определяемых соединений для комплексной оценки качества средств традиционной медицины на их основе. В составе находящегося в свободной продаже по всему миру ароматизированного женьшеневого чая (улуна) идентифицированы компоненты, относящиеся к группе тритерпеновых гликозидов абруса молитвенного.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) В унифицированных условиях селективного целевого ВЭЖХ-МС скрининга в режиме МЗР возможно определение биомаркеров, относящихся к разным фитохимическим группами и используемых для контроля качества аптечных образцов растительных материалов.
- 2) Построение хроматограмм по выделенным сигналам диагностических фрагментных ионов, образующихся в источнике ионизации, с последующим объединением обнаруженных пиков в единый вектор данных позволяет выявлять образцы, содержащие одинаковые группы компонентов, по величине индекса совпадения и линейного коэффициента корреляции.
- 3) Предложенный алгоритм предобработки исходных ВЭЖХ-МС данных низкого разрешения с последующим тензорным разложением по методу ПФА позволяет выявить характеристичные для групп образцов экстрактов из растительных материалов наборы хроматографических пиков и сигналов в масс-спектрах.
- 4) Использование параметра D_n , рассчитываемого как среднее геометрическое нормированных площадей хроматографических пиков, при оптимизации условий ультразвуковой экстракции позволяет достичь высоких степеней извлечения одновременно для группы соединений.

- 5) Использование диагностических фрагментных ионов и групповых реперных соединений при проведении ВЭЖХ-МС определения методом количественного анализа многокомпонентной системы позволяет получить стабильные значения относительных факторов отклика.
- 6) Проведение щелочного гидролиза с метилатом натрия в ацетонитриле приводит к образованию агликонов гинсенозидов в качестве основных продуктов, количества которых могут быть измерены в выбранных ВЭЖХ-МС условиях для оценки суммарных содержаний этих соединений в исследуемых объектах.

Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается анализом значительного объема экспериментальных наблюдений, выполненных современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам, а также данными результатов практической апробации. Научные положения, выводы и рекомендации подкреплены убедительными теоретическими и экспериментальными данными, наглядно представленными в диссертации в приведённых таблицах и рисунках. Обработка и статистический анализ данных, а также интерпретация полученных результатов проведены с использованием современного программного обеспечения.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2 – Аналитическая химия по областям исследований: - методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс- спектрометрия, и др.); - методическое обеспечение химического анализа; - математическое обеспечение химического анализа. - анализ природных веществ; - теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии.

Апробация результатов исследования. Основные результаты работы представлены на следующих международных и российских конференциях: Всероссийских конференциях с международным участием "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы" (Москва 2013, 2015, 2017, 2019, 2021); Съездах аналитиков России (Москва, 2017, 2022); Всероссийских конференциях по аналитической спектроскопии (Краснодар, 2012, 2019); Всероссийских симпозиумах «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Краснодар, Россия, 2014, 2018, 2021); Всероссийских конференциях по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу (Краснодар, 2013, 2017, 2020); Всероссийской конференции по теории и практике хроматографии (Самара, 2015); Всероссийских симпозиумах с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (Сочи, 2016; Москва, 2019); 8th Annual LC/MS/MS workshop on environmental application and food safety (Барселона, Испания, 2012); 39th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Амстердам, Нидерланды, 2013); 2nd International Conference and Exhibition on Pharmacognosy, Phytochemistry & Natural Products (Пекин, Китай, 2014); 62nd Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Балтимор, США, 2014); International Symposiums on Phytochemicals in Medicine and Food (Китай, 2015, 2018, 2020); XIXth European Conference in Analytical Chemistry “XIX Euroanalysis” (Стокгольм, Швеция, 2017); 23rd International Symposium on Separation Sciences (Вена, Австрия, 2017); 11th International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry “Petromass 2018” (Блед, Словения, 2018); 22nd International Mass Spectrometry Conference (Флоренция, Италия, 2018); 32nd International Symposium on Chromatography (Мандельё-Канны, Франция, 2018); 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Милан, Италия, 2019); Trends in Natural Product Research: PSE Young Scientists’ Meeting on

Biochemistry, Molecular Aspects and Pharmacology of Bioactive Natural Products (Будапешт, Венгрия, 2019); Научные чтения, посвященные 90-летию кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2019).

Публикации. По материалам работы опубликовано 27 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия».

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключался в формулировании цели исследования, постановке задач, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, обобщении результатов работы, а также в подготовке к публикации результатов проведенных исследований. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю, за исключением работ [Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Zlobin I.E., Sarvin B.A., Stavrianidi A.N., Kuznetsov V.V. // Environ. Exp. Bot. 2019. V. 157. P. 151–160], [Zlobin I.E., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Sarvin B.A., Stavrianidi A.N., Kreslavski V.D. // Photosynth. Res. 2019. V. 139. № 1-3. P. 307–323], [Суханов А.Е., Ставрианиди А.Н., Крылов И.А. // Фармация. 2022. Т. 71. № 6. С. 5–11], в которых вклад автора состоял в выполнении анализа и обработке результатов, а также подготовке результатов к публикации. Все экспериментальные исследования были проведены, используя ресурсы и оборудование лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (зав. лаб. Шпигун О.А.).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, четырех экспериментальных глав, заключения, общих выводов, списка использованных сокращений, списка использованной литературы и трех приложений. Работа изложена на 340 страницах машинописного текста (включая приложения), содержит 128 рисунков и 77 таблиц. Библиографический список включает 372 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Применение метода жидкостной хроматомасс-спектрометрии в фитохимическом анализе

В первой главе в формате литературного обзора в соответствующих разделах приведено описание трех основных этапов ВЭЖХ-МС анализа растительных материалов: извлечение групп фитоконпонентов, сбор данных и их обработка с целью извлечения полезной химической информации об отдельных компонентах и о групповом составе физиологически активных соединений.

В качестве способов извлечения представлены наиболее распространенные традиционные (мацерация/кипячение в органических растворителях, экстракция в аппарате Сокслета) и современные (ультразвуковая, микроволновая, сверхкритическая и ускоренная давлением растворителя экстракция) варианты экстрагирования циклитолов, фенольных соединений и сапонинов из различных растительных материалов, поскольку именно этим классам фитоконпонентов уделяется наибольшее внимание в последующих главах работы. Описаны преимущества и недостатки этих способов извлечения и показаны ограничения и области их применения.

Во втором параграфе детально рассмотрен процесс идентификации и структурного охарактеризовывания фитоконпонентов с использованием ВЭЖХ-МС данных. Для некоторых классов составных соединений растительного происхождения с установленными

закономерностями фрагментации, имеющих линейную или древовидную структуру, например гликанов, может быть предложена схема *de novo* идентификации аналогично тому, как это осуществляется для пептидов и белков в протеомном анализе. Стоит отметить, что для идентификации потенциальных субструктур из МСⁿ спектров неизвестных соединений могут быть использованы как древа фрагментов, так и древа потерь. Для тех природных соединений, закономерности фрагментации которых не до конца установлены или описаны в литературе в виде разрозненных данных, должна быть применена процедура дерепликации. Дерепликацией называют быструю идентификацию уже известных, ранее структурно охарактеризованных соединений. Эта процедура необходима для того, чтобы не тратить время и ресурсы на повторную идентификацию уже известных молекул и сосредоточиться на новых веществах. В случае если целью является идентификация новых структурных аналогов из интересующих групп фитокомпонентов, предварительная групповая идентификация (дерепликация) может быть применена для частичного описания структуры обнаруженного соединения и его отнесения к тому или иному классу на основе общих сигналов (диагностических фрагментных ионов или диагностических нейтральных потерь) или общих закономерностей фрагментации. В таком случае структуры соединений могут быть представлены в виде фрагментарных формул, детализация которых зависит от информативности зарегистрированных масс-спектров и естественных ограничений метода (например, невозможности различать некоторые виды изомеров). Приведены примеры проведения дерепликации для разных групп соединений с подробным описанием условий проведения анализа и обработки его результатов. Показаны способы повышения информативности за счет использования хроматографических, спектрофотометрических и ЯМР данных в дополнение к ВЭЖХ-МС данным. А также описан предикативный скрининг метаболитов как инструмент систематизации для выявления большего числа ожидаемых структурных аналогов («known unknowns»).

В третьем параграфе кратко описаны два основных подхода к целевому обнаружению и определению фитокомпонентов методом ВЭЖХ-МС – скрининг в режиме мониторинга заданных реакций (МЗР) в варианте МС низкого разрешения и селективного ионного мониторинга (СИМ) по точным моноизотопным *m/z* сигналам целевых соединений в варианте МС высокого разрешения.

В четвертом параграфе описаны основные достижения в области ненаправленного анализа натуральных продуктов. Перечислены основные стадии проведения ненаправленного метаболического профилирования, при этом особое внимание уделено обработке больших массивов получаемой информации. Описаны основные режимы сбора данных, включая информационно зависимый анализ с динамическим исключением, информационно независимый анализ и др., а также базы данных (БД) и программы, применяемые для выявления и идентификации интересующих метаболитов. Собраны примеры проведения такого исследования для модельного растения *Arabidopsis* и других растительных материалов. Показаны способы повышения информативности за счет использования изотопного разбавления в процессе подготовки образцов, а также двумерной хроматографии и комбинации с ЯМР спектроскопией.

В пятом параграфе отдельно рассмотрен вопрос о возможности прямого решения задачи кластеризации/классификации исследуемых образцов без использования индивидуальных стандартов на основе данных прямого МС и ВЭЖХ-УФ-МС анализа. Описаны примеры использования различных алгоритмов машинного обучения (МГК, МЧНК-ДА и др.) и глубокого обучения (нейронные сети автоэнкодеры). Одним из основных преимуществ использования машинного обучения в распознавании ЖХ-МС «отпечатков пальцев» является возможность определить происхождение исследуемого объекта и/или его место в иерархии/семействе других объектов и даже предсказать некоторые его свойства. Основными препятствиями при реализации

таких методик являются неопределенность характера полученных ложноположительных и ложноотрицательных результатов и низкая воспроизводимость полученных «отпечатков пальцев» в межлабораторных условиях.

В шестом параграфе рассмотрены основные аналитические процедуры, применяемые для группового анализа: мониторинг диагностических ионов и нейтральных потерь, фильтрация по дефекту массы, построение молекулярных сетей. Все эти методы помогают обнаруживать близкие, структурно родственные соединения, дерепликацию основных фрагментов которых можно пропагандировать во всех полученных масс-спектрах, оптимизируя тем самым трудозатраты на поиск интересующих структурных аналогов, потенциально обладающих заданными свойствами.

В седьмом и восьмом параграфах приведены предложенная автором классификация и описание отдельных аналитических процедур, направленных на получение и обработку ВЭЖХ-МС данных, которые могут быть использованы в качестве составных частей при «сборке» используемой аналитической стратегии для решения той или иной задачи анализа растительных объектов. Указаны две наиболее часто применяемые комбинации из описанных в предшествующих параграфах подходов: ненаправленное профилирование метаболитов с последующей аннотацией пиков с помощью БД; разделение обнаруженных соединений на классы (или группы) с последующим анализом паттернов фрагментации и предварительной идентификацией структурно родственных соединений.

Таким образом, при всем многообразии приборного обеспечения и режимов работы современных аналитических инструментов, решение поставленных задач в области фитохимического анализа требует применения продуманной, последовательной и наименее ресурсозатратной стратегии.

Глава 2. Оборудование, материалы, техника эксперимента

Во второй главе перечислены реагенты, материалы и аналитические приборы, использованные в работе, а также описана техника проведения экспериментов.

Большая часть экспериментов была проведена с использованием ВЭЖХ-МС системы, состоящей из гибридного тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора AB Sciex QTrap 3200 (Канада) с линейной ионной ловушкой, оснащенного источником ионизации электрораспылением; и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (США). Обработку данных проводили с помощью Analyst 1.5.1.

Разделение проводили на следующих хроматографических колонках: Acclaim 120 Å C18 (150 × 3 мм, 3 мкм) (Thermo Scientific, США), Acclaim 120 Å C18 (150 × 2,1 мм, 2,2 мкм) (Thermo Scientific, США), Hypersil GOLD aQ (150 × 2,1 мм, 3 мкм) (Thermo Scientific, США), Hypersil Gold C8 (150 × 2,1 мм, 5 мкм) (Thermo Scientific, США), Hypersil Gold PFP (150 × 2,1 мм, 3 мкм) (Thermo Scientific, США), Cosmosil cholester (100 × 20 мм, 2,5 мкм) (Nacalai Tesque, Япония), HILIC Asahipak NH2P-40 2D (2.0 × 150 мм, 4.0 мкм) (Shodex, Япония), Supelcosil LC18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) (Sigma Aldrich, Германия).

Индивидуальные стандартные образцы исследуемых соединений приобретены в PhytoLab GmbH (Германия), Chromadex (США), Supelco (США), Sigma-Aldrich (Германия) и Carbosynth (Англия).

Глава 3. Определение биомаркеров для контроля состава растительного сырья и продуктов на его основе

Третья глава посвящена созданию системы целевого ВЭЖХ-МС обнаружения и определения известных маркерных соединений в образцах аптечных лекарственных растительных материалов. Традиционно для определения этих соединений используют ТСХ и

ВЭЖХ с УФ-детектированием, однако при этом часто игнорируют пики структурных аналогов и изомеров, стандарты которых отсутствуют в лаборатории или отсутствуют в продаже. Использование ВЭЖХ-МС не только облегчает задачу хроматографического разделения компонентов экстрактов, но и позволяет обнаружить характеристические маркеры отдельных лекарственных трав в составе сложных препаратов и функциональных продуктов питания, когда время удерживания уже не может являться достоверным идентификационным признаком из-за высокой «заселенности» хроматограмм.

На первой стадии разработки ВЭЖХ-МС методик необходимо определиться с выбором таких соединений-маркеров. Изначально экстракты из растительных материалов фракционировали, обнаруживали и выбирали компоненты с наибольшим содержанием, являющиеся основными представителями той или иной фитохимической группы веществ. Лекарственные свойства экстракта зачастую связывали именно с этими компонентами, особенно если удавалось накопить их в достаточном количестве, чтобы исследовать в качестве отдельного препарата и подтвердить их биоактивность. Позднее именно такие компоненты и становились маркерами качества для данного вида растительного сырья, а для контроля их содержания, а, следовательно, и качества сырья, предлагались хроматографические и другие методики анализа. В свою очередь, стандартные образцы этих компонентов таким же образом накапливали в необходимых количествах, выделяя из тех же экстрактов и дополнительно отчищая. Понятно, что с усовершенствованием методов анализа удавалось идентифицировать и выделять все новые компоненты, принадлежащие к тем же фитохимическим группам, что позволило полнее описывать состав и лекарственные свойства изучаемых растений. Постоянно пополняется число доступных в коммерческой продаже стандартов, методики выделения и накопления которых поставлены на поток или воспроизводятся под заказ на нужды конкретных лабораторий. Для разработки новых методик более комплексной оценки качества и лекарственного потенциала растения стараются использовать все доступные стандартные образцы соединений, ранее обнаруженных в его составе. Однако, для быстрого скрининга присутствия тех или иных растений в составе рассматриваемого продукта, число определяемых биомаркеров может быть уменьшено. В настоящей работе на основании литературных данных было выбрано 52 находящихся в свободной продаже маркера для 30 широко распространенных лекарственных растений. Из них 22 соединения являлись характеристическими, поскольку обнаруживаются в одном или нескольких видах растений, например, относящихся к одному роду. Остальные 30 можно использовать как маркеры качества, поскольку они также упомянуты в фармакопейных статьях, однако не позволяют однозначно определять вид растения, особенно при анализе комплексных растительных препаратов. К таким неспецифическим маркерам можно, в частности, отнести распространенные кумарины, флавоноиды и другие фенольные соединения.

Для создания методики целевого ВЭЖХ-МС определения биомаркеров в исследуемом растительном объекте необходимо: 1) выбрать условия МС или МС/МС детектирования; 2) выбрать условия хроматографического разделения; 3) оценить метрологические характеристики; 4) подобрать условия для эффективного извлечения определяемых компонентов, учитывая также, что одна методика может быть адаптирована под разные объекты анализа и условия пробоподготовки могут быть изменены.

Выбор условий МС/МС детектирования соединений-маркеров

На стадии проведения оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования осуществляли подбор параметров, отвечающих за образование и перемещение ионов (потенциал декластеризации (ПД), входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия соударений и др.), а также выбирали ионы-предшественники и фрагментные ионы для МС детектирования в режиме МЗР.

В случае фенольных соединений, например, фенилпропаноидов, таких как розарин, розавин или элеутерозиды масс-спектры получали в режиме регистрации отрицательных ионов, поскольку наблюдали интенсивные сигналы $[M-H]^-$ ионов за счет депротонирования гидроксильных групп, обладающих кислотными свойствами. В масс-спектрах диссоциации, индуцированной соударениями (ДИС), можно обнаружить несколько интенсивных сигналов, предположительно относящихся как к отщепляемым сахаридным остаткам, так и к фенольным фрагментам с депротонированной свободной гидроксильной группой. Аналогичная картина наблюдается для флавоноидных гликозидов, в частности скутелларина и байкалина, в то время как для соединений, не содержащих в своей структуре таких легко уходящих групп как сахара, например, лигнанов или флавоноидов имеющих агликоновую природу (вогонин, байкалеин), в MS^2 спектрах наблюдаются значительно менее интенсивные сигналы. Тем не менее, за счет высокой чувствительности в режиме МЗР ВЭЖХ-МС определение этих компонентов не составляет сложностей, а экстракты из растительных материалов, как правило, приходится разбавлять перед проведением анализа. Критерием выбора оптимальных значений потенциала декластеризации, входного потенциала на нулевом квадруполе масс-спектрометра и энергии соударений являлась максимальная интенсивность получаемых в режиме МЗР сигналов.

Выбор условий хроматографического разделения соединений-маркеров

Зачастую необходимо определять целевые соединения-маркеры, хроматографические пики которых не полностью разделены с пиками их структурных аналогов и изомеров. Применение метода ВЭЖХ-МС позволяет существенно упростить работу по выбору условий хроматографического разделения, поскольку благодаря высокой селективности детектирования в режиме МЗР регистрируются пики только выбранных соединений. Так, на рис. 1 продемонстрированы участки хроматограмм стандартной смеси и растительных экстрактов из семян лимонника китайского, на которых практически отсутствуют какие-либо колебания базовой линии и мешающие пики.

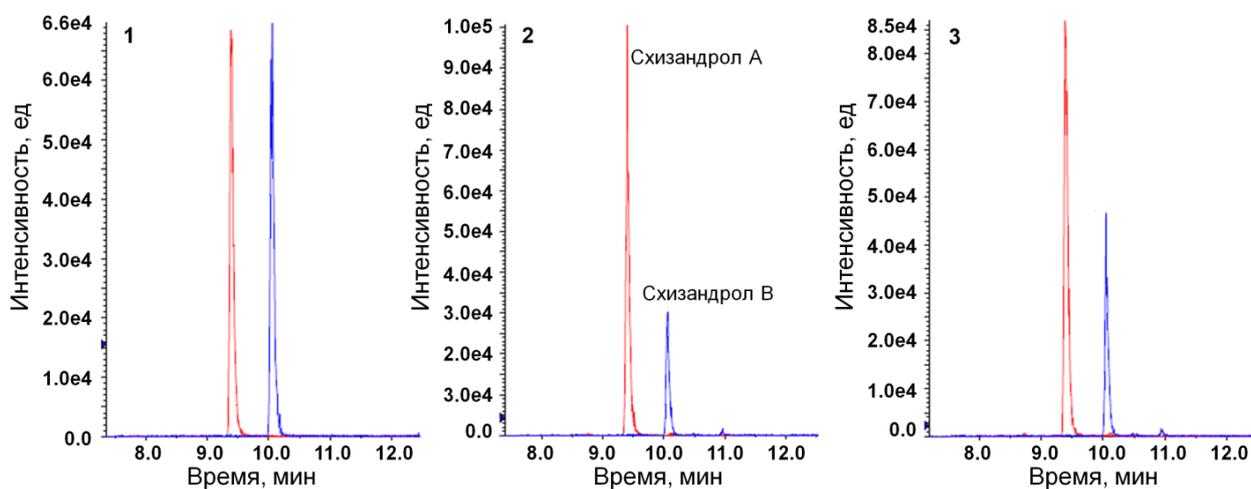


Рисунок 1 – Масс-хроматограммы стандартного раствора с содержанием схизандролов А и В 0.9 и 0.5 мкг/мл, соответственно — 1; сконцентрированной водной вытяжки — 2 и спиртового экстракта из измельченных семян *S. chinensis* — 3, полученные в режиме МЗР: m/z 433 \rightarrow 415 для схизандролов А (красный) и m/z 417 \rightarrow 399 для схизандролов В (синий).

При этом, хроматограммы по полному ионному току и сигналу УФ-детектора демонстрируют наличие в том же временном отрезке пиков других схизандролов, которые не мешают определению выбранных биомаркеров в режиме МЗР.

Зачастую одинаковые ионные переходы можно наблюдать как для агликоновых флавоноидов (флавонов), так и для их гликозидов. Это приводит к тому, что на хроматограммах экстрактов, полученных в режиме МЗР все же присутствуют пики нецелевых компонентов,

информация о которых в рамках целевого подхода не учитывается. Например, на масс-хроматограммах экстрактов из корневищ лимонника китайского были обнаружены дополнительные пики, относящиеся, предположительно, к гликозидам вогонина, которые, однако, не мешают его определению, поскольку сам вогонин удерживается сильнее ввиду отсутствия полярных сахаридных заместителей.

В большинстве случаев, используя выбранные универсальные условия градиентного элюирования, удавалось добиться удовлетворительного ($R_s \geq 1$) разделения определяемых биомаркеров с другими компонентами на масс-хроматограммах. Индивидуальные параметры разделения были использованы только в некоторых отдельных случаях: для разделения псевдогинсенозидов F_{11} и RT_5 , а также в случае изомеров, например розавина и розарина. Даже в случае, когда некоторые пики изомерных флавоноидов, например, глюкозиды кверцетина, были лишь частично разделены, предложенный быстрый способ скрининга позволяет однозначно определить их присутствие и, чаще всего, соотношение, что сопоставимо с общепринятыми ВЭЖХ-УФ методиками. Было обнаружено, что соотношение концентраций хризоэриола, диосметина, акацетина и изоакацетина в исследованных образцах измельченных растительных материалов *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* и *Rosmarinus officinalis*, существенно различается и составило 1 : 3.7 : 1.7 : 5.5; 1 : 3.9 : 3.6 : 17.5; 1 : 1.6 : 8.2 : 7.9 соответственно. Другой пример - соотношение хризин : кверцетин-3-глюкозид : кверцетин-7-глюкозид в *Geranium pratense* (1.1 : 1.2 : 1.0) и *Matricaria chamomilla* (1.0 : 1.2 : 2.0). В то же время соотношение кверцетин-3-глюкозида и кверцетин-7-глюкозида в *Eryngium campestre* составляет почти 4:1. Таким образом, при накоплении соответствующего массива данных по соотношению содержаний маркеров качества в будущем, предположительно, в некоторых случаях удастся дискриминировать образцы растений, для которых характеристические маркеры недоступны.

Оценка метрологических характеристик при определении маркеров

В ВЭЖХ-МС интенсивность регистрируемых сигналов может меняться в случае загрязнения камеры ионизации или изменения состава подвижной фазы. По причине высокой стоимости стандартных образцов соединений-маркеров, не синтезируемых напрямую, а получаемых выделением и очисткой из растительных экстрактов, их изотопно-меченные аналоги, за редким исключением, не доступны. Таким образом, обычно, как и в случае ВЭЖХ-УФ, приходится использовать метод внешнего стандарта. Калибровочные зависимости площади пика от концентрации были получены методом линейной регрессии для каждого аналита. Значения инструментальных пределов обнаружения (C_{min}) находились в диапазоне от 0.2 до 63 нг/мл, а минимальные определяемые концентрации (C_{lim}) – в диапазоне от 0.5 до 190 нг/мл, что является вполне достаточным, поскольку данные вещества являются, как правило, основными биоактивными компонентами исследованных экстрактов. Значения s_r , в диапазоне 2.0–8.5% свидетельствуют об удовлетворительной повторяемости в условиях ВЭЖХ-МС анализа.

Тестирование разработанных способов ВЭЖХ-МС/МС определения биомаркеров

В общем случае способ пробоподготовки может быть изменен/адаптирован в зависимости от состава исследуемого образца растения или фитопрепарата. В рамках тестирования разработанных методик были проанализированы образцы водных и водно-спиртовых экстрактов из различных растительных материалов, поскольку именно такие препараты и настойки чаще всего поступают в продажу. При приготовлении части из них в лаборатории варьировали условия извлечения и обычно наилучшие результаты были достигнуты в случае применения 50–70% спиртового раствора в качестве экстрагента. Повторяемость (s_r , %), с учетом процедуры

экстракции, не превышала 19.5%, а для большинства измеренных содержаний биомаркеров была менее 10%, что свидетельствует о применимости разработанного подхода для быстрого скрининга указанных соединений в растительных материалах, экстрактах, и продуктах на основе лекарственных растений.

Целевой ВЭЖХ-МС анализ является функциональным инструментом для идентификации и оценки качества растительных материалов. Детектирование в режиме МЗР решает проблему перекрытия пиков на хроматограмме растительных экстрактов и комплексных лекарственных составов, содержащих большое число мешающих компонентов. Метрологические характеристики разработанных методик соответствуют приемлемым значениям. Однако ограниченный линейный диапазон и необходимость проводить градуировку прибора непосредственно в день проведения измерений увеличивают трудоемкость анализа, поскольку необходимо также подбирать разбавление экстракта, так как разные компоненты сильно отличаются по уровню содержаний определяемых биомаркеров. Кроме того, нерешенными остаются основные проблемы контроля подлинности и качества растительного сырья и препаратов на его основе — необходимость в дорогостоящих индивидуальных стандартных образцах и неполнота охвата многокомпонентного состава таких объектов. Тем не менее, ВЭЖХ-МС позволяет зарегистрировать и сигналы некоторых родственных соединений даже в режиме МЗР, а более полные данные можно получить в режимах МС¹ и МС² сканирования. Для идентификации этих компонентов по МС данным, выявления потенциальных маркерных соединений и поиска различий между образцами необходимо использовать групповой анализ и ненаправленный анализ.

Глава 4. Групповое извлечение компонентов из растительных материалов

Четвертая глава посвящена разработке нового подхода к оптимизации группового извлечения компонентов из растительных материалов. На каждой стадии проведения пробоподготовки могут быть заданы различные параметры, такие как температура, длительность, масса образца или соотношение «образец-растворитель» и др. Варьирование этих параметров может быть произведено в рамках однофакторного, двухфакторного или многофакторного эксперимента. В последнем случае число экспериментов может быть слишком большим, если использовать полнофакторный дизайн эксперимента, поэтому рекомендуется использовать различные виды частичных факторных дизайнов эксперимента для оптимизации трудозатрат. Разработка таких способов извлечения должна проводиться с учетом группового состава извлекаемой фракции. Также следует проводить проверку на полноту извлечения. Метод «введено-найдено» для оценки степени извлечения определяемых соединений из твердых растительных материалов использовать некорректно. Вместо этого для оценки суммарного извлекаемого содержания того или иного соединения используют длительную экстракцию в аппарате Сокслета или многократную последовательную жидкостную экстракцию выбранным растворителем в выбранных условиях. В рамках группового подхода можно использовать разные по своим свойствам (например, полярности) реперные соединения для выбора условий извлечения структурно близких к ним аналитов. Такой подход был применен в настоящей работе применительно к стероидным сапонином якорцев стелющихся и диоскореи дельтовидной. Диосцин был выбран в качестве репера для спиростаноловых сапонинов, а протодиосцин – для фуростаноловых.

Извлечение стероидных сапонинов из растительного материала *T. terrestris* методом ультразвуковой экстракции (УЗЭ)

Выбор растворителя. Для обеспечения эффективной экстракции важно выбрать подходящий растворитель. Стероидные сапонины из *T. terrestris* хорошо растворяются в водных

растворах полярных органических растворителей, таких как этанол и метанол. Для исследования влияния органического растворителя на полноту извлечения стероидных сапонинов были выбраны: метанол, этанол, изопропанол и ацетонитрил. Изопропанол и ацетонитрил обеспечивают максимальный выход протодиосцина и диосцина, поэтому они были использованы в дальнейших экспериментах. Метанол не использовали, поскольку протодиосцин вступал в реакцию метилирования, и его определение было невозможным.

Выбор соотношения фаз при экстракции. Влияние соотношения фаз при экстракции на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* исследовали в диапазоне от 50 мл/г до 400 мл/г. Как показано на рис. 2, степень извлечения протодиосцина и диосцина повышается с увеличением соотношения фаз до 100 мл/г и затем практически не изменяется при более высоких соотношениях. Следовательно, оптимальное соотношение фаз при экстракции – 100 мл/г, т.к. в таком случае используется минимальное количество органических растворителей.

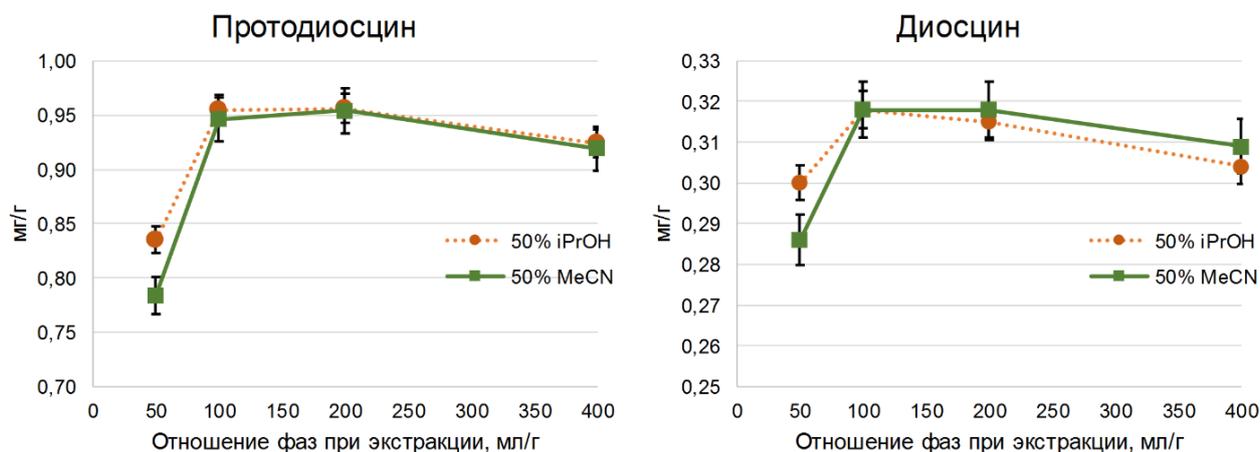


Рисунок 2 – Влияние соотношения фаз на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиксированные параметры экстракции: концентрации изопропанола и ацетонитрила - 50%; длительность экстракции - 60 мин; температура - 30°C.

Выбор соотношения компонентов растворителя. Растворы изопропанола и ацетонитрила с концентрациями от 30% до 100% использованы для изучения влияния концентрации органического растворителя на эффективность экстракции. Извлечение протодиосцина повышается при изменении концентрации изопропанола (ацетонитрила) с 30% до 50%. Аналогичная ситуация наблюдается при извлечении диосцина. Оптимальная концентрация изопропанола составляет от 50% до 60%, оптимальный диапазон концентраций оказывается более широким (от 50% до 80%) в случае использования ацетонитрила в качестве растворителя. Однако наблюдается снижение эффективности экстракции при повышении концентрации изопропанола выше 60%. По достижении концентрации изопропанола и ацетонитрила, равной 50%, степень извлечения была максимальной. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали 50%-ный водный раствор органического растворителя.

Выбор продолжительности экстракции. Наконец, для изучения влияния продолжительности ультразвукового воздействия на степень извлечения стероидных сапонинов из *T. terrestris* варьировали длительность экстракции (15, 30, 45, 60, 90, 120 мин), а другие параметры экстракции фиксировали: концентрация изопропанола и ацетонитрила, 50%; соотношение фаз при экстракции, 100 мл/г и температура, 30°C. Было установлено, что степень извлечения значительно увеличивается за первые 60 мин УЗЭ. При длительности экстракции свыше 60 мин наблюдается разложение протодиосцина. Разложения диосцина под действием ультразвука не происходит. Следовательно, оптимальная длительность экстракции для дальнейших экспериментов – 60 мин.

Для оценки полноты извлечения использовали способ последовательного экстрагирования. Экстракцию проводили с параметрами, оптимизированными ранее: концентрация изопропанола (ацетонитрила), 50%; время воздействия ультразвука, 60 мин; температура, 30°C и соотношение фаз при экстракции, 100 мл/г. Первый, второй, третий, четвертый и пятый акты экстракции дали: 78.4%, 15.2%, 6.0%, 3.5% и 1.7% от общего количества протодиосцина (1.20 ± 0.04 мг/г) и 67.0%, 18.6%, 9.0%, 3.8% и 0.7% от общего количества диосцина (0.47 ± 0.03 мг/г), извлеченных в растворе изопропанола за пять экстракционных актов; 78.0%, 16.2%, 5.2%, 3.7% и 1.9% от общего количества протодиосцина (1.19 ± 0.04 мг/г) и 64.5%, 19.9%, 10.3%, 3.8% и 0.6% от общего количества диосцина (0.49 ± 0.02 мг/г) – аналогично в случае ацетонитрила. Эти результаты наглядно демонстрируют, что на первом акте экстракции извлекается не менее 78% протодиосцина и не менее 64% диосцина от суммарного содержания аналитов.

Экстракция стероидных сапонинов из растительного материала *T. terrestris* кипящим растворителем (ЭКР)

Влияние органического растворителя. По результатам, полученным в ходе оптимизации условий УЗЭ решено использовать изопропанол и ацетонитрил в качестве органических растворителей для ЭКР при нормальном и при пониженном давлении (ЭКРПД). По результатам экспериментов с 40% и 60% растворами, изопропанол обеспечивал большую степень извлечения аналитов, чем ацетонитрил, поэтому в последующих экспериментах использовали изопропанол.

Влияние соотношения фаз при экстракции. При исследовании влияния отношения фаз при экстракции на полноту извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* варьировали соотношения фаз в диапазоне 50 – 400 мл/г. Соотношение фаз, равное 200 мл/г, обеспечивало наибольшее извлечение протодиосцина и диосцина.

Влияние концентрации изопропанола. Для исследования влияния содержания изопропанола в экстрагенте на эффективность экстракции стероидных сапонинов из *T. terrestris* в рамках однофакторного эксперимента его концентрацию варьировали от 30% до 80%, другие параметры экстракции фиксировали. Содержание протодиосцина в экстрактах менялось от 1.71 ± 0.06 до 1.90 ± 0.05 мг/г. Максимальная степень извлечения протодиосцина наблюдается в 50% растворе изопропанола. Содержание диосцина незначительно изменялось от 0.59 ± 0.01 мг/г до 0.62 ± 0.01 мг/г в оптимальном диапазоне концентраций изопропанола (50 – 80%). В случае 30%-го раствора было выделено лишь 0.46 ± 0.01 мг/г диосцина. В последующих экспериментах использовали 50% раствор изопропанола.

Влияние времени экстрагирования и температуры. Возможность разложения целевых соединений под действием высоких температур является основным недостатком метода ЭКР. ЭКРПД позволяет экстрагировать вещество при более низкой температуре, не меняя другие параметры экстракции. Экспериментально установленная температура начала кипения 50%-го раствора изопропанола при давлении 7.5 кПа – 35°C, а при 24.5 кПа – 55°C. Проведен двухфакторный эксперимент с целью изучения влияния длительности экстракции и температуры на полноту извлечения протодиосцина и диосцина наиболее перспективными методами экстракции – ЭКР и ЭКРПД.

Как видно из рисунка 3, увеличение времени экстракции для ЭКР с 60 до 240 мин приводит к термическому разложению протодиосцина, и его содержание в экстракте снижается с 1.90 ± 0.05 мг/г до 1.10 ± 0.06 мг/г. Для метода ЭКРПД при 55°C термическое разложение протодиосцина начинается только на 120 минуте после начала экстракции. Увеличение времени экстракции не влияет на степень извлечения диосцина. При температуре 92°C за 60 минут экстракции извлекается такое же количество протодиосцина, что и при экстракции за 90 мин при 55°C и 120 минут при 35°C. Данные результаты дают основание считать, что за 60 минут экстракции протодиосцина методом ЭКР разрушение аналита незначительно.

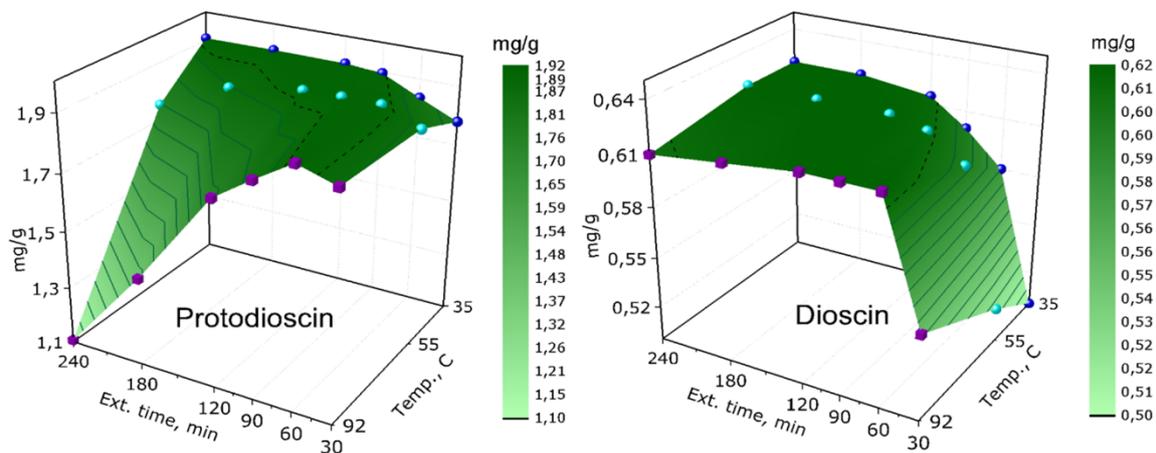


Рисунок 3 – Влияние длительности экстракции и температуры на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиолетовый маркер - метод ЭКР (температура экстракции: 92°C); Голубой маркер - метод ЭКРПД (температура экстракции - 55°C); Синий маркер - метод ЭКРПД (температура экстракции - 35°C). Фиксированные параметры экстракции: концентрация изопропанола - 50%; соотношение фаз - 200 мл/г.

При проведении последовательного экстрагирования. Во всех трех случаях на 2 и 3 стадиях экстракции протодиосцин и диосцин не обнаружены, что говорит о высокой степени извлечения анализов из растительного материала путем однократной экстракции в выбранных условиях ЭКР и ЭКРПД.

Апробация предложенного подхода. В лекарственных целях часто, но не исключительно, используют плоды растения *T. terrestris*, однако другие надземные части этого растения также богаты стероидными сапонинами. Для оценки работоспособности и универсальности разработанного подхода к извлечению протодиосцина и диосцина с использованием ЭКР применили метод последовательной экстракции к трем разным измельченным растительным материалам: листьям, плодам, стеблям. Содержание протодиосцина и диосцина в этих материалах сильно отличалось. На втором и третьем акте экстракции протодиосцин и диосцин не были обнаружены, что указывало на полноту извлечения на первом акте экстракции.

Таким образом, УЗЭ является удобным и достаточно эффективным способом извлечения стероидных сапонинов, однако, даже в варианте последовательного экстрагирования, не может обеспечить полноту их извлечения из растительных материалов, в отличие от ЭКР и ЭКРПД. Проведение однофакторных и двухфакторных экспериментов, а тем более построение полной поверхности отклика (response surface), для поиска оптимальных условий извлечения является чрезвычайно трудоемким процессом. Поэтому в дальнейших экспериментах по извлечению той же группы соединений из растительного материала и суспензионной клеточной культуры *D. deltoidea* были применены схемы экспериментального дизайна Тагучи.

Извлечение стероидных сапонинов из растительного материала и суспензионной клеточной культуры *D. deltoidea*

В качестве количественной характеристики эффективности экстрагирования использовался параметр D_n (групповой выход), рассчитанный для двух реперных соединений – протодиосцина и диосцина – по формуле (1).

$$D_n = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n d_i} \quad (1)$$

где D_n – общее-относительное содержание экстрагируемых анализов, d – относительное количество в % от максимального для каждого анализа, измеренного в ходе всех экспериментов по оптимизации в рамках данного статистического экспериментального дизайна, n – количество анализов. Данный параметр позволяет провести оптимизацию, одинаково учитывая степень

извлечения для каждого анализа независимо от количественного содержания его в пробе, а также выбирать условия, при которых все анализы извлекаются с максимально близкой эффективностью.

Выбор оптимального растворителя. Проведен двухфакторный эксперимент на следующих уровнях концентраций: 25, 50 и 75% для следующих органических растворителей: этанол, изопропанол и ацетонитрил. Оптимальным оказался 50%-ый раствор ацетонитрила.

Оптимизация параметров экстрагирования с применением экспериментального дизайна. На следующем этапе работы была произведена оптимизация следующих параметров экстрагирования: продолжительность экстрагирования, концентрация ацетонитрила и соотношение фаз при экстрагировании. Для оптимизации был использован статистический экспериментальный дизайн Тагучи L₁₆ (4³) на основе латинского квадрата. Уровни для трех исследованных факторов были следующими: (А) длительность экстрагирования (30, 60, 90, 120 мин); (В) концентрация ацетонитрила (30, 50, 70, 90 %); (С) отношение фаз при экстрагировании (50, 100, 200, 400 мл/г).

Таблица 1 – Результаты оптимизации параметров экстрагирования с использованием статистического экспериментального дизайна Тагучи L₁₆ (4³)

№	Факторы			Растительный материал <i>D. deltoidea</i>			Клеточная культура <i>D. deltoidea</i>		
	(А)	(В)	(С)	Прото-диосцин, %	Диосцин, %	D ₂ , %	Прото-диосцин, %	Диосцин, %	D ₂ , %
1	1	1	1	39.2	24.0	30.7	59.5	50.2	54.6
2	1	2	2	58.3	42.3	49.7	71.1	80.6	75.7
3	1	3	3	47.2	58.0	52.3	92.5	93.4	93.0
4	1	4	4	32.9	54.6	42.4	77.2	100.0	87.9
5	2	1	2	68.9	45.4	55.9	84.2	67.5	75.4
6	2	2	3	86.7	76.3	81.3	94.5	92.5	93.5
7	2	3	4	58.4	64.2	61.5	100.0	98.6	99.3
8	2	4	1	30.5	46.2	37.5	44.8	87.3	62.5
9	3	1	3	100.0	86.4	93.0	92.1	82.4	87.1
10	3	2	4	96.1	100.0	98.0	90.5	92.0	91.2
11	3	3	1	51.6	53.6	52.6	54.2	78.8	65.3
12	3	4	2	58.3	71.4	64.5	58.6	98.2	75.9
13	4	1	4	92.1	96.2	94.1	87.5	70.5	78.6
14	4	2	1	73.7	76.9	75.3	61.2	49.8	55.2
15	4	3	2	85.4	97.2	91.1	58.1	73.6	65.4
16	4	4	3	75.6	87.3	81.2	87.9	98.8	93.2

Как видно из данных, представленных в таблице 1, для экстракции из растительных материалов оптимальные условия УЗЭ соответствуют установленным в эксперименте №10, где значение параметра D₂ оказалось на уровне 98.0%, а для суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* – эксперименту № 7, где значение параметра D₂ составило 99.3%. Таким образом, оптимальные условия УЗЭ для извлечения из клеточной культуры следующие: (А) длительность, 60 мин; (В) соотношение ацетонитрил : вода, 50%; (С) соотношение фаз, 400 мл/г. Для растительного материала *D. deltoidea* оптимальные параметры: (А) длительность, 90 мин; (В) соотношение ацетонитрил : вода, 50%; (С) соотношение фаз, 400 мл/г.

Проверка полученных результатов способом последовательного экстрагирования и ЭКР. Для определения степени извлечения целевых соединений из растительного материала и суспензионной клеточной культуры использован способ последовательного экстрагирования.

В ходе данного эксперимента были использованы параметры экстрагирования, полученные ранее для растительного материала *T. terrestris*. Длительность экстрагирования варьировалась от 30 до 240 мин. Результаты приведены на рис. 4.

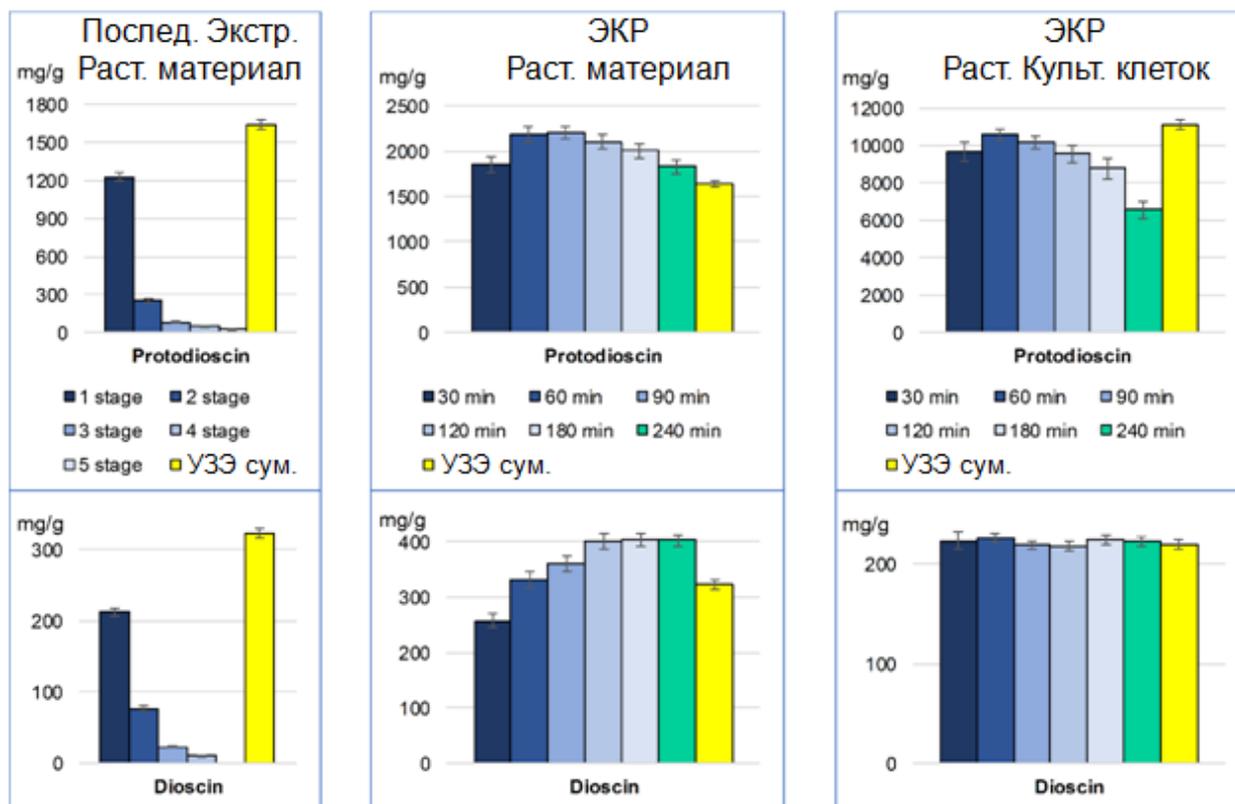


Рисунок 4 – Результаты последовательного экстрагирования и ЭКР (в сравнении с УЗЭ) для извлечения стероидных сапонинов из растения и клеточной культуры *D. deltoidea*.

Для интактного растения *D. deltoidea* в ходе первого, второго, третьего, четвертого и пятого экстракционного акта степень извлечения составила 74.9%, 15.3%, 5.0%, 3.2% и 1.6% для протодиосцина (общее содержание – 1640 ± 120 мкг/г) и 65.7%, 23.9%, 7.0%, 3.4% и 0% для диосцина (общее содержание – 325 ± 40 мкг/г). Эти результаты подтверждают, что метод УЗЭ не позволяет добиться полного извлечения аналитов из растительного материала. Возможной причиной может быть наличие механических тканей в растительном материале, так как на первом экстракционном акте из клеточной культуры удастся извлечь 98% (общее содержание – 11100 ± 300 мкг/г) протодиосцина и на третьем экстракционном акте уровень протодиосцина ниже предела обнаружения, диосцин же полностью извлекается на первом экстракционном акте (общее содержание – 220 ± 25 мкг/г). Данные результаты показывают, что использование УЗЭ оправдано для извлечения стероидных сапонинов из клеточных материалов, а для твердых растительных материалов лучше использовать ЭКР.

Сравнение с результатами УЗЭ показало, что термическое разложение протодиосцина также происходит при продолжительном экстрагировании методом ЭКР. Следует отметить, что количество извлекаемого протодиосцина (2200 ± 50 мкг/г) и диосцина (400 ± 10 мкг/г) из растительного материала значительно превышает аналогичные количества аналитов, полученные в ходе пяти последовательных актов экстрагирования методом УЗЭ, в то время как аналогичные показатели для клеточной культуры равны с учетом погрешности. Суммируя результаты двух проведенных проверочных экспериментов, можно с точностью говорить, что метод УЗЭ подходит для извлечения стероидных сапонинов из суспензионной клеточной культуры *D. deltoidea*, а оптимальная длительность экстрагирования методом ЭКР для интактного растения составляет от 60 до 90 мин. Таким образом, было показано, что применение статистического экспериментального дизайна с выходным параметром D_n оправдано для решения задачи оптимизации условий одновременного извлечения фитокомпонентов разной полярности из твердых растительных и клеточных материалов.

Выбор условий извлечение сахаров и сахароспиртов из хвои

Еще одной важной группой метаболитов растений являются сахара и сахароспирты. Для их извлечения также могут быть использованы вода и полярные органические растворители. Хроматографическое разделение сахаров и сахароспиртов удобно проводить в условиях гидрофильной хроматографии, что позволяет эффективно сочетать эти стадии с последующим МС-детектированием в условиях ЭРИ с высоким содержанием ацетонитрила в каплях спрея.

Выбор условий ВЭЖХ-МС определения сахаров и сахароспиртов. Депротонирование гидроксильных групп сахаров и сахароспиртов в условиях ЭРИ протекает гораздо легче, чем протонирование. Поэтому их депротонированные молекулы $[M-H]^-$ использовали в качестве ионов-предшественников в режиме МЗР. При разделении на сорбенте с привитой амино-фазой согласно литературным данным подходящим элюентом является смесь ацетонитрила и воды в соотношении 3 : 1, однако в серии проведенных экспериментов не удалось достичь полного разделения пиков всех аналитов в этих условиях. Однако было отмечено, что удовлетворительное разделение сахаров (рамноза, фруктоза и глюкоза) и сахароспиртов (эритритол, ксилитол, рибитол, арабитол, пинитол, арабитол, пинитол и секвоитол) достигается при концентрации ацетонитрила 94% в подвижной фазе. Дальнейшее увеличение концентрации ацетонитрила привело к значительному снижению интенсивностей сигналов. Наилучшее разделение было достигнуто с использованием режима градиентного элюирования за 20 минут анализа (рис. 5).

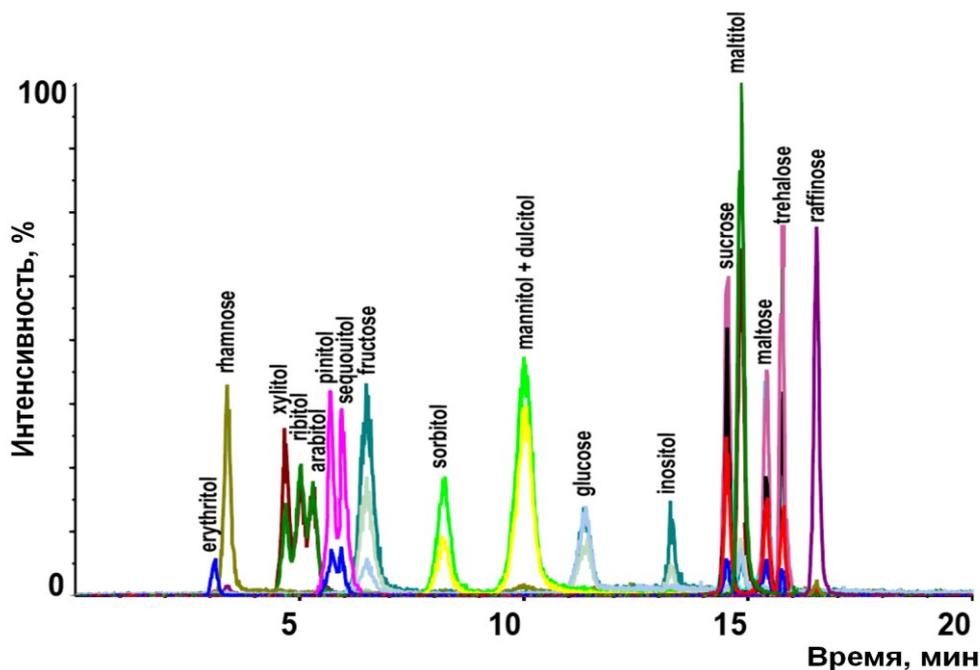


Рисунок 5 – Масс-хроматограмма смеси сахаров и сахароспиртов в режиме МЗР.

Следует отметить, что температура существенно влияла на хроматографическое разделение. Оптимальная температура для разделения аналитов составляла 40 °С, снижение температуры приводило к значительному ухудшению эффективности, тогда как повышение температуры до 50 °С (максимально допустимая температура колонки) не приводило к улучшению разделения критических пар пиков.

Оптимизация параметров экстрагирования с применением экспериментального дизайна. Оптимизация с помощью экспериментального дизайна ортогональных массивов Тагучи - L9 (3⁴) была проведена для оценки влияния следующих параметров при проведении экстракции: концентрация полярного соразтворителя – метанола (30, 60, 90 %), время экстракции (15, 30, 45 мин), тип образца растения (I – неизмельченная хвоя, II – измельченная до 2 мм, III – измельченная до мелкого порошка). В качестве выходного параметра был использован

групповой выход (D_n), рассчитанный для 9 обнаруженных в экстракте из хвойной листвы *Pinus sibirica* аналитов – эритритола, пинитола, фруктозы, сорбитола, глюкозы, инозитола, сахарозы, мальтозы и рафинозы. Результаты экспериментов представлены на рис. 6.

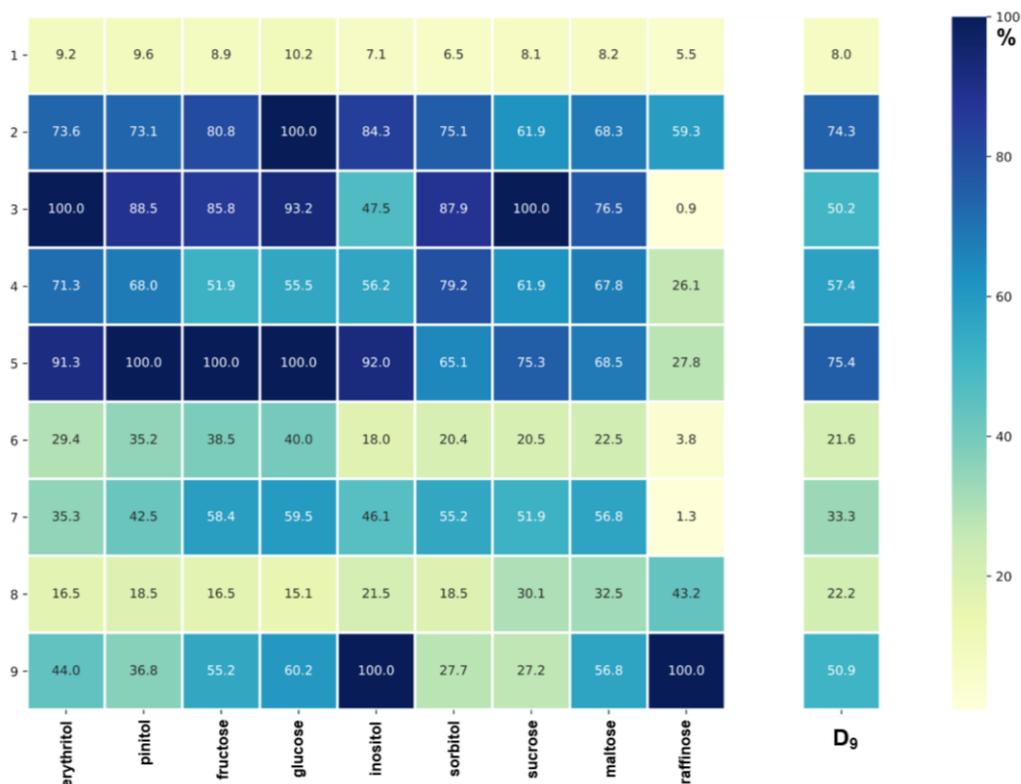


Рисунок 6 – Результаты экспериментов по извлечению сахаров и сахароспиртов из хвои, проведенных по экспериментальному дизайну Тагучи - L_9 (3^4).

Как можно заметить, наилучшие результаты ($D_9 \approx 75\%$) получены в экспериментах № 2 и 5. Тем не менее статистическая обработка результатов экспериментов в рамках использованного экспериментального дизайна позволяет оценить влияние на разброс значений выходного параметра для каждого из факторов и их значимость (таблица 2), что в свою очередь обеспечивает выбор наилучших значений для рассматриваемых факторов.

Таблица 2 – Значения откликов и ранжирование факторов по степени влияния на эффективность УЗЭ, полученные путем ортогонального экспериментального дизайна Тагучи – L_9 (3^4)

Уровень	Фактор			
	MeOH конц., %	Длительность, мин	Тип образца	Температура, °C
1	44.18	32.93	17.27	44.77
2	51.45	57.30	60.87	43.10
3	35.52	40.91	53.00	43.26
Δ , %	15.93	24.37	43.60	1.67
Ранг	3	2	1	4

Полученные оптимальные условия УЗЭ: концентрация MeOH - 30% (вода - 70%), время экстракции - 30 мин, тип образца растений - II. Как видно из таблицы 2, температура не является значимым параметром в исследованном диапазоне значений этого фактора. Экстракция дисахаридов была более эффективной при повышении температуры экстракции, тогда как эффективность экстракции рафинозы значительно снижалась при температуре 90°C. При этом выход сахарозы значительно увеличивался в тех же условиях, по-видимому, из-за разложения рафинозы (рис. 6). Таким образом, выбрано значение температуры на уровне 60°C, чтобы избежать краевых эффектов. Тип измельченности образца растения имел большое влияние на выход экстракции. Использование образцов типов II и III было предпочтительнее, чем типа I.

Ухудшение экстракции аналитов при переходе от типа II к типу III, по-видимому, происходит из-за наличия смолы в образцах растений, потери которой неизбежны при измельчении в ступке. По результатам эксперимента с выбранными параметрами экстрагирования показатель D_9 составил $96 \pm 3\%$ на первом акте экстракции.

Проверка полученных результатов способом последовательного экстрагирования. Для подтверждения эффективности УЗЭ с оптимизированными параметрами был проведен дополнительный проверочный эксперимент, по результатам которого было установлено, что на втором акте экстракции групповой выход D_9 составил менее 5%. На третьей стадии экстракции сахара и сахароспирты не были обнаружены. Таким образом, показано, что более 90% от общего выхода каждого аналита было получено на первой стадии экстракции.

Апробация предложенного подхода. Чтобы проверить универсальность разработанного способа УЗЭ и последующего ВЭЖХ-МС/МС определения сахаров и сахароспиртов, было решено провести измерения с помощью способа последовательного экстрагирования для десяти образцов хвои растений из пяти родов, наиболее распространенных на территории Евразии: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* (Pinaceae) и *Juniperus* (Cupressaceae). Самыми распространенными сахарами для изученных хвойных растений оказались глюкоза, фруктоза и сахароза. Для *Juniperus communis* и *Larix gmelinii* рафиноза также является одним из наиболее значимых сахаров в сахаридном профиле. Основные обнаруженные сахароспирты для *Juniperus communis* – пинитол и инозитол; секвоитол. Содержание этих соединений достигает 1% от сухой массы, что делает хвойные деревья ценным источником пинитола и инозитола, которые обладают высокой биологической активностью. Степень извлечения на первой стадии экстракции для каждого аналита оказалась на уровне $94 \pm 8\%$. Сильные различия в соотношении сахаров и сахароспиртов в хвое исследованных растений оправдывают введение параметра D_n для оптимизации условий УЗЭ и последующего селективного ВЭЖХ-МС/МС определения этих соединений в подобных объектах.

Глава 5. Групповая идентификация компонентов растительного сырья

Пятая глава посвящена обнаружению и предварительной групповой идентификации – дерепликации – тритерпеновых и стероидных гликозидов в разных растениях на основе ВЭЖХ-МС данных.

Идентификация неизвестных тритерпеновых гликозидов в составе женьшеневого чая

В первом параграфе на примере группы неизвестных соединений в женьшеневом чае – улуне, обнаруженной также в листьях *Abrus precatorius* L. показано применение традиционной схемы достоверной идентификации, основанной на определении молекулярной формулы по данным МСВР и выделении в индивидуальном состоянии с последующим 1D и 2D ЯМР анализом для установления структуры. Для установления молекулярных формул использовали сигналы $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$ ионов. При интерпретации сигналов из МС² спектров оказалось, что помимо остатков глюкозы и глюкуроновой кислоты в структурах обнаруженных соединений присутствовали малонил- и ацетил-заместители, отщепляемые при фрагментации в виде нейтральных потерь $C_3H_2O_3$ (86 Да) и C_2H_4O (44 Да) соответственно. Это можно наблюдать по характеристичным сигналам отрицательных $[M-Ac-H]^-$ и $[M-Mal-H]^-$ ионов, а также отличающихся на Ac или Mal фрагментных ионов, полученных в режиме ЭРИ(+). Установлена точная масса еще одной нейтральной потери, равная 27.9949 (CO, $\Delta = -0.52$ м.д.), что соответствует фрагментации остова молекулы с отщеплением CO (m/z 467.3157 \rightarrow m/z 439.3208).

Для того чтобы детализировать структуру общего агликона рассмотренной группы соединений из женьшеневого чая, была разработана схема очистки гликозидной фракции с применением нескольких этапов жидкостной и твердофазной экстракции с последующим

гидролизом в кислой среде. Выделение гликозидов осуществляли путём сорбционного концентрирования на сорбенте Discovery DSC-18 с использованием последовательного элюирования равными объемами смесей метанол – вода с различным процентным соотношением, а для дополнительной очистки от примесей предложенная схема выделения сапогенина после гидролиза включала предварительную отмывку сорбента 30%-ным раствором изопропилового спирта и элюирование целевого соединения 37.5%-ным раствором изопропилового спирта. Степень извлечения агликона, оцениваемая путем суммирования площадей соответствующего пика на хроматограммах всех собранных элюатов, при этом составила порядка 70 %. Такая схема выделения и очистки выигрывает в эффективности и минимизации затрат у препаративной ВЭЖХ, поскольку концентрация агликона при гидролизе увеличивается путем суммирования из разлагаемых исходных гликозидов, а чистота выделенной фракции остается на приемлемом уровне, если судить по отсутствию приков примесей на хроматограмме собранного элюата. В итоге по результатам ЯМР анализа структура сапогенина была признана эквивалентной известному соединению – абрусогенину.

Микропрепаративное выделение одного из ацетил-производного абрусогенина с фрагментарной формулой A-3-Glc(Ac)Glc и его исследование методом ЯМР-спектроскопии позволило окончательно подтвердить их состав. Стоит отметить, что в экстракте из чайных гранул, прошедших процедуру ферментации, значительно выше содержание обнаруженных ацетил-производных известных абрусозидов E и C.

Разработка способа групповой идентификации тритерпеновых и стероидных гликозидов

Рассмотренный пример исследования соединений из женьшеневого чая продемонстрировал сложность традиционной схемы решения задачи идентификации без использования априорной информации об изучаемых объектах. Однако быстрый скрининг на наличие характеристичных соединений из известных групп гликозидов позволил бы установить идентичность соединений из исследованного чая и листьев абруса молитвенного (рис. 7).

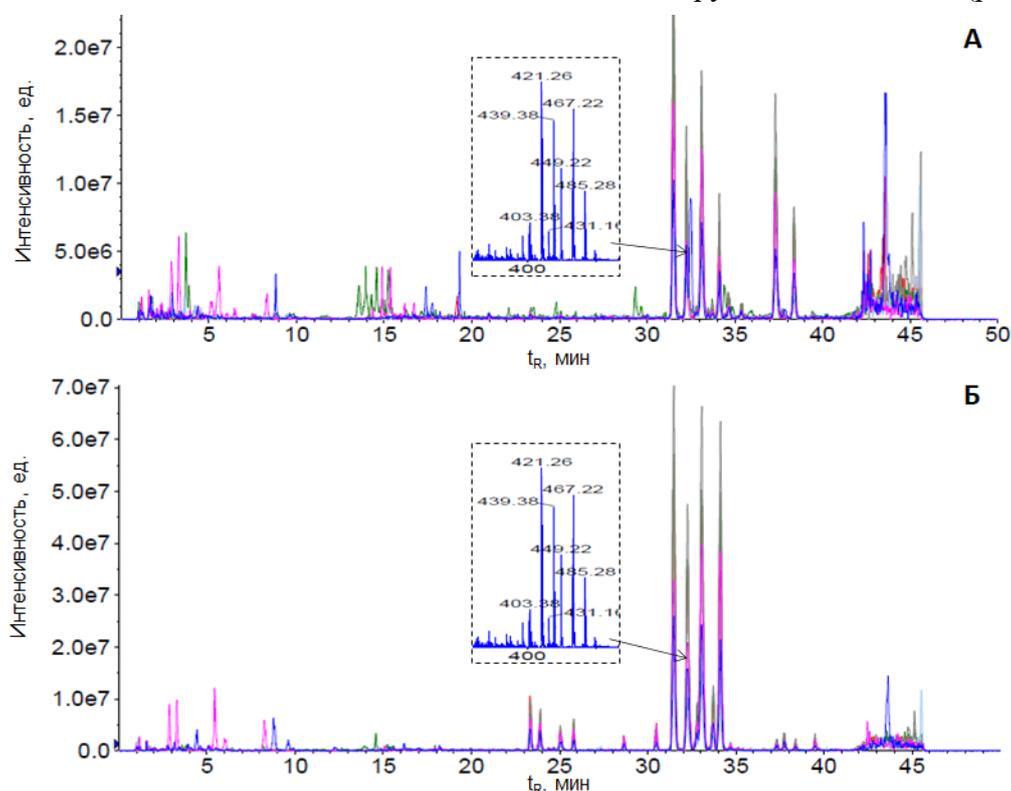


Рисунок 7 – Масс-хроматограммы экстрактов женьшеневого улуна (А) и листьев абруса молитвенного (Б) в режиме СИМ: красный - m/z 485.3, синий - m/z 467.3, зеленый - m/z 439.3, серый - m/z 421.3, фиолетовый - m/z 449.3, голубой - m/z 403.3.

Таким образом, сопоставление хроматографических профилей, построенных по сигналам групповых характеристичных – диагностических – ионов является перспективным инструментом как для поиска новых, в том числе минорных соединений из рассматриваемых групп, так и для сравнения образцов между собой. Еще одним важным преимуществом такого подхода является возможность его использования в случае применения ВЭЖХ-МС систем низкого разрешения, включая моноквадрольные приборы, поскольку фрагментация с образованием таких характеристичных ионов может происходить не только в ячейке соударений, но и в источнике ионизации («In-Source Decay») и/или на входе в масс-анализатор при соударении с молекулами азота, используемого в качестве газа-завесы. В таком случае благодаря высокой пропускной способности квадрупольных масс-фильтров могут быть легко обнаружены даже небольшие сигналы в любом месте хроматограммы, так как их регистрация в режиме сканирования или СИМ идет фактически непрерывно, в то время как при реконструкции аналогичных хроматограмм из МС² данных могут быть пропуски, ввиду низкой интенсивности ионов-предшественников. Стоит отметить, что режимы сканирования ионов-предшественников и сканирования нейтральных потерь, которые опираются на фрагментацию в ячейке соударений, также страдают от потери части ионов в ходе этого процесса.

Таким образом, для выбора условий групповой идентификации (дерепликации) тритерпеновых и стероидных гликозидов необходимо: 1) изучить особенности ионизации и фрагментации каждой исследуемой группы гликозидов; 2) выделить паттерны фрагментации их основных агликонов; 3) оценить возможности использования соотношений интенсивности сигналов в этих паттернах; 4) соотнести экспериментальные наблюдения с литературными данными и по возможности расширить списки детектируемых ионов и, соответственно, различных групп гликозидов; 5) оценить ограничения предложенного подхода; 6) в качестве апробации разработанного подхода, провести предварительную идентификацию и присвоить фрагментарные формулы гликозидам, обнаруженным в исследуемых растительных материалах и продуктах, а также продемонстрировать возможность сопоставления характеристичных хроматограмм (групповых профилей гликозидов по сигналам диагностических ионов) для оценки группового состава таких объектов.

Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация гинсенозидов женьшеня. Поскольку известно, что гинсенозиды обладают слабым УФ-поглощением в неселективной области УФ-детектирования (190 – 220 нм), перспективно использовать современные варианты МС-детектирования для контроля качества растительных материалов и продуктов на основе женьшеня. ЭРИ является приоритетным способом ионизации, так как гинсенозиды в своем составе имеют гидроксильные группы, которые способствуют процессу ионизации, и нет необходимости использовать химическую ионизацию при атмосферном давлении, которая, как правило, используется для трудноионизируемых, слабополярных соединений. Процедура выбора условий МС детектирования с использованием ЭРИ включает в себя выбор значений входных потенциалов МС-детектора, соответствующих максимальной интенсивности исследуемого молекулярного и/или характеристичных фрагментных ионов в масс-спектре. В масс-спектре, полученном в режиме регистрации положительных ионов, например, для гинсенозида Rd наиболее интенсивными сигналами являются сигналы аддукта молекулярного иона с калием $[M+K]^+$ m/z 986.2, натрием $[M+Na]^+$ m/z 970.2 и фрагментные ионы, полученные в результате отщепления молекул воды и глюкозы: m/z 749.6 $[M-Glc-2H_2O+H]^+$, m/z 587.6 $[M-GlcGlc-2H_2O+H]^+$, m/z 569.8 $[M-GlcGlc-4H_2O+H]^+$, m/z 443.6 $[M-GlcGlcGlc-H_2O+H]^+$, m/z 425.5 $[M-GlcGlcGlc-2H_2O+H]^+$, m/z 407.7 $[M-GlcGlcGlc-3H_2O+H]^+$. Интенсивности фрагментных ионов близки, и все они соответствуют сапогенину с потерей некоторого числа сахаридных остатков и молекул воды. В

режиме регистрации отрицательных ионов наблюдаются интенсивные сигналы депротонированной молекулы и аддуктов с муравьиной кислотой. Так, для гинсенозида Rd наблюдается сигнал депротонированной молекулы m/z 945.7, а также сигнал аддукта с муравьиной кислотой m/z 991.7. Таким образом, режим детектирования положительно заряженных ионов в данном случае уступает по чувствительности режиму регистрации отрицательных ионов, однако его применение открывает возможность проведения более информативного группового анализа. Кроме того, регистрация фрагментных ионов из паттерна фрагментации агликона является предпочтительной для повышения надежности идентификации за счёт одновременного детектирования нескольких сигналов.

Интенсивность и соотношение сигналов в масс-спектре также могут варьироваться в зависимости от типа источника ионизации и установленных в нем значений параметров, таких как напряжение на распыляющем капилляре, скорость потоков газов, температура в камере ионизации и других. Одним из основных параметров, влияющих на образование ионов в источнике ионизации, является ПД, соответствующий разнице потенциалов между землей и пластиной интерфейса. Увеличение ПД необходимо для разрушения кластеров определяемых веществ с молекулами растворителя, однако это также может привести к частичной фрагментации ионов определяемых соединений. По сигналам диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов построены зависимости площадей пиков гинсенозидов протопанксатриольного (ППТ), протопанксадиольного (ППД) и окотиллольного (ОТ) – типа от величины ПД (рис. 8). Максимальная интенсивность сигнала для гинсенозидов ППТ – типа (m/z 405, 423) наблюдалась при значениях ПД около 70 В, для ППД – типа (m/z 407, 425) — в интервале 50 – 70 В, для ОТ – типа (m/z 421, 439) — в интервале 80 – 100 В.

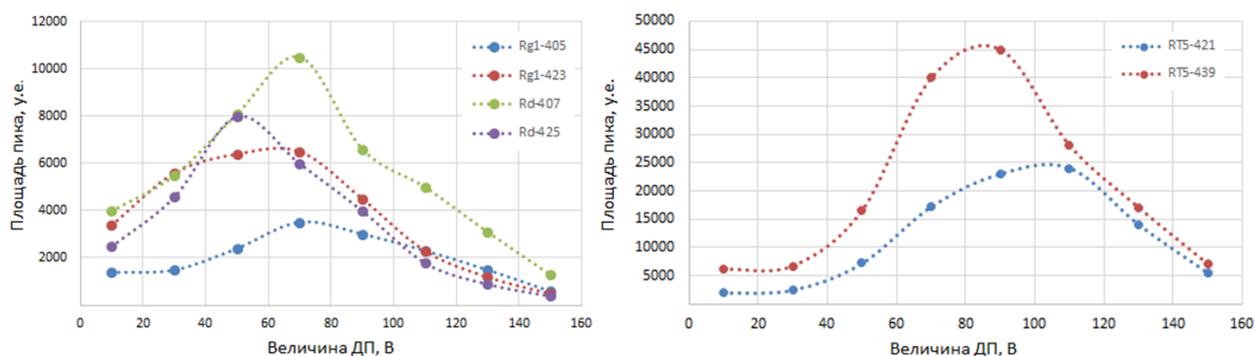


Рисунок 8 – Зависимость площадей пиков гинсенозидов от величины прилагаемого ПД. Для гинсенозидов ППТ-типа: синий — m/z 405; красный — m/z 423; ППД-типа: зеленый — m/z 407; фиолетовый — m/z 425; для гинсенозидов ОТ-типа: синий — m/z 421; красный — m/z 439.

Соотношение интенсивностей сигналов фрагментных ионов сапогенина ППТ, ППД и ОТ – типов может изменяться в зависимости от используемого оборудования фирм-производителей «Sciex», «Thermo», «Agilent», которое отличается конструкцией источника ионизации. В частности, показано влияние величины ПД на соотношение фрагментных ионов в масс – спектрах (рис. 9). Параметр ПД устанавливали вблизи минимального и максимального из заданных фирмой – производителем значений, а также в середине интервала. Для прибора фирмы «Agilent» изменяли аналогичный ПД параметр – напряжение на фрагменторе («Fragmentor Voltage»), соответствующий разности потенциалов между концами капилляра, соединяющего источник со входом в масс-анализатор. Наиболее интенсивным в спектрах гинсенозидов ППТ-типа на всех трёх приборах оказался сигнал иона с m/z 423, однако, относительная интенсивность фрагментного иона с потерей наибольшего числа молекул воды (m/z 405) снижается от 100 до 40 % при переходе от источника ионизации фирмы

«Thermo» к «Sciex». Доля сигнала иона с m/z 405 на приборе фирмы «Agilent» составляла менее 20 % от сигнала наиболее интенсивного иона (m/z 423) в масс – спектре. Интенсивность сигналов ионов сапогенина с потерей одной молекулы воды варьируется в диапазоне 35 – 45 % в зависимости от используемого прибора. Аналогичная ситуация наблюдается для гинсенозидов ОТ – типа, в спектрах которых наиболее интенсивным сигналом является m/z 439, а соотношение двух оставшихся ионов сапогенина зависит от типа источника. Интенсивности ионов в спектре гинсенозидов ППД типа закономерно уменьшаются в ряду m/z 407 – 425 – 443 независимо от используемого оборудования, однако процентное соотношение ионов с m/z 407/425 варьируется в диапазоне в широком диапазоне 30 – 100 %. Данные особенности формирования масс-спектров необходимо учитывать при разработке и переносе методики обнаружения и определения гинсенозидов с прибора одной фирмы на другое оборудование.

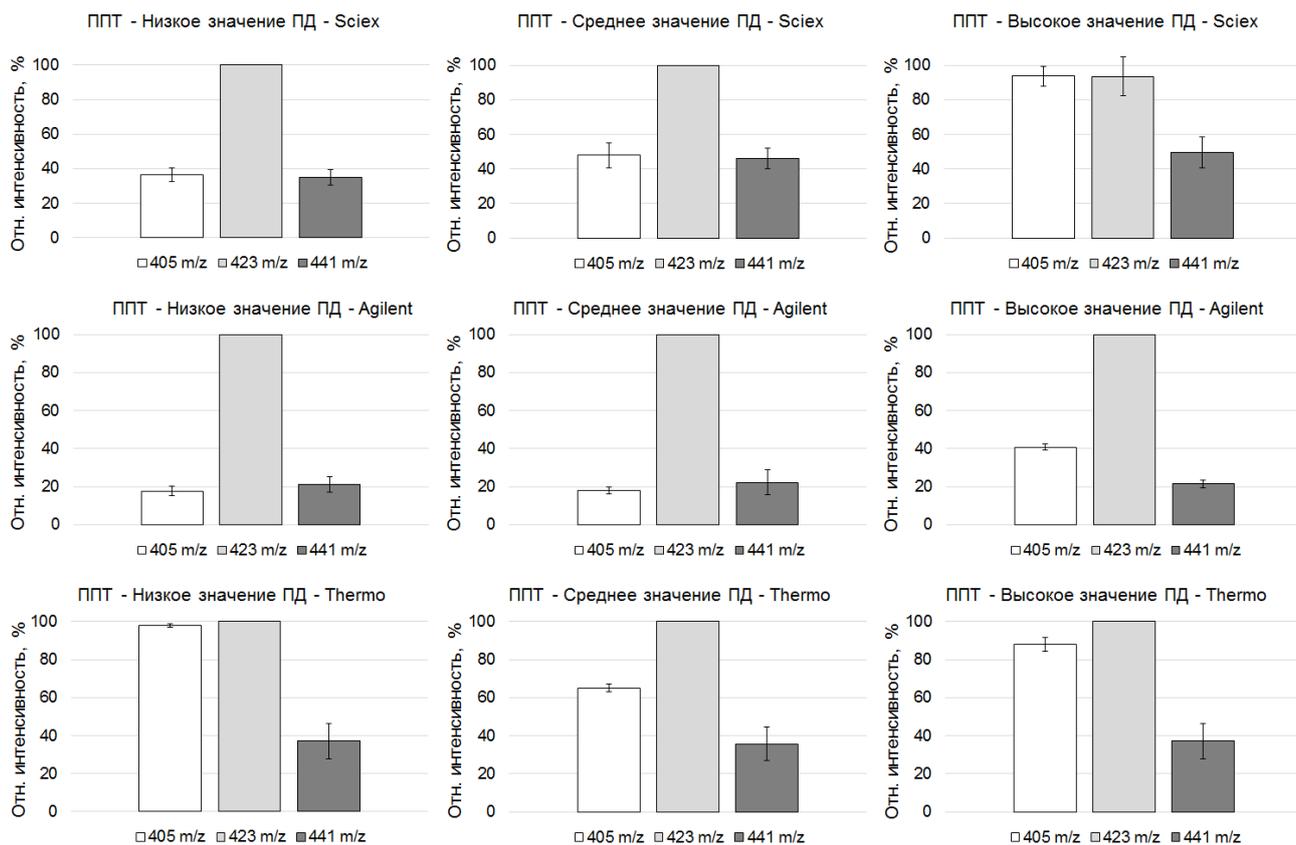


Рисунок 9 – Относительная интенсивность сигналов фрагментных ионов сапогенина ППТ-типа (белый — m/z 405, серый — m/z 423, чёрный — m/z 441) при низком, среднем и высоком значении ПД соответственно.

Наиболее интенсивные сигналы фрагментных ионов из полученных паттернов фрагментации было решено использовать далее в качестве «диагностических» (таблица 3) для быстрого обнаружения гликозидов с заданным типом агликона.

Таблица 3 – Значения m/z для диагностических ионов паттернов фрагментации сапогенинов гинсенозидов в режиме регистрации положительных ионов

Сапогенин	Сигналы из паттернов фрагментации, m/z	Выбранные диагностические ионы, m/z
ППТ	459, 441, 423, 405, 367, 349, 281, 229	441, 423, 405
ППД	443, 425, 407, 369, 351, 283, 231	443, 425, 407
ОТ	475, 457, 439, 421, 403, 143, 125, 107	457, 439, 421
ОК*	457, 439, 393, 249	457, 439, 393

*Олеаноловая кислота (ОК).

Следует отметить, что выбираемые диагностические ионы не только являются наиболее интенсивными в масс-спектрах рассматриваемых гликозидов в выбранных условиях детектирования, но и соответствуют фрагментным ионам агликона с минимальными изменениями в его структуре, например потерей одной или нескольких молекул воды. Это повышает достоверность предварительной идентификации типа агликона, кроме того, выбранные таким способом диагностические ионы могут быть использованы для чувствительного обнаружения и определения гликозидов.

Корни женьшеня являются основным сырьем при производстве настоек, чаев, косметических и лекарственных средств, а также других продуктов на основе этого растения. Однако химический состав женьшеня до сих пор полностью не изучен. Различный гинсенозидный состав имеют основные корни, их отростки, стебли, листья, цветы и ягоды разных растений из рода *Panax*. Кроме того, различные гинсенозидные профили имеют растения, достигшие разных возрастов и выращенные в разных условиях. Известно также, что соотношение ППТ и ППД гинсенозидов коррелирует с возрастом и частью растения. Таким образом, получение групповых гинсенозидных профилей является важной задачей в процессе контроля качества и изучения лекарственного потенциала того или иного женьшеневого сырья. Для наиболее полной оценки качественного состава женьшеневого растительного сырья и продуктов на его основе, необходимо обнаружить и предварительно идентифицировать (хотя бы в виде фрагментарных формул) как можно больше гинсенозидов из разных групп по типу агликона. Для этого использовали разработанный подход с регистрацией выделенных диагностических ионов из паттернов фрагментации ППТ, ППД, ОТ и ОК сапогенинов. В шести исследованных образцах было обнаружено более 40 различных представителей этих групп.

Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация стероидных сапонинов якорцев стелющихся. В качестве следующих объектов исследования, в состав которых входит группа стероидных сапонинов, выбраны надземные части растения и экстракты из клеточной культуры якорцев стелющиеся (*Tribulus terrestris* L.). Исследовали масс-спектрометрическое поведение стероидных сапонинов спиростанолового (диосцин) и фураностанолового (протодиосцин) типов. Обнаружение и определение стероидных

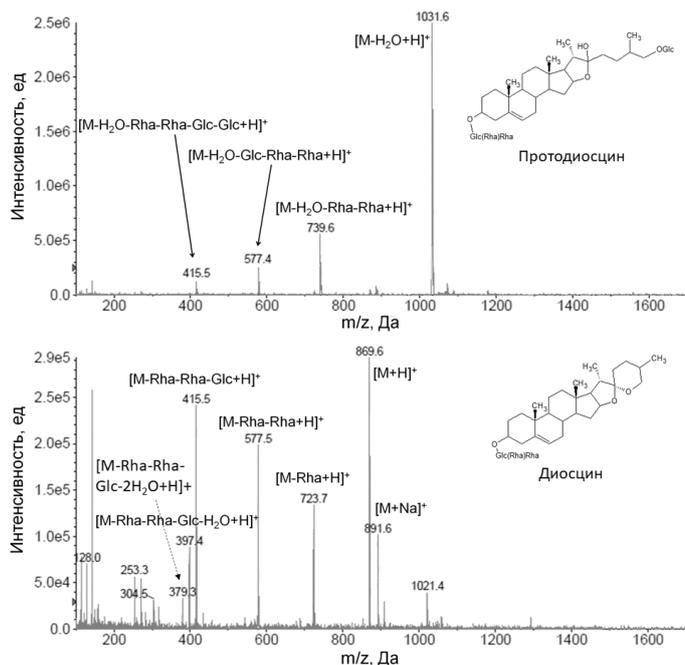


Рисунок 10 – Масс-спектры ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов и структуры протодиосцина и диосцина.

сапонинов, подобно гинсенозидам женьшеня, можно проводить в режиме МЗР для отрицательных ионов. Однако для групповой идентификации лучше подходят спектры, получаемые в режиме регистрации положительных ионов, поскольку они содержат как интенсивные сигналы протонированных молекул, так и характеристичные сигналы фрагментных ионов, не образующиеся в значительных количествах при фрагментации в ячейке соударений. Для протодиосцина и диосцина наблюдали сигналы, соответствующие протонированным молекулам аналитов, а также серии сигналов, соответствующих последовательному отщеплению сахаридных заместителей, с образованием фрагментных ионов сапогенина и дегидратированного сапогенина (рис. 10).

Структуры молекул протодиосцина и диосцина отличаются наличием цикла, замыкающегося через атом кислорода на С22 атом. В связи с этим, в масс-спектрах могут наблюдаться разные по интенсивности сигналы паттернов фрагментации для спиростаноловых и фуростаноловых агликонов (таблица 4). Однако ионы с m/z 379 и 433 не всегда достаточно интенсивны в масс-спектрах, поэтому одинаковая пара сигналов диагностических ионов (m/z 415 и 397) была выбрана для данных типов сапогенина. При этом поскольку структуры этих ионов различны, для их дифференциации и для увеличения интенсивности сигналов в масс-спектре проводили подбор оптимальных значений ПД. Для этого регистрировали серию масс-спектров при различных величинах ПД из диапазона 20 – 200 В с шагом варьирования 20 В (рис. 11).

Таблица 4 – Значения m/z для диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов стероидных сапонинов, полученных в режиме регистрации положительных ионов

Сапогенин	Сигналы из паттернов фрагментации, m/z *	Выбранные диагностические ионы, m/z
Диосгенин (D)	433, 415, 397, 379	415, 397
Гитогенин (G) / Хлорогенин (C)	451, 433, 415, 397, 379	433, 415
Гекогенин (H)	449, 431, 413, 395, 377	431, 413
Тигогенин (T)	435, 417, 399, 381	417, 399

*Отмеченные жирным ионы могут дополнительно наблюдаться для фуростанолового агликона.

В дополнение к различию в величине ПД, при котором наблюдается максимальная интенсивность фрагментного иона с m/z 415 для фуростанолового и спиростанолового структурного типа сапогенина можно использовать различие во временах удерживания и в некоторых случаях наличие сигнала с m/z 433. Таким образом, использование выбранных диагностических ионов позволяет проводить обнаружение компонентов, относящихся к двум разным подгруппам одной группы сапонинов – производных диосгенина.

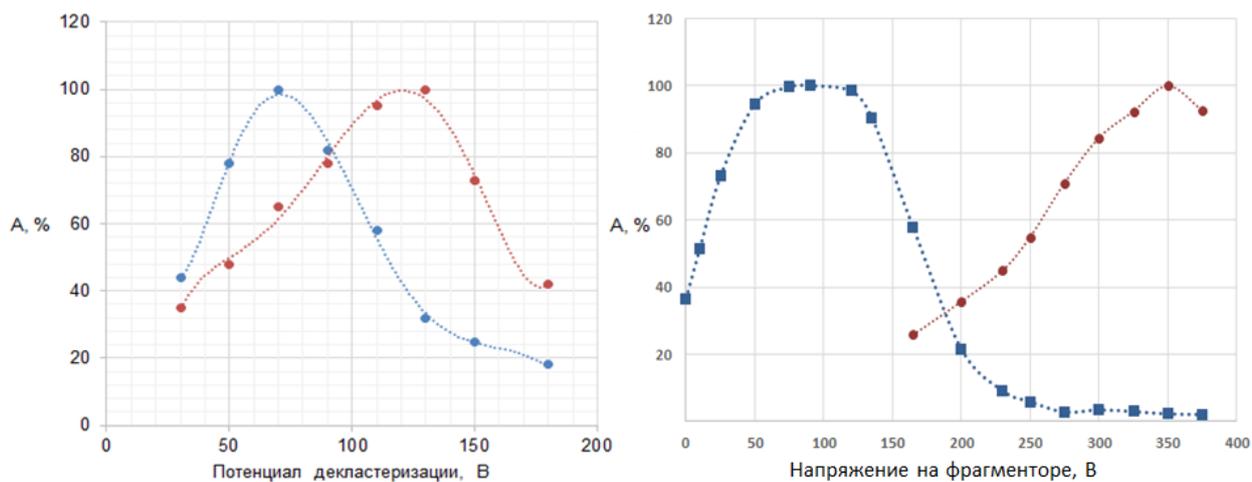


Рисунок 11 – Зависимость площади пиков, построенных по сигналам с m/z 415 для протодиосцина (красный) и диосцина (синий) при различном значении ПД («Sciex») и напряжения на фрагменторе («Agilent»).

Помимо протодиосцина и диосцина, в состав экстрактов из якорцев стелющихся входит большое число других важных компонентов близкой структуры, например террестросины А, В, С, D, E и F и другие производные гекогенина, гитогенина, тигогенина и диосгенина. Для некоторых из этих компонентов применение УФ детектирования является возможным, благодаря наличию кето-группы при 12-ом атоме углерода, однако более информативным и универсальным является ВЭЖХ-МС анализ в режиме сканирования положительных ионов. Обнаруженные на хроматограмме экстракта из растительного материала якорцев стелющихся 12 производных

диосгенина и гекогенина были идентифицированы на основании совпадения m/z сигналов $[M+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$ и $[M+Na]^+$ ионов в масс-спектрах этих пиков с рассчитанными номинальными массами этих ионов для данных соединений, а также по информации из MS^2 -спектров, содержащих сигналы, соответствующие последовательному отщеплению сахаридных заместителей с образованием фрагментных ионов сапогенина и дегидратированного сапогенина. Состав сахаридных цепей, указанный во фрагментарных формулах можно уточнить, если учесть, что практически все известные производные гекогенина, тигогенина и гитогенина обнаруженные в якорцах, произрастающих в Китае, Индии и Болгарии содержат β -галактозу, присоединенную в положении С3, а остальные гексозы, как и в случае гексоз производных диосгенина являются β -глюкозами. При этом более корректным является указание только на тип моносахарида – гексозу, тогда, например, фрагментарную формула диосцина можно записать так: D(s)-3-Hex[-Rha]-Rha. Для точного определения порядка связей внутри сахаридных цепочек некоторые авторы рекомендуют использовать MS^2 и MS^3 спектры, регистрируемые с помощью ионных ловушек, а также данные спектроскопии ЯМР. Известно, что экстракты из якорцев стелющихся могут содержать 25(R)/25(S)-изомеры некоторых гликозидов, особенно в обогащённых этими соединениями экстрактах из клеточной культуры, для обнаружения компонентов которых была использована более длительная программа хроматографического разделения в градиентном режиме. Всего было обнаружено и описано 33 структуры, из которых 27 присутствовали в виде пары изомеров. Несмотря на то, что хлорогенин ранее находили только в свободной от сахаров форме, некоторые его гликозиды все же могут быть обнаружены в клеточных культурах, поэтому во всех формулах одновременно указывали изомерные агликаны хлорогенина и гитогенина. Для спиростаноловых гликозидов характерно образование аддуктных ионов сапогенина с водой, что предположительно происходит во время их пребывания в ионной ловушке. Это в некоторых случаях может осложнять интерпретацию масс-спектра, однако, учитывая правило о непротиворечии фрагментарной формулы молекулярной, которую легко определить при наличии молекулярного иона, можно корректно отнести такие сигналы к аддуктным, а не к диагностическим. Разумеется, в отсутствие индивидуальных стандартных образцов стероидных гликозидов с разным типом агликана, нельзя убедиться в достоверности проведенной предварительной идентификации. Тем не менее полученная масс-спектральная информация для большого числа хроматографических пиков демонстрирует перспективность использования такого подхода к селективной регистрации отдельных групп физиологически активных стероидных гликозидов.

Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация сапонинов солодки. Пентациклические тритерпеновые гликозиды, присутствующие в составе экстрактов из корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) главным образом представлены глицирризином, который является одним из самых распространенных растительных подсластителей, и другими производными глицирретовой кислоты. Детектирование и количественную оценку содержания глицирризина обычно проводят в режиме МЗР для отрицательных ионов. Реализация данного режима возможна за счёт наличия в структуре глицирризина и его аналогов склонной к депротонированию карбоксильной группы. В результате направленной фрагментации депротонированных молекул гликозидов солодки в ячейке соударений наблюдаются, в основном, сигналы депротонированных молекул глюкуронозил – (1,2) – глюкуроновой кислоты (m/z 351), глюкуроновой кислоты (m/z 193) и ее производного с отщеплением молекулы воды (m/z 175). Сигнал с m/z 351 часто используют в качестве диагностического, однако в виду не специфичности структуры сахаридного остатка, такой подход вряд ли применим к образцам неизвестного состава. Наиболее интенсивные сигналы в масс-спектре глицирризина в режиме регистрации положительных ионов относятся к

фрагментам тритерпенового остова, т.е. регистрируемые значения m/z будут непосредственно связаны с типом сапогенина. Кроме того, регистрация фрагментных ионов из паттерна фрагментации агликона является предпочтительной для повышения надежности идентификации за счёт одновременного детектирования нескольких сигналов. В таблице 5 приведены наборы диагностических ионов, характерных для производных глицирретовой кислоты и других типов сапогенинового остова, которые могут присутствовать в экстрактах солодки, предположенные на основании литературных данных и опыта работы с подобными молекулами.

Таблица 5 – Значения m/z для диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов сапонинов солодки в режиме регистрации положительных ионов

Сапогенин	Сигналы из паттернов фрагментации, m/z *	Выбранные диагностические ионы, m/z
Глицирретовая кислота (GA)	471, 453, (435), 425, 407	471, 453, 425
21-гидроксиглицирретовая кислота (GA-OH) 22-ацетилглицирретовая кислота (GA-OR) 11-дезоксо-11,12-дегидро-22,24-дигидроксиглицирретовая кислота ((dOdH ₂)GA-2OH)	487, 469, 451, (441), (433)	487, 469, 451
24-гидроксиглицирретовая кислота (GA-OH')	487, 469, 441, 423	487, 469, 441
21,24-дигидроксиглицирретовая кислота (GA-2OH) 22-ацетил-24-гидроксиглицирретовая кислота (GA-OH-OR)	503, 485, 467, (449)	503, 485, 467
11-дезоксо-глицирретовая кислота ((dO)GA)	457, 439, 411, 393	457, 439, 411
11-дезоксо-24-гидроксиглицирретовая кислота ((dO)GA-OH')	473, 455, 427, 409	473, 455, 427
11-дезоксо-22-ацетилглицирретовая кислота ((dO)GA-OR)	473, 455, 437, (427)	473, 455, 437
11-дезоксо-22,24-дигидроксиглицирретовая кислота ((dO)GA-2OH)	489, 471, 453, 435, 425	489, 471, 453
11-дезоксо-глабролид ((dO)GL); 11-дезоксо-11,12-дегидроглицирретовая кислота ((dOdH ₂)GA)	455, 437, 409, 391	455, 437, 409
11-дезоксо-24-гидроксиглабролид ((dO)GL-OH); 11-дезоксо-11,12-дегидро-24-гидроксиглицирретовая кислота ((dOdH ₂)GA-OH')	471, 453, (435), 425, (407)	471, 453, 425
Глабролид (GL)	469, 451, (423), (405)	469, 451
24-гидроксиглабролид (GL-OH)	485, 467, (439), (421)	485, 467

*В скобках указаны малоинтенсивные сигналы.

Аналогично рассмотренному примеру стероидных гликозидов тритерпеновые гликозиды солодки представлены в широком химическом разнообразии, а их индивидуальные стандартные образцы получают лишь целенаправленным препаративным хроматографическим выделением. Используя литературные данные и закономерности, установленные на примере глицирризина, были проанализированы масс-спектры 18 пиков, зарегистрированные на масс-хроматограммах образцов экстрактов из корней солодки. Для каждого приходится указывать 2-3 варианта фрагментарной формулы, поскольку возможно большое количество изомерных соединений из-за изомеризации агликонов глицирретовой и гидроксиглицирретовых кислот с образованием гидрокси-производных 11-дезоксо-глабролида. Дополнительно образование изомеров возможно, вследствие гликозирования карбоксильной группы или ее замены на гидроксиметильную. Вполне вероятно, что различить эти группы гликозидов на основании ВЭЖХ-МС данных возможно, однако это не было осуществлено в виду отсутствия в продаже стандартных образцов

таких гликозидов. Тем не менее, использование групповых хроматографических профилей по выбранным диагностическим ионам (таблица 5) позволяет обнаруживать пики характерных для солодки групп соединений и, таким образом, судить о присутствии фитокомпонентов этого растения в исследуемом объекте.

Групповое ВЭЖХ-МС профилирование экстрактов, содержащих растительные гликозиды

Построение характеристичных хроматограмм по сигналам диагностических ионов аналогично по своей сути использованию ВЭЖХ-УФ хроматограмм в качестве «отпечатков пальцев». Для того чтобы сопоставить хроматографические профили исследуемых экстрактов, проводили анализ в режиме регистрации выбранных ионов, регистрируя сигналы из паттернов фрагментации нескольких изученных групп тритерпеновых гликозидов абруса, женьшеня и солодки. В результате визуального сопоставления построенных хроматограмм было показано присутствие абрусозидов из листьев *A. precatorius*, а также компонентов экстракта корня солодки в составе женьшеневого улуна, что, по-видимому, и обуславливает сладкий привкус этого чая. Оригинальные гинсенозиды женьшеня не были обнаружены в этом продукте, что также можно проиллюстрировать, сравнив хроматографические профили сигналов, характерных для ППТ и ППД гинсенозидов (рис. 12).

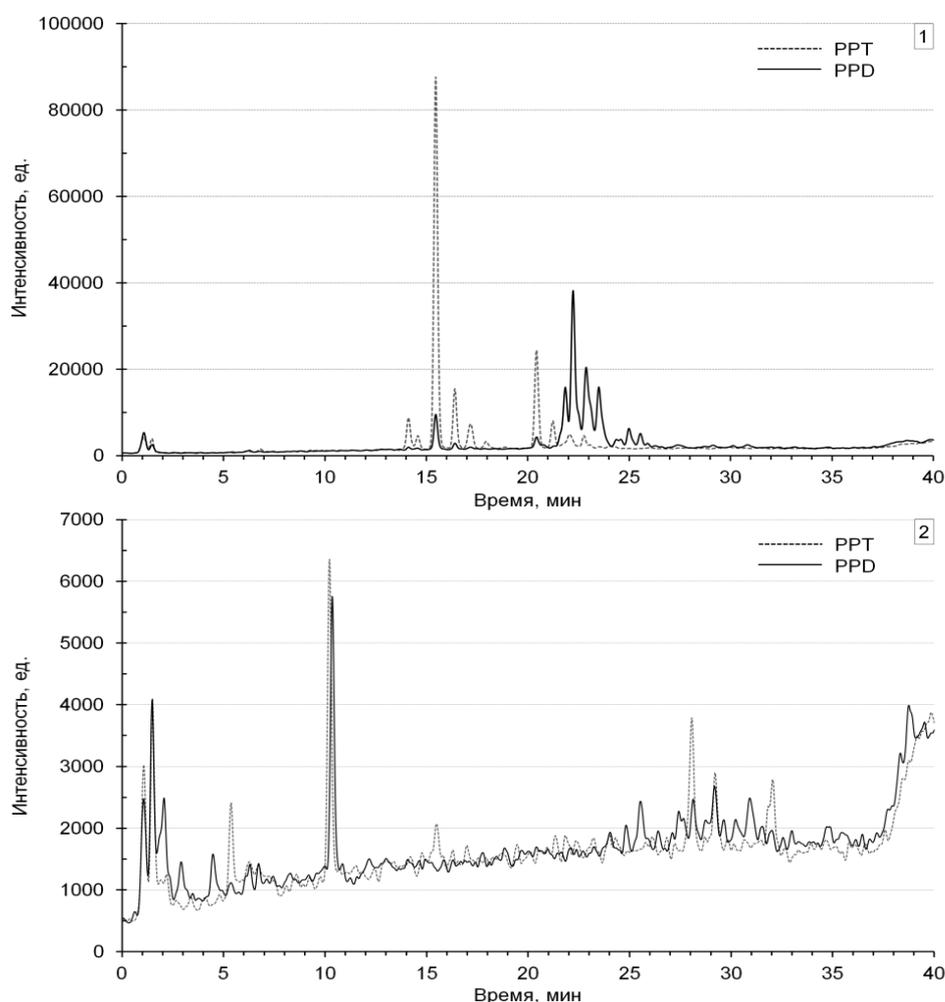


Рисунок 12– Масс-хроматограммы экстракта из сухого корня азиатского женьшеня — 1 и экстракта из женьшеневого улуна — 2, построенные путем суммирования сигналов, характерных для гинсенозидов женьшеня ППТ (PPT) и ППД (PPD) типов.

Наблюдаемые различия можно описать математически путем составления хроматомасс-спектрометрических «отпечатков пальцев», объединяя несколько хроматограмм по выбранным ионам в одну общую таблицу с площадями обнаруженных пиков. Для этого пики с площадью более 2000 ед.×мин были объединены с шагом 0.4 мин, что примерно соответствовало ширине

одного пика в данных хроматографических условиях, а отсутствующие значения заполнены нулями. При этом вместо численных значений площадей пиков использовались их относительные значения (%) нормированные на каждой из объединенных масс-хроматограмм. Далее, используя формулы (2) и (3), были рассчитаны линейные коэффициенты корреляции (ЛКК) Пирсона и индексы схожести (ИС) попарно для всех исследованных образцов соответственно.

$$\text{ИС} = \frac{x_1^t x_2}{\|x_1\| \|x_2\|} \quad (2)$$

$$\text{ЛКК} = \frac{z_1^t z_2}{\|z_1\| \|z_2\|} \quad (3)$$

где x_1 и x_2 – векторы хроматографических данных для двух образцов, а z_1 и z_2 выражены как $z_1 = x_1 - \bar{x}_1$ и $z_2 = x_2 - \bar{x}_2$ соответственно.

Из данных, представленных в таблице 6, видно, что хроматографические профили женьшеня (GR) и корейского женьшеневого чая (КТ) хорошо коррелируют между собой, что не наблюдается ни для одного из образцов «женьшеневого» улуна в паре с GR. В то же время, заметна сильная корреляция между образцами абруса (AM, AG) и GU(1-4), связанная с относительно высокой концентрацией абрусозидов в этих экстрактах.

Таблица 6 – Сравнение хроматографических профилей по коэффициентам Пирсона (верхняя правая половина) и коэффициентам схожести (нижняя левая половина)

Образец*	AG	AM	GR	КТ	GU1	GU2	GU3	GU4	SR	SRM
AG	1	0,889	0,028	0,121	0,422	0,579	0,452	0,514	0,021	0,021
AM	0,893	1	0,038	0,134	0,51	0,698	0,535	0,654	0,014	0,01
GR	0,06	0,07	1	0,571	0,088	0,033	0,051	0,042	0,024	0,021
КТ	0,159	0,171	0,588	1	0,219	0,082	0,123	0,117	0,064	0,051
GU1	0,448	0,532	0,126	0,262	1	0,74	0,689	0,776	0,007	0,022
GU2	0,597	0,711	0,072	0,131	0,755	1	0,846	0,838	0,029	0,097
GU3	0,476	0,556	0,091	0,172	0,707	0,855	1	0,727	0,181	0,254
GU4	0,535	0,669	0,079	0,163	0,788	0,847	0,742	1	0,063	0,068
SR	0,05	0,043	0,051	0,098	0,045	0,065	0,211	0,096	1	0,703
SRM	0,054	0,043	0,051	0,089	0,064	0,134	0,286	0,105	0,711	1

*AM, AG – абрус, КТ – корейский женьшеневый чай, GR – корень женьшеня, GU – «женьшеневый» улун, SR, SRM – корень солодки.

Таким образом, режим регистрации выделенных диагностических фрагментных ионов агликона обеспечивает быстрое и чувствительное обнаружение интересующей группы гликозидов, что позволяет сделать вывод о наличии или отсутствии фитоконпонентов рассматриваемого растения в составе исследуемого сложного продукта. Важно отметить, что при этом в качестве образцов сравнения могут выступать не только смеси коммерчески доступных индивидуальных стандартов соединений, но и гербарные образцы растений. Предложенный способ позволил на основании визуального и количественного сопоставления хроматомасс-спектрометрических профилей диагностических ионов тритерпеновых гликозидов идентифицировать присутствие в составе исследованных объектов экстрактов из корней солодки, женьшеня и листьев абруса молитвенного, которые могут отвечать за наличие сладкого вкуса или аромата.

Поиск характеристичных сигналов для каждой группы соединений, относящихся к каждой группе образцов может быть проведен напрямую из исходных («сырых») ВЭЖХ-МС данных. Для обработки трехмерных данных, к которым относятся данные ВЭЖХ-МС в режиме сканирования, в том числе с использованием линейной ионной ловушки, может быть использован метод параллельного факторного анализа (ПФА, PARAFAC). Уравнение

разложения исходного массива (тензора) данных методом ПФА можно записать следующим образом (4):

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (4)$$

где F - количество компонент, x_{ijk} – начальный тензор X , a_{if} , b_{jf} и c_{kf} - элементы матриц нагрузок A , B и C , соответственно, e_{ijk} – тензор остатков. В отличие от других методов разложения, таких как МГК или метод Таккера, ПФА дает уникальное (единственное) решение.

После обработки исходных ВЭЖХ-МС данных, которая включала «обрезку» хроматограмм по времени, объединение сигналов с массовыми дефектами в диапазоне от -0.35 до +0.65 и фильтрацию шумов, набор данных представлял собой тензор третьего порядка и имел размерность $n \times 600 \times 1200$, где n – число образцов. Этот тензор был подвергнут разложению по методу ПФА с количеством компонент равным трем, выбранным с помощью критерия CORCONDIA. Полученные значения CORCONDIA были для числа компонент $n = 1$ – 100%; $n = 2$ – 99.4%; $n = 3$ – 95.54%; $n = 4$ – 38.42%; $n = 5$ – 19.34%, при этом для $n = 3$ описанная дисперсия уже превышала 91%. В результате применения ПФА были получены три матрицы. Матрица счетов и две матрицы нагрузок, одна из которых представляет времена удерживания (ее размерность 600×3), а вторая размерностью 1200×3 представляет отношение массы к заряду (m/z). Вычисленные по матрице счетов расстояния от образцов чая (улуна) до центров кластеров образцов солодки, абруса и женьшеня равны 1.9 ± 0.6 , 2.4 ± 0.6 и 3.8 ± 0.4 соответственно. Образцы улуна имеют промежуточные значения по $ГК_1$, вклад которой максимален для образцов абруса, и практически нулевой вклад $ГК_2$ компоненты, по-видимому, отвечающей за профиль соединений женьшеня.

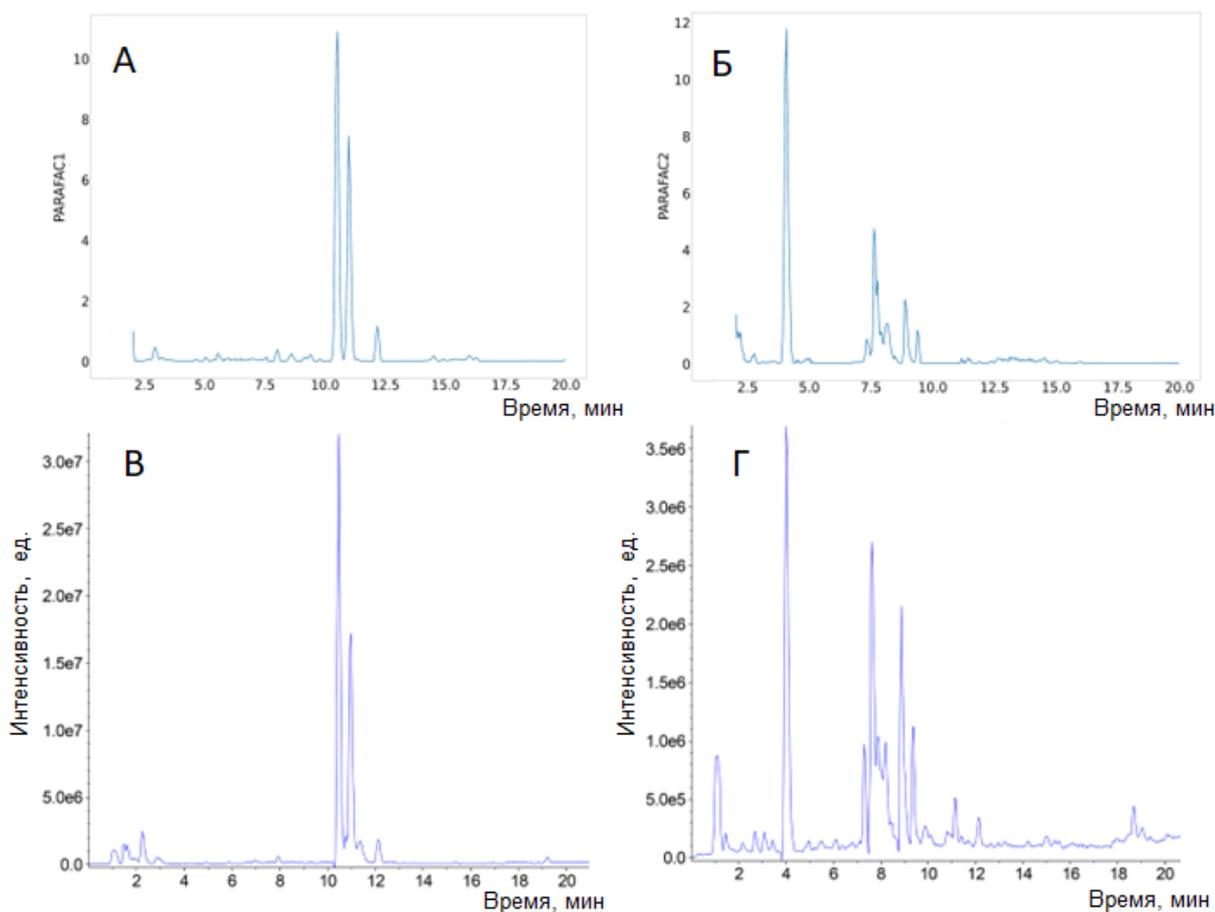


Рисунок 13 – Нагрузки по времени компоненты $ГК_1$ (А); Нагрузки по времени компоненты $ГК_2$ (Б); Суммарный сигнал по выделенным ионам с m/z 485, 467, 449, 439, 421 в образце *A. precatorius* (В); Суммарный сигнал по выделенным ионам m/z 443, 441, 425, 423, 407 в образце *P. ginseng* (Г).

Нагрузки, 1-ой и 2-ой компонент ПФА, отвечающие за времена удерживания, сравнивали с масс-хроматограммами чистых экстрактов по выделенным ионам, построенных путем суммирования интенсивностей выбранных сигналов из паттернов фрагментации исследованных сапогенинов. Для образцов *A. precatorius* хроматограммы по выделенным ионам для ионов абрусогенина имеют ту же форму, что и временные нагрузки от ГК₁ (рис. 13 А, В). Для образцов *P. ginseng* такие же масс-хроматограммы, построенные по сигналам фрагментных ионов гликозидов с ППТ и ППД остовом, аналогичны нагрузкам из ГК₂ (рис. 13 Б, Г). Аналогично при интерпретации матриц нагрузок по *m/z* было отмечено, что ионы с наибольшими весами из компоненты ГК₂ соотносятся с фрагментными характеристическими ионами гинсенозидов из экстрактов корней *P. Ginseng*, а все основные ионы ГК₁ хорошо соотносятся с характеристическими ионами фрагментов абрусогенина. Можно заключить, что ГК₁ отвечает за группу гликозидов, характерных для абруса, а ГК₂ за группу гинсенозидов женьшеня, т.е. предложенный подход позволил обнаружить характеристичные сигналы этих групповых диагностических фрагментных ионов напрямую в исходных ВЭЖХ-МС данных. Таким образом, предложенный способ анализа данных ВЭЖХ-МС в сочетании с методом ПФА потенциально может быть использован для идентификации и распознавания сладких на вкус растительных материалов (листья *A. precatorius*, корни *G. glabra* и *P. ginseng*) в различных традиционных лекарственных препаратах и пищевых продуктах. Однако такой анализ может быть использован только в качестве предварительного, и необходимо использовать стандартные образцы биомаркеров для их однозначной идентификации в исследуемых экстрактах.

Глава 6. Разработка способов группового определения тритерпеновых и стероидных сапонинов

Шестая глава посвящена разработке количественных методов анализа растительных материалов женьшеня и якорцев стелющихся, а также продуктов на их основе. Сигналы всех сапонинов с одинаковым сапогенином могут быть зарегистрированы в режиме селективного ионного мониторинга (СИМ) по выбранным диагностическим ионам из паттерна фрагментации этого сапогенина. Эти ионы могут быть также использованы и для детектирования самого сапогенина, для выделения которого следует проводить гидролиз. Таким способом может быть оценено суммарное содержание группы сапонинов с заданным типом сапогенина. Детектирование по сигналам диагностических ионов накладывает дополнительные требования на хроматографическое разделение определяемых компонентов, по сравнению с режимом МЗР, поскольку все сапонины, относящиеся к одному структурному типу сапогенина, будут мешать определению друг друга. Кроме того, в варианте низкого разрешения А+1 и А+2 сигналы изотопного расщепления для иона с молекулярной массой на 2Н меньше заданной (отличие на одну двойную связь в структурах агликонов встречается довольно часто) могут давать лишний вклад в регистрируемый сигнал в случае перекрытия хроматографических пиков, а также создавать ложные хроматографические пики на масс-хроматограммах.

Выбор условий группового разделения и определения тритерпеновых сапонинов женьшеня

Для удобства описания разделения гинсенозидов с различным тритерпеновым остовом рассчитывали величину группового коэффициента селективности по формуле (5):

$$\alpha_{\text{ппд/ппт}} = k'_{\text{ппт}}/k'_{\text{ппд}} \quad (5)$$

где $k'_{\text{ппт}}$ и $k'_{\text{ппд}}$ – среднегрупповые приведенные факторы удерживания, полученные путем усреднения факторов удерживания для пиков гинсенозидов ППТ- и ППД-типов соответственно. Изучено влияние условий хроматографического разделения на селективность группового

разделения ППТ и ППД гинсенозидов, и получены хроматограммы на колонках, заполненных сорбентами с разной структурой (таблица 7).

Таблица 7 – Достигнутые значения параметров разделения гинсенозидов на различных колонках

Колонка	Состав ПФ	$k'_{\text{ППТ}}$	$k'_{\text{ППД}}$	$\alpha_{\text{ППД/ППТ}}$	R_s			
					R_{g1}/R_e	RT_5/F_{11}	R_{g2}/R_{h1}	R_{b2}/R_{b3}
Acclaim C18	H ₂ O/CH ₃ CN/ CH ₃ OH	0.6	1.1	1.9	1.1	1.3	1.2	2.3
Hypersil GOLD aQ	H ₂ O/CH ₃ CN	0.9	2.2	2.5	0.9	0.7	< 0.2	0.6
Hypersil Gold C8	H ₂ O/CH ₃ CN	1.3	3.2	2.5	0.9	2.1	< 0.2	< 0.2
Cosmosil cholester	H ₂ O/CH ₃ CN	0.9	2.3	2.5	2.5	< 0.2	0.4	0.6
Cosmosil cholester	H ₂ O/CH ₃ CN/ CH ₃ OH	0.6	1.6	3.0	2.4	< 0.2	< 0.2	1.2
Hypersil Gold PFP	H ₂ O/CH ₃ CN	4.5	20.3	4.6	1.7	2.7	1.7	1.4

Колонка Hypersil Gold PFP (150 × 21,3 мкм) заполнена сорбентом, представляющим собой силикагель с привитыми пентафторфенильными группами. При проведении разделения стандартной смеси гинсенозидов женьшеня в режиме градиентного элюирования на сорбенте с пентафторфенильными заместителями, в силу их более полярной природы, по сравнению с сорбентом с октадецильными заместителями, наблюдаются меньшие значения времен удерживания. При этом наблюдается приемлемое разрешение для критических пар гинсенозидов и высокий групповой коэффициент селективности – 4.6. На хроматограмме (рис.14) можно отметить полное разделение ППТ и ППД групп гинсенозидов женьшеня.

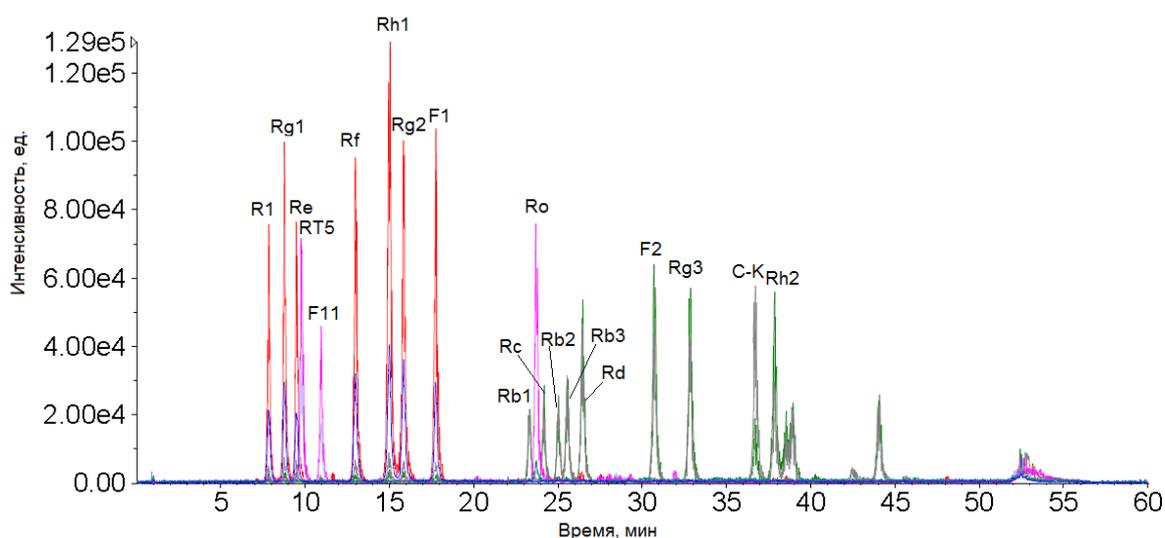


Рисунок 14 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов на колонке Hypersil Gold PFP в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый - m/z 425.3.

Тем не менее, эффективность разделения на колонке с C18 сорбентом была несколько выше, что, особенно важно для пиков слабополярных гинсенозидов, повышенная чувствительность детектирования которых необходима из-за небольшого их содержания в экстрактах. По этой причине для количественной оценки содержания гинсенозидов использовали выбранные условия разделения как на колонке, заполненной пентафторфенильным сорбентом, так и сорбентом с привитыми группами C18.

Количественная оценка содержаний большого числа компонентов может быть осуществлена с применением метода количественного анализа многокомпонентной системы (КАМС). Особенно выгодным использование такого подхода, основанного на вычислении относительных факторов отклика (ОФО) для детектируемых соединений, оказывается в случае ограниченной доступности или высокой стоимости стандартных образцов отдельных определяемых соединений. По одной точке (на одном уровне концентрации) ОФО может быть рассчитан по формуле (6):

$$\text{ОФО} = \frac{S_s/C_s}{S_x/C_x} \quad (6)$$

где C_x — концентрация определяемого соединения, C_{st} — концентрация соединения, принятого за эталонное (далее «эталонное соединение»), S_x , S_s — величины аналитического сигнала (в данном случае площадь хроматографического пика) определяемого и эталонного соединения соответственно. Расчет факторов отклика проводили с использованием площадей пиков по сигналам наиболее интенсивных фрагментных ионов сапогенина, а также по их сумме. Сравнивали значения факторов, полученные и по другим способам расчёта: многоточечном (усреднение ОФО, рассчитанных на разных уровнях концентраций) и способом тангенсов (по отношению коэффициентов наклона градуировочных функций). Показано, что способ расчета ОФО по тангенсам углов наклона градуировочных зависимостей дает более точные результаты определения гинсенозидов методом КАМС. При малых концентрациях референтного и определяемого соединений наблюдаются сильные флуктуации ОФО, в связи с чем минимальное значением рабочего диапазона концентраций устанавливали равным 50 – 60 нг/мл.

Внедрение метода КАМС в лабораторную практику требует проверки устойчивости значений ОФО при изменении параметров проведения эксперимента. В отличие от хорошо зарекомендовавшего себя варианта реализации метода ВЭЖХ-УФ-КАМС, где отклик УФ-детектора является достаточно стабильным, разрабатываемый ВЭЖХ-МС-КАМС метод требует более тщательной проверки, так как параметры, устанавливаемые в источнике ЭРИ масс-спектрометра, сильно влияют на эффективность ионизации анализируемых соединений. Более того, эффективность ионизации и распыления и, как следствие, ФО МС-детектора зависят от состава подвижной фазы. Данные о влиянии на стабильность значений ФО параметров разделения и МС-детектирования, варьируемых широким диапазоне, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Значения ОСКО, % для ОФО гинсенозидов, рассчитанные при варьировании условий их ВЭЖХ-МС определения на разном оборудовании

Параметр	ОСКО*, %							
	R ₁	RT ₅	Rh ₁	Rc	Ro	Rb ₃	Rg ₃	Rh ₂
Скорость потока	2	2	2	4	3	2	5	7
Температура колонки	7	2	1	7	2	1	5	5
Объем ввода пробы	1	1	2	2	3	2	5	8
Концентрация МК	11	8	5	5	2	3	2	3
Температура ЭРИ	7	10	4	8	7	8	8	7
Потенциал декластеризации	8	79	10	5	29	9	9	10
Входной потенциал	7	25	2	5	5	4	9	11
Газ завесы	8	3	4	5	6	7	10	6
Газ(ы) распыления	4	12	4	4	3	5	7	7
Напряжение на капилляре	2	3	1	2	3	2	4	2

*ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение.

Показано, что наиболее значимыми параметрами оказались условия масс-спектрометрического детектирования, а именно: давление газа завесы, ПД и температура в источнике ионизации, в то время как при УФ-детектировании наиболее значимым параметром обычно является длина волны детектирования. Поскольку соотношение основных сигналов фрагментных ионов сапогенина зависит как от величины ПД, так и от типа используемого оборудования, повысить стабильность значений ОФО можно за счёт использования групповых реперных стандартов для каждого типа сапогенина. Суммирование сигнала по нескольким ионам также позволяет снизить вариацию ОФО между приборами. В случае применения УФ-детектора диапазон разброса значений ОФО обычно лежит в интервале 2–5 %, однако в связи с менее воспроизводимым откликом МС-детектора, наблюдаемые ОСКО для ОФО составляли 2–20 % (таблица 9).

Таблица 9 – Значения ОФО, полученные при ВЭЖХ-МС определении гинсенозидов на разном оборудовании

Гинсенозид (репер)	Прибор №1	Прибор №2	Прибор №3	Прибор №4	Прибор №5	ОСКО, %
R ₁ (Rg ₁)	1.17	1.10	1.16	1.00	1.03	7.1
Re (Rg ₁)	1.24	1.22	1.21	1.16	1.29	3.9
Rf (Rg ₁)	0.73	0.83	0.74	0.61	0.76	10.9
Rh ₁ (Rg ₁)	0.55	0.70	0.57	0.48	0.56	14.2
Rg ₂ (Rg ₁)	0.59	0.69	0.59	0.48	0.60	12.7
F ₁ (Rg ₁)	0.76	0.75	0.76	0.93	0.91	10.9
Rc (Rb ₁)	0.94	0.83	0.94	0.81	0.73	10.4
Rb ₂ (Rb ₁)	0.89	0.92	0.91	0.92	0.89	1.9
Rb ₃ (Rb ₁)	0.72	0.67	0.74	0.69	0.65	5.0
Rd (Rb ₁)	0.45	0.31	0.41	0.35	0.31	16.8
F ₂ (Rb ₁)	0.31	0.24	0.35	0.34	0.29	14.5
Rg ₃ (Rb ₁)	0.34	0.26	0.37	0.25	0.24	20.3
C-K (Rb ₁)	0.42	0.35	0.41	0.39	0.40	6.6
RT ₅ (F ₁₁)	0.48	0.66	0.48	0.64	0.76	20.2

Проверку применимости разработанного способа ВЭЖХ-МС-КАМС определения гинсенозидов проводили, в том числе, на разном оборудовании путем анализа образцов высушенных корней азиатского и американского женьшеня, корейского женьшеневого чая, красного женьшеня и биодобавки, содержащей женьшеневый экстракт. Межлабораторная вариация результатов определения содержания гинсенозидов, как правило, составляла менее 10 % как методом внешнего стандарта, так и методом КАМС. Следует отметить, что относительная ошибка метода (ОМ) также не превышала 10–13 % для большинства измеренных концентраций. Таким образом, разработанный способ может быть использован в качестве альтернативы традиционному ВЭЖХ-УФ (или ВЭЖХ-МС) определению гинсенозидов с использованием метода внешнего стандарта даже при проведении анализа в разных лабораториях.

Выбор условий группового определения стероидных сапонинов якорцев стелющихся и диоскореи

Градуировочные зависимости для протодиосцина, диосцина и диосгенина строили в диапазоне содержаний 15–2000 нг/мл, используя площади пиков по сигналам выбранных ранее диагностических ионов с m/z 415, 397 и их сумме. Как и в случае гинсенозидов женьшеня, осуществление расчётов по суммарному сигналу фрагментных ионов сапогенина приводит к меньшим вариациям значений ОФО, по сравнению с использованием только одного наиболее интенсивного диагностического иона. В таблице 10 приведены значения ООМ (%) между методом внешнего стандарта и тремя вариантами метода КАМС, рассчитанные для модельного раствора с концентрацией сапонинов на уровне 125 нг/мл.

Таблица 10 – Значения ОФО и ООМ (%) для протодиосцина и диосгенина (репер – диосцин), вычисленные тремя разными способами.

Ион, m/z	Протодиосцин			Диосгенин		
	Расчет по одной точке (ООМ, %)	Многоточечный способ (ООМ, %)	Способ тангенсов (ООМ, %)	Расчет по одной точке (ООМ, %)	Многоточечный способ (ООМ, %)	Способ тангенсов (ООМ, %)
415	0.110 (9)	0.107 (6)	0.111 (11)	1.70 (13)	1.85 (4)	1.68 (14)
397	0.066 (19)	0.047 (13)	0.053 (0.3)	1.88 (16)	1.81 (13)	1.89 (17)
Σ 415 и 397	0.102 (5)	0.102 (4)	0.096 (1.5)	1.84 (1.1)	1.88 (3)	1.77 (3)

Из данных таблицы 10 следует, что значения ОФО, вычисленные по сигналам разных ионов, отличаются незначительно, однако наименьшая ошибка вычисления концентрации, по сравнению с методом внешнего стандарта, оказалась при использовании суммарного сигнала двух ионов и метода расчета ОФО по отношению тангенсов угла наклона градуировочных зависимостей. Пределы обнаружения составили 5 нг/мл при определении диосцина, 10 нг/мл при определении протодиосцина и 20 нг/мл для диосгенина. Расчет содержаний протодиосцина в экстрактах проводили методом внешнего стандарта и методом КАМС, при этом значения ООМ оказались менее 10 % (табл. 11).

Таблица 11 - Сравнение результатов определения содержания диосцина, протодиосцина и диосгенина в образцах экстрактов из растения *T. terrestris*

Компонент	Растительный материал			Этанольный экстракт (сухой)		
	S_{BC} , мг/г	$S_{КАМС}$, мг/г	ООМ, %	S_{BC} , мг/г	$S_{КАМС}$, мг/г	ООМ, %
Протодиосцин	0.35±0.03	0.37±0.03	7	39±3	41±3	5
Диосцин	0.008±0.0001	–	–	2.8±0.2	–	–
Диосгенин	<0.002	<0.002	–	<0.1	<0.1	–

Таким образом, разработанный способ одновременного ВЭЖХ-МС-КАМС определения протодиосцина, диосцина и диосгенина в экстрактах из растительного сырья позволяет проводить адекватную оценку содержаний этих анализов в растительных экстрактах, уменьшая расход индивидуальных стандартных образцов.

Определение суммарного содержания женьшеневых сапонинов методом ВЭЖХ-МС с предварительным гидролизом

Ранее было показано, что путем гидролиза можно перевести гликозиды абруса (абрусозиды) в единую форму – их агликон (абрусогенин). Помимо задач идентификации и

уточнения структуры исследуемых соединений этот способ может быть применен и в количественном анализе. В качестве стандартных образцов при этом могут выступать не только индивидуальные стандартные образцы агликонов (если таковые есть в наличии), но и индивидуальные стандартные образцы самых распространенных гликозидов этого растения. При этом один стандарт может быть использован для оценки целой группы гликозидов с таким же агликоном, в том случае если выполняется условие постоянства факторов отклика (соотношения аналитический сигнал / молярная концентрация), т.е. если гидролиз проходит до конца без образования значимых количеств побочных продуктов.

В результате проведенного исследования было установлено, что гидролиз ППТ и ППД гинсенозидов в кислых условиях приводит к образованию нескольких субпродуктов (метилирование, гидратация), а также образованию изомерных 20(R)- и 20(S)-агликонов в следствие повторяющегося процесса отщепления/присоединения молекул воды. Последнее также является нежелательным, поскольку такие модифицированные агликоны имеют гинсенозиды в некоторых фитопrodukтах, например, обработанном паром красном женьшене и корейском гранулированном женьшеневом чае, а следовательно их содержание необходимо определять отдельно. В случае проведения щелочного гидролиза с метилатом натрия ППТ и ППД оказались основными продуктами реакции для гинсенозидов Rg₁, Rf, Rh₁, Re и Rb₁, Rd, Rb₃ соответственно. Эпимеризации продуктов реакции не наблюдалось. Гидролиз проводили, варьируя количества добавляемого метилата натрия (1.5, 3, 8 и 12 мг) и 4 вида растворителей (метанол, ацетонитрил, диметилсульфоксид и пиридин). Реакцию проводили при температуре 80 – 110 °С в течение 3 – 8 ч. При этом только в среде ацетонитрила получалось добиться образования агликонов, свободных от побочных продуктов, с высоким выходом. Для всех исследованных ППТ гинсенозидов остаточное содержание в реакционной смеси не превышало 6.1% (2.9% для Rg₁, 5.3% для Rf, и 6.1% для Rh₁), в то время как для ППД гинсенозидов пики непрореагировавших сапонинов отсутствовали на хроматограммах. По результатам проведенных экспериментов было установлено, что оптимальными являются следующие условия проведения гидролиза: масса реагента, 8 мг метилата натрия; продолжительность, 3 ч; температура, 100 °С. Однако, если для стандартных смесей гинсенозидов наблюдались высокие выходы реакции в данных условиях, то на хроматограммах гидролизатов исследованных растительных экстрактов были видны интенсивные пики моногликозидов. Увеличение концентрации реагента не позволяло решить эту проблему. При этом суммарные площади пиков ППТ и ППД гинсенозидов на хроматограммах разбавленных экстрактов были меньше площадей пиков на хроматограммах стандартных смесей (5 мкг/мл), а, следовательно, добавленный реагент не полностью расходовался на их превращение в соответствующие целевые агликоны и вступал в реакцию с другими компонентами экстрактов. Чтобы устранить это мешающее влияние, разбавленные экстракты подвергали очистке на картриджах Oasis HLB, что позволило существенно повысить выходы реакции для всех исследованных образцов.

Для построения калибровочных зависимостей смесь групповых реперных стандартов, содержащую гинсенозиды Rg₁ (ППТ), Rb₁ (ППД) и F₁₁ (ОТ), подвергали гидролизу в выбранных условиях. Диапазон концентраций составил 2 порядка: 50–5000 нг/мл ($r^2 \geq 0.99$). Полученные значения точности, оцененные методом «введено-найдено», оказались в диапазоне от 95.5% до 105.5%. ОСКО для наиболее разбавленного раствора было на уровне менее 12% и было меньше 8.5% в остальных случаях. Молярные факторы отклика были схожи для гинсенозидов с одинаковым агликоном. Таким образом, метрологические характеристики предложенного подхода являются удовлетворительными и позволяют применять его для определения валовых групповых содержаний гинсенозидов. Для ППТ гинсенозидов, суммарные содержания,

определенные после проведения гидролиза в исследованных образцах, значительно превосходят полученные путем суммирования содержаний основных гинсенозидов, которые обычно используют при оценке качества женьшеневого сырья. Для ППД гинсенозидов полученные двумя способами значения оказались близки, поскольку, доля нескольких основных гинсенозидов ППД-типа (Rb_1 , Rb_2 , Rb_3 , Rc , Rd) значительно превосходит вклад в суммарное содержание для других представителей этой группы. Чтобы нормировать валовые содержания каждой группы гинсенозидов в мг/г следует взять в качестве репера гинсенозид, молярная масса которого будет наиболее близка к средневесовой. Так, для группы ППТ гинсенозидов характерно одновременное присутствие малонил-производных для сапонинов с тремя сахаридными остатками (Re , R_1), и небольших моногликозидов (Rh_1 , F_1), это приводит к тому, что пересчет молярной концентрации на дигликозид (Rg_1) представляется наиболее удачным, кроме того, именно он является одним из основных представителем этой группы. В случае ППД гинсенозидов – очень большая доля приходится на Rb_1 , Rb_2 , Rb_3 и Rc , которые обладают практически одинаковым молекулярным весом, поэтому в качестве репера может быть использован гинсенозид Rb_1 . При этом удобно одновременно использовать стандартные образцы Rg_1 и Rb_1 для оценки их индивидуального содержания и соотношения в исследуемом растительном сырье или экстракте, т.е. фармакопейных показателей. Псевдогинсенозид F_{11} доминирует среди других представителей этой группы ОТ-гинсенозидов в американском женьшене (*P. quinquefolius*) и характеристическим биомаркером этого вида женьшеня. Таким образом, можно порекомендовать использование гинсенозидов Rg_1 , Rb_1 и F_{11} в качестве групповых реперных стандартных соединений для определения валового группового состава сапонинов женьшеня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты позволяют говорить о создании и развитии новой методологической базы для применения метода ВЭЖХ-МС в фитохимических исследованиях и контроле качества лекарственных средств и продуктов на растительной основе. Можно выделить две основные предложенные стратегии использования метода ВЭЖХ-МС для решения задач в этих областях: целевой скрининг в режиме мониторинга заданных реакций и групповой скрининг в режиме сканирования и селективного мониторинга выбранных диагностических ионов. Основным достоинством первого предложенного подхода является его высокая достоверность, обусловленная селективным детектированием и использованием индивидуальных стандартных образцов. Недостатками же являются ограниченная список заранее определенных целевых соединений-маркеров информативность и затратность анализа, связанная с необходимостью анализировать дорогостоящие стандартные образцы в тех же условиях, что и исследуемые объекты. Тем не менее целевой ВЭЖХ-МС скрининг в случае растительных экстрактов и смешанных продуктов на их основе является адекватной и в некоторых случаях необходимой заменой традиционному анализу методами ТСХ и ВЭЖХ-УФ из-за их многокомпонентного состава и наложения хроматографических пиков.

Основное внимание в работе было уделено развитию группового анализа растительных препаратов методом ВЭЖХ-МС. Для решения задачи оптимизации условий извлечения аналитов перспективным оказалось использование группового выхода (D_n), определяемого по площадям пиков на хроматограммах, в сочетании с различными схемами экспериментального дизайна Тагучи. Удалось добиться высоких степеней извлечения ультразвуковой экстракцией стероидных сапонинов из растительных материалов и клеточной культуры диоскорей, а также

сахаров и сахароспиртов из различных видов хвои. Аналогичный подход был позднее применен другими авторами для оптимизации условий дериватизации для групп аналитов.

Установление общих закономерностей фрагментации тритерпеновых и стероидных сапонинов, включая образование в источнике ионизации групповых характеристичных ионов из паттернов фрагментации остовов (агликонов), позволило получать характеристичные хроматограммы, которые были использованы как для поиска и предварительной идентификации (определения фрагментарных формул) минорных соединений из этих групп, так и для сопоставления образцов между собой. Выявление сигналов таких характеристичных ионов напрямую из исходных («сырых») данных также возможно с использованием предложенного ВЭЖХ-МС-ПФА подхода, что и было продемонстрировано на примере нескольких групп сапонинов абруса, женьшеня и солодки, обладающих сладким привкусом и ароматом.

Кроме того, площади пиков на таких характеристичных хроматограммах могут быть использованы для ВЭЖХ-МС-КАМС определения как основных соединений из рассмотренных групп тритерпеновых и стероидных сапонинов, так и их структурных аналогов. Внедрение разработанного подхода в систему контроля качества растительного сырья и препаратов даже в одной лаборатории, а тем более в нескольких лабораториях (в аналогичных условиях и на схожем оборудовании), позволит существенно снизить затраты на приобретение индивидуальных стандартных образцов фитокомпонентов.

Апробация созданных методических подходов для целевого и группового скрининга, а также группового извлечения в ВЭЖХ-МС анализе растительных экстрактов продемонстрировала достоинства и перспективность применения этого метода для повышения достоверности и информативности при исследовании состава таких объектов.

Следует отметить, что исследование в методологическом плане представляется в значительной степени завершенным на данном этапе, однако в будущем предполагается как уточнение отдельных методических аспектов при внедрении в практику разработанных подходов, так и детальное изучение группового и компонентного состава многих растений, используемых в традиционной медицине в нашей и соседних странах. Накопление такой научной базы позволит не только найти новые применения используемому растительному сырью, но и разработать более эффективные и информативные способы контроля его качества. Например, отнесение определенного лекарственного действия к отдельным группами фитокомпонентов позволит отвязать требования к составу препарата от вида и части растения и привязать их к детальному групповому химическому составу (при сохранении указания на растительный источник), что положительно скажется как на практике применения этих средств в рамках доказательной медицины, так и их безопасности.

Развитие идей, представленных в настоящей работе, в части повышения информативности анализа неразрывно связано с использованием более дорогостоящего и сложного оборудования, в том числе жидкостных хроматомасс-спектрометров высокого разрешения. Для структурирования этих направлений развития в главе 1 «Применение метода жидкостной хроматомасс-спектрометрии в фитохимическом анализе» приведен исчерпывающий обзор предложенных в последние два десятилетия и применяемых в современном фитохимическом анализе способов, процедур и подходов, разработанных на основе метода ВЭЖХ-МС в варианте низкого и высокого разрешения. Следует отметить, что среди описанных решений как в настоящей работе, так и работах других авторов, подавляющее большинство так или иначе направленно на групповое обнаружение, идентификацию и определение компонентов, что естественным образом обусловлено наличием в составе растений различных фитохимических групп компонентов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комплекс методик для контроля качества растительного сырья, основанных на целевом ВЭЖХ-МС определении биомаркеров в режиме мониторинга заданных реакций. Выбранные условия ВЭЖХ разделения и МС детектирования для 52 биомаркеров (22 характеристических маркера и 30 неспецифичных маркеров качества) в экстрактах из 30 популярных лекарственных растений позволяют унифицировать процедуру анализа, что предполагает снижение временных и материальных затрат при ее внедрении в профильных лабораториях. Оценены метрологические характеристики разработанных методик.
2. С помощью разработанного способа оптимизации группового извлечения по ВЭЖХ-МС данным и с использованием экспериментального дизайна Тагучи выбраны оптимальные условия ультразвуковой экстракции сахаров и сахароспиртов из листвы хвойных растений и стероидных сапонинов из клеточных культур и растительных материалов диоскореи дельтовидной и якорцев стелющихся. Достигнуты значения группового выхода (D_n) на уровне 94 – 99%.
3. Исследована фрагментация в источнике ионизации тритерпеновых сапонинов женьшеня, солодки и абруса, а также стероидных сапонинов якорцев стелющихся и диоскореи дельтовидной, и разработана система фрагментарных формул для их предварительной идентификации (дерепликации). Выбраны условия регистрации сигналов 60 диагностических ионов для обнаружения пиков соединений из этих групп на масс-хроматограммах. Показано, что соотношение интенсивностей ионов из паттерна фрагментации сапогенина может отличаться в зависимости от структуры соединения, потенциала на входе в масс-анализатор и конструкции источника ионизации.
4. Построенные по сигналам диагностических ионов характеристичные хроматограммы могут быть использованы в качестве «отпечатков пальцев» для выявления образцов экстрактов, содержащих одни и те же группы фитокомпонентов. Предложенный для этого алгоритм обработки ВЭЖХ-МС данных был апробирован на модельном наборе экстрактов из женьшеня, солодки, абруса и ароматизированного чая (улуна). Полученные коэффициенты корреляции и индексы схожести для образцов одной группы превышали 0.7.
5. Предложен алгоритм предобработки исходных ВЭЖХ-МС данных низкого разрешения с последующим тензорным разложением по методу ПФА, который может быть использован для выявления характеристичных групповых сигналов на масс-хроматограммах растительных экстрактов. Применение предложенного способа позволило качественно оценить групповой состав тритерпеновых подсластителей в чайном продукте.
6. Разработан способ группового ВЭЖХ-МС-КАМС определения фитокомпонентов, позволяющий минимизировать затраты на индивидуальные стандартные образцы. Стабильности относительных факторов отклика удалось добиться за счет использования площадей пиков по сигналам групповых характеристичных фрагментных ионов, а также групповых реперных соединений. Проведена апробация разработанного подхода при определении тритерпеновых сапонинов женьшеня и стероидных сапонинов якорцев стелющихся. Относительная ошибка метода по сравнению с методом внешнего стандарта в идентичных условиях проведения анализа не превышала 13%.

7. Разработан подход к определению групповых валовых содержаний ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов женьшеня путем проведения щелочного гидролиза с метилатом натрия в среде ацетонитрила с последующим ВЭЖХ-МС детектированием получаемых агликонов. Показано, что для устранения мешающих компонентов экстрактов необходимо проводить твердофазную экстракцию гинсенозидов на картриджах с сорбентом Oasis HLB. Продемонстрирована удовлетворительная сходимость значений факторов отклика для разных гинсенозидов из исследованных групп, свидетельствующая о полноте прохождения гидролиза. Пределы обнаружения составили 20 – 80 нг/мл.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия»:

1. **Stavriani A.** A classification of liquid chromatography mass spectrometry techniques for evaluation of chemical composition and quality control of traditional medicines. // J. Chromatogr. A. 2020. V. 1609. Article 460501. IF (Web of Science) – 4,601. 100%;
2. Stekolshchikova E., Turova P., Shpigun O., Rodin I., **Stavriani A.** Application of quantitative analysis of multi-component system approach for determination of ginsenosides in different mass-spectrometric conditions. // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1574. P. 82–90. IF (Web of Science) – 4,601. 40%;
3. **Stavriani A.**, Stekolshchikova E., Porotova A., Rodin I., Shpigun O. Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. // J. Pharm. Biomed. Analysis. 2017. V. 132. P. 87–92. IF (Web of Science) – 3,571.40%;
4. Abashev M., Stekolshchikova E., **Stavriani A.** Quantitative aspects of the hydrolysis of ginseng saponins: Application in HPLC-MS analysis of herbal products. // J. Ginseng Res. 2021. V. 45. № 2. P. 246–253. IF (Web of Science) – 5,735. 60%;
5. Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., **Stavriani A.**, Shpigun O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. // J. App. Res. Med. Arom. Plants. 2018. V. 8. P. 75–82. IF (Web of Science) – 3.945. 40%;
6. Sarvin B., Fedorova E., Shpigun O., Titova M., Nikitin M., Kochkin D., Rodin I., **Stavriani A.** LC-MS determination of steroidal glycosides from *Dioscorea deltoidea* Wall cell suspension culture: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters by latin square design. // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2018. V. 1080. P. 64–70. IF (Web of Science) – 3.318. 40%;
7. Sarvin B.A., Seregin A.P., Shpigun O.A., Rodin I.A., **Stavriani A.N.** A novel strategy for isolation and determination of sugars and sugar alcohols from conifers. // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2018. V. 1092. P. 138–144. IF (Web of Science) – 3.318. 40%;
8. Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Zlobin I.E., Sarvin B.A., **Stavriani A.N.**, Kuznetsov V.V. Water deficit-dependent changes in non-structural carbohydrate profiles, growth and mortality of pine and spruce seedlings in hydroculture. // Environ. Exp. Bot. 2019. V. 157, P. 151–160. IF (Web of Science) – 6.028. 30%;
9. Zlobin I.E., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Sarvin B.A., **Stavriani A.N.**, Kreslavski V.D., Kuznetsov V.V. Impact of weak water deficit on growth, photosynthetic primary processes and storage processes in pine and spruce seedlings. // Photosynth. Res. 2019. V. 139. № 1–3. P. 307–323. IF (Web of Science) – 3.429. 30%;

10. **Stavriani A.**, Stekolshchikova E., Rodin I., Godovikov I., Shpigun O. Structure elucidation of sweet-tasting cycloartane-type saponins from ginseng oolong tea and *Abrus precatorius* L. leaves. // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32. № 20. P. 2490–2493. IF (Web of Science) – 2,488. 40%;
11. Turova P., Rodin I., Shpigun O., **Stavriani A.** A new PARAFAC-based algorithm for HPLC-MS data treatment: Herbal extracts identification. // Phytochem. Anal. 2020. V. 31. № 6. P. 948–956. IF (Web of Science) – 3,024. 30%;
12. **Stavriani A.**, Braun A., Rodin I., Shpigun O. The use of linear ion trap for qualitative analysis of phytochemicals in Korean ginseng tea. // Biomed. Chrom. 2013. V. 27. № 6. P. 765–774. IF (Web of Science) – 1,911. 50%;
13. **Stavriani A.**, Rodin I., Braun A., Stekolshchikova E., Shpigun O. Single-run HPLCESI-LITMS profiling of ginsenosides in plant extracts and ginseng based products. // Biomed. Chrom. 2015. V. 29. № 6. P. 853–859. IF (Web of Science) – 1,911. 50%;
14. Turova P., Stekolshchikova E., Baygildiev T., Shpigun O., Rodin I., **Stavriani A.** Unified strategy for HPLC-MS evaluation of bioactive compounds for quality control of herbal products. // Biomed. Chrom. 2018. V. 32. № 12. Article e4363. IF (Web of Science) – 1,911. 40%;
15. Родин И.А., **Ставрианиди А.Н.**, Браун А.В., Шпигун О.А., Попик М.В. Одновременное определение салидрозида, розарина и розавина в экстрактах из *Rhodiola rosea* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9. № 1. С. 61–65. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 50% (перевод: Rodin I.A., **Stavriani A.N.**, Braun A.V., Shpigun O.A., Popik M.V. Simultaneous determination of salidroside, rosavin, and rosarin in extracts from rhodiola rosea by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 13. P. 1026–1030. IF (Web of Science) – 1,237. 50%);
16. **Ставрианиди А.Н.**, Стекольщикова Е.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация и определение глицирризина в экстрактах из корня солодки и пищевых продуктах. // Аналитика и контроль. 2017. Т. 21. № 3. С. 230–240. ИФ (Scopus) – 0,553, 40%;
17. Байгильдиева Д.И., Байгильдиев Т.М., **Ставрианиди А.Н.**, Шпигун О.А., Родин И.А. Одновременное определение вогонина, скутелларина, байкалина и байкалеина в экстрактах из *Scutellariae baicalensis* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2018. Т. 15. № 1. С. 5–11. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 40% (перевод: Baygildieva D.I., Baygildiev T.M., **Stavriani A.N.**, Shpigun O.A., Rodin I.A. Simultaneous determination of wogonin, scutellarin, baicalin, and baicalein in extracts from *Scutellariae baicalensis* by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. // J. Anal. Chem. 2018. V. 73. № 14. P. 1317–1322. IF (Web of Science) – 1,237. 40%);
18. Байгильдиева Д.И., Браун А.В., **Ставрианиди А.Н.**, Родин И.А. Хроматомасс-спектрометрическое определение Элеутерозида В и Элеутерозида Е в адаптогенных экстрактах из растения *Eleutherococcus senticosus*. // Масс-спектрометрия. 2019. Т. 16. № 4. С. 299–304. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 40% (перевод: Baygildieva D.I., Braun A.V., **Stavriani A.N.**, Rodin I.A. Chromatography mass-spectrometry determination of Eleutheroside B and Eleutheroside E in the extracts from *Eleutherococcus senticosus*. // J. Anal. Chem. 2020. V. 75. № 14. P. 1832–1837. IF (Web of Science) – 1,237. 40%);
19. **Ставрианиди А.Н.**, Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А. Быстрый способ ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа. // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 4. С. 459–464. ИФ (Scopus) – 0,553. 50%;

20. **Ставрианиди А.Н.**, Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А., Беризовская Е.И. Одновременное определение гинсенозидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2013. Т.10. № 2. С. 129–135. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 50% (перевод: **Stavrianiidi A.N.**, Rodin I.A., Braun A.V., Shpigun O.A., Berizovskaya E.I. Simultaneous determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. // J. Anal. Chem. 2014. V. 69. № 13. P. 1252–1258. IF (Web of Science) – 1,237. 50%);
21. **Ставрианиди А.Н.**, Родин И.А., Браун А.В., Стекольщикова Е.А., Шпигун О.А. Определение биомаркеров *P. quinquefolius* в растительных материалах и коммерческих продуктах комбинированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. № 1. С. 45–52. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 40% (перевод: **Stavrianiidi A.N.**, Rodin I.A., Braun A.V., Stekolshchikova E.A., Shpigun O.A. HPLC–MS/MS determination of biomarkers of *P. quinquefolius* in plant materials and commercial products. // J. Anal. Chem. 2014. V. 69. № 14. P. 1323–1329. IF (Web of Science) – 1,237. 40%);
22. Федорова Е.С., Стекольщикова Е.А., Шпигун О.А., Родин И.А., **Ставрианиди А.Н.** Стандартизация экстрактов из корней *P. ginseng* и *P. quinquefolius* методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии. // Завод. Лабор. Диагн. Мат. 2019. Т. 85. №1. С. 18–27. ИФ (РИНЦ) – 0,491. 40% (перевод: Fedorova E.S., Stekolshchikova E.A., Shpigun O.A., Rodin I.A., **Stavrianiidi A.N.** Standardization of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* root extracts by HPLC-MS. // Inorg. Mat. 2020. V. 56. № 14. P. 1353–1361. IF (Scopus) – 0,907. 40%);
23. **Ставрианиди А.Н.**, Стекольщикова Е.А., Турова П.Н., Родин И.А., Шпигун О.А. Применение метода количественного анализа многокомпонентной системы для хроматомасс-спектрометрического определения диосгенина, диосцина и протодиосцина в экстрактах из травы *Tribulus terrestris*. // Вестн. моск. ун-та. сер. 2. химия. 2017. Т. 58. № 3. С. 144–153. ИФ (РИНЦ) – 0,778. 40% (перевод: **Stavrianiidi A.N.**, Stekolshchikova E.A., Turova P.N., Rodin I.A., Shpigun O.A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography–mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*. // Mos. Univ. Chem. Bull. 2017. V. 72. № 3. P. 135–143. IF (Scopus) – 0,544. 40%);
24. Родин И.А., **Ставрианиди А.Н.**, Браун А.В., Шпигун О.А. Современные способы идентификации и определения гинсенозидов. // Вестн. моск. ун-та. сер. 2. химия. 2013. Т. 54. № 3. С. 135–153. ИФ (РИНЦ) – 0,778. 50% (перевод: Rodin, I.A., Stavrianiidi, A.N., Braun, A.V., Shpigun, O.A. Modern methods of identifying and determining ginsenosides. // Mos. Univ. Chem. Bull. 2013. Vol. 68. № 3. P. 127–142. IF (Scopus) – 0,544. 50%);
25. **Ставрианиди А.Н.**, Байгильдиев Т.М., Стекольщикова Е.А., Шпигун О.А., Родин И.А. Новые подходы к определению и групповой идентификации физиологически активных соединений в растительных материалах и коммерческой продукции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 1. С. 67–80. ИФ (РИНЦ) – 1,139. 40% (перевод: **Stavrianiidi A.N.**, Baygildiev T.M., Stekolshchikova E.A., Shpigun O.A., Rodin I.A. New approaches to the determination and group identification of physiologically active compounds in plant materials and commercial products by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. № 1. P. 58–70. IF (Web of Science) – 1,237. 40%).

26. **Ставрианиди А.Н.**, Родин И.А., Браун А.В., Стеколыщикова Е.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А. Разработка способа определения схизандролов А и В в экстрактах из семян *Schisandra chinensis* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. // Химия раст. сырья. 2015. № 3. С. 97–104. ИФ (РИНЦ) – 0,411. 50%;
27. Суханов А.Е., **Ставрианиди А.Н.**, Крылов И.А. Наукометрическая характеристика публикационной активности авторов по использованию твердофазной экстракции при анализе стероидных сапонинов и сапогенинов (обзор). // Фармация. 2022. Т. 71. № 6. С. 5–11. ИФ (РИНЦ) – 0,433. 30%.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность д.х.н., профессору, чл.-корр. РАН Шпигуну Олегу Алексеевичу и д.х.н. Родину Игорю Александровичу за поддержку в научно-исследовательской деятельности и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы, за ценные советы и наставления; д.х.н., профессору, академику РАН Золотову Юрию Александровичу, д.х.н., доценту, профессору РАН Проскурнину Михаилу Алексеевичу, д.х.н., профессору, чл.-корр. РАН Буряку Алексею Константиновичу, д.х.н., профессору Темердашеву Зауалу Ахлоовичу, д.х.н., профессору Лебедеву Альберту Тарасовичу, д.х.н., профессору Пирогову Андрею Владимировичу, д.х.н., профессору Григорию Ильичу Цизину, д.х.н., профессору Рыбальченко Игорю Владимировичу, д.х.н. Ревельскому Александру Игоревичу, д.х.н., профессору Нестеренко Павлу Николаевичу и к.х.н. Самохину Андрею Сергеевичу за ценные замечания и комментарии при подготовке диссертации; к.х.н. Стеколыщиковой Елене Алексеевне, к.х.н. Туровой Полине Николаевне, к.м.н. Суханову Антону Евгеньевичу, к.х.н. Брауну Аркадию Владимировичу, к.х.н. Байгильдиеву Тимуру Муратовичу, к.х.н. Байгильдиевой Диларе Иршатовне, Федоровой Елизавете Сергеевне и Сарвину Борису Андреевичу за плодотворную совместную работу и поддержку; всем коллегам - сотрудникам кафедры аналитической химии.

Автор выражает благодарность коллективу кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, в частности зав. кафедрой, д.б.н., профессору Носову Александру Михайловичу и к.б.н. Кочкину Дмитрию Владимировичу, сотрудникам гербария МГУ имени М.В.Ломоносова, в особенности куратору гербария, д.б.н. Серегину Алексею Петровичу, коллективу лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ФГБУН ИФР РАН, в частности зав. лабораторией, д.б.н., профессору, член-корр. РАН Кузнецову Владимиру Васильевичу, к.б.н. Иванову Юрию Валерьевичу и к.б.н. Карташову Александру Валерьевичу, за предоставленные образцы клеточных культур и растительных материалов и обсуждение результатов экспериментов.

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории ядерного магнитного резонанса ФГБУН ИНЭОС РАН, в частности д.х.н. Годовикову Ивану Александровичу за помощь в проведении ЯМР экспериментов.