

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Ставрианиди Андрей Николаевич

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

Специальность – 1.4.2 — Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва — 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений	6
Введение	8
Глава 1. Применение метода жидкостной хромато масс-спектрометрии в фитохимическом анализе.....	19
1.1 Выделение компонентов из растительного сырья перед проведением ВЭЖХ-МС анализа.....	22
1.1.1 Извлечение биоактивных компонентов методом мацерации.....	23
1.1.2 Извлечение биоактивных компонентов методом Сокслета	25
1.1.3 Извлечение биоактивных компонентов методом экстракции под давлением и сверхкритической флюидной экстракции	27
1.1.4 Извлечение биоактивных компонентов методом ультразвуковой и микроволновой экстракции.....	30
1.2 Использование МС и ВЭЖХ-МС методов для определения структуры метаболитов растений.....	34
1.2.1 De novo идентификация с использованием МС и МС/МС данных	36
1.2.2 Дерепликация с использованием МС и МС/МС данных	38
1.2.3 Предиктивный скрининг метаболитов.....	47
1.3 Целевое ВЭЖХ-МС определение биомаркеров растений	47
1.4 Ненаправленное ВЭЖХ-МС профилирование метаболитов растений	50
1.5 Кластеризация образцов с использованием исходных («сырых») МС и ВЭЖХ-МС данных	58
1.5.1 Использование прямого МС анализа для распознавания образов	58
1.5.2 Использование ВЭЖХ-УФ-МС анализа для распознавания образов.....	60
1.6 Групповой анализ	63
1.6.1 Мониторинг диагностических ионов и нейтральных потерь	63
1.6.2 Фильтрация по дефекту массы	64
1.6.3 Применение метода молекулярных сетей	65
1.7 Классификация основанных на ВЭЖХ-МС техник, используемых в фитохимическом анализе	67
1.8 Выбор стратегии проведения фитохимического анализа	73
1.9 Выводы к главе 1	74
Глава 2. Оборудование, материалы, техника эксперимента	77
2.1 Оборудование и материалы.....	77
2.2 Техника проведения экспериментов	81
2.2.1 Схема эксперимента по целевому определению биомаркеров в экстрактах из лекарственных растений	81

2.2.2 Схема экспериментов по извлечению стероидных сапонинов из растительных материалов и суспензий клеточных культур	83
2.2.3 Схема эксперимента по извлечению сахаров и сахароспиртов из хвойных растений	85
2.2.4 Схема эксперимента по извлечению сапонинов и очистке экстрактов из женьшеневого улуна	87
2.2.5 Схема эксперимента по получению характеристичных хроматограмм и групповой идентификации компонентов в растительных экстрактах	90
2.2.6 Схема эксперимента по разработке ВЭЖХ-МС-КАМС подхода к групповому определению гинсенозидов женьшеня	92
2.2.7 Схема эксперимента по разработке ВЭЖХ-МС-КАМС подхода к групповому определению стероидных сапонинов якорцев стелющихся	95
2.2.8 Схема эксперимента по гидролизу и валовому групповому определению гинсенозидов женьшеня	96
Глава 3. Определение биомаркеров для контроля состава растительного сырья и продуктов на его основе	98
3.1 Разработка методик целевого ВЭЖХ-МС определения биомаркеров растительного сырья	101
3.1.1 Выбор условий МС/МС детектирования соединений-маркеров	101
3.1.2 Выбор условий хроматографического разделения соединений-маркеров	108
3.1.3 Оценка метрологических характеристик при определении маркеров на тройном квадрупольном масс-анализаторе 3200 QTRAP	111
3.1.4 Тестирование разработанных способов ВЭЖХ-МС/МС определения соединений-маркеров при анализе растительных экстрактов	114
3.1.5 Возможности формализации предложенной стратегии целевого ВЭЖХ-МС/МС скрининга биомаркеров	116
3.2 Выводы к главе 3	118
Глава 4. Групповое извлечение компонентов из растительных материалов .	120
4.1 Извлечение стероидных сапонинов из якорцев стелющихся	121
4.1.1 Извлечение стероидных сапонинов в условиях ультразвуковой экстракции	122
4.1.2 Экстракция стероидных сапонинов в кипящем растворителе при нормальном и пониженном давлении	126
4.1.3 Экстракция стероидных сапонинов в аппарате Сокслета	129
4.1.3 Сравнение различных техник для экстрагирования стероидных сапонинов	130
4.2 Извлечение стероидных сапонинов из растительного материала и суспензионной клеточной культуры <i>D. deltoidea</i>	132

4.2.1 Оптимизация параметров экстрагирования стероидных сапонинов в условиях ультразвуковой экстракции	132
4.2.2 Оптимизация параметров экстрагирования с применением статистического экспериментального дизайна	133
4.2.3 Проверка полученных результатов способом последовательного экстрагирования и ЭКР.....	135
4.3 Выбор условий извлечение сахаров и сахароспиртов из хвои	137
4.3.1 Выбор условий ВЭЖХ-МС определения сахаров и сахароспиртов.....	137
4.3.2 Оптимизация параметров экстрагирования с применением статистического экспериментального дизайна Тагучи $L_9 (3^4)$	140
4.3.3 Проверка полученных результатов способом последовательного экстрагирования	143
4.3.4 Аппробация предложенного подхода на образцах различных видов хвойных растений	144
4.4 Выводы к главе 4	146
Глава 5. Групповая идентификация компонентов растительного сырья.....	148
5.1 Идентификация неизвестных тритерпеновых гликозидов в составе женьшеневого чая.....	149
5.1.1 Охарактеризовывание структур гликозидов абруса на основе данных ВЭЖХ-МСВР.....	151
5.1.2 Гидролиз и выделение гликозидов женьшеневого чая	156
5.1.3 Микропрепаративное хроматографическое выделение гликозида женьшеневого улуна	161
5.1.4 Определение структур выделенных соединений методом спектроскопии ЯМР	162
5.2 Разработка способа групповой идентификации тритерпеновых и стероидных гликозидов.....	163
5.2.1 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация гинсенозидов женьшеня.....	165
5.2.2 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация стероидных сапонинов якорцев стелющихся	180
5.2.3 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация сапонинов солодки	188
5.3 Групповое ВЭЖХ-МС профилирование экстрактов, содержащих растительные гликозиды	196
5.3.1 Сравнение хроматографических профилей, построенных по выбранным диагностическим ионам.....	199
5.3.2 Сравнение хроматографических профилей, полученных в режиме сканирования	203

5.4 Выводы к главе 5	207
Глава 6. Разработка способов группового определения тритерпеновых и стероидных сапонинов	209
6.1 Выбор условий группового разделения и определения тритерпеновых сапонинов женьшеня.....	210
6.1.1 Исследование хроматографического поведения гинсенозидов	210
6.1.2 Предварительная оценка параметров отклика при определении гинсенозидов женьшеня	227
6.1.3 Разработка способа КАМС для определения гинсенозидов.....	230
6.1.4 Апробация разработанного способа определения гинсенозидов.....	243
6.2 Выбор условий группового определения стероидных сапонинов якорцев стелющихся и диоскорей	255
6.2.1 Выбор условий хроматографического разделения диосцина, протодиосцина и диосгенина	255
6.2.2 Расчет относительных факторов отклика для протодиосцина и диосгенина	256
6.2.3 Апробация разработанного подхода определения стероидных сапонинов в надземных частях растения <i>T. terrestris</i>	257
6.3 Определение суммарного содержания женьшеневых сапонинов методом ВЭЖХ-МС с предварительным гидролизом	259
6.3.1 Кислотный гидролиз сапонинов женьшеня	259
6.3.2 Щелочной гидролиз сапонинов женьшеня.....	262
6.3.3 Оценка метрологических характеристик разработанного подхода к гидролизу женьшеневых сапонинов	264
6.4 Выводы к главе 6	268
Заключение	270
Общие выводы	273
Список литературы.....	276
Приложение А. Данные ЯМР-спектроскопии.	315
Приложение Б. Паттерны фрагментации сапогенинов.....	321
Приложение В. Дополнительные рисунки и таблицы к главе 5.	335

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БМ	биомаркер
БД	база данных
ВОЗ	всемирная организация здравоохранения (WHO)
ВП	входной потенциал
ВС	внешний стандарт
ВР	высокое разрешение
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГК	главная компонента
ГХ	газовая хроматография
ГФ	гидрофильная хроматография
ДИС	диссоциация, индуцированная соударениями
ДМД	диодноматричное детектирование
ДНП	диагностические нейтральные потери
ДФА	дискриминантный функциональный анализ
ДФИ	диагностические фрагментные ионы
ЖХ	жидкостная хроматография
ИДСР	испарительное детектирование по светорассеянию
ИЗА	информационно-зависимый анализ
ИК	инфракрасный
ИКА	иерархический кластерный анализ
ИЦР	ионно-циклотронный резонанс
КАМС	количественный анализ многокомпонентной системы
ЛИЛ	линейная ионная ловушка
МАЛДИ	матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
МГК	метод главных компонент
МЗР	мониторинг заданных реакций
МВЭ	микроволновая экстракция
МС	масс-спектрометрия
МСИ	MSI, metabolomics standards initiative
МЭ	матричный эффект
МЧНК-ДА	метод частичных наименьших квадратов с дискриминантным анализом
НП	натуральный продукт
НЭС	нормированная энергия соударений
ОДМ	относительный дефект массы
ОК	олеаноловая кислота
ОТ	окотиллол
ООМ	относительная ошибка метода

ОФО	относительный фактор отклика
ПД	потенциал декластеризации
ПИД	пламенно-ионизационный детектор
(П)ПД	(прото)панаксадиол
(П)ПТ	(прото)панаксатриол
ПФА	параллельный факторный анализ (PARAFAC)
СИМ	селективный ионный мониторинг
СФЭ	сверхкритическая флюидная экстракция
ТСХ	тонкослойная хроматография
ТФУК	трифторуксусная кислота
УЗВ	ультразвуковая ванна
УЗЭ	ультразвуковая экстракция
УФ	ультрафиолетовый
ФДМ	фильтрация дефектов массы
ФЛ	флуоресцентный
ФО	фактор отклика
ФП	Фурье-преобразование
ХИАД	химическая ионизация при атмосферном давлении
ЭКР	экстракция кипящим растворителем
ЭКРПД	экстракция кипящим растворителем при пониженном давлении
ЭРД	экстракция растворителем под давлением
ЭРИ	электрораспылительная ионизация
ЭС	экстракция в аппарате Сокслета
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

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 обнаружения и определения фитокомпонентов в лекарственном растительном сырье и продуктах на его основе методом ВЭЖХ-МС.

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных при участии автора, а по ряду направлений – под его руководством, направленных на создание новых способов извлечения и высокоинформативного и высокоселективного обнаружения и определения компонентов из разных фитохимических групп в растительном сырье и продуктах на его основе. Среди этих разработок – новые способы оптимизации многокомпонентного извлечения

стероидных сапонинов, сахаров и сахароспиртов, построение и сопоставление характеристичных хроматограмм («отпечатков пальцев») по сигналам групповых характеристичных фрагментных ионов, а также создание новых способов определения тритерпеновых и стероидных сапонинов с использованием гидролиза и метода количественного анализа многокомпонентной системы (КАМС).

Отдельные аспекты группового анализа методом ВЭЖХ-МС, его особенности, а также вопросы применения этого подхода при обнаружении, идентификации и определении фитокомпонентов в растительных объектах рассмотрены автором, в том числе в опубликованных обзорных статьях (1–4):

1. 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.

2. Ставрианиди А.Н., Байгильдиев Т.М., Стеколыщикова 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.

3. Stavrianidi A. A classification of liquid chromatography mass spectrometry techniques for evaluation of chemical composition and quality control of traditional medicines. // J. Chromatogr. A. 2020. Vol. 1609. Article 460501.

4. 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%.

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 абругенина.

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 протопанаксациолильных (ППД), протопанаксатриолильных (ППТ) и окотиллолильных (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 работы:

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 Symposia 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.

ГЛАВА 1. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ФИТОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ¹

Описание проблемы. Постановка задачи. Традиционная медицина опирается на применение хорошо известных натуральных продуктов (НП), вторичных метаболитов растений [1] и других живых организмов. Разнообразные метаболиты входят в эффективный арсенал, позволяющий растениям, грибам, морским организмам и животным, защищаться от различных природных и техногенных источников стресса. Специалисты по медицинской химии используют НП в качестве структурной основы при синтезе новых лекарств, обладающих повышенной эффективностью и безопасностью [2–4]. Наибольшее число таких соединений обнаружили в растениях, однако следует отметить, что общие подходы к выделению и идентификации вторичных метаболитов из различных источников во многом одинаковы. Фитохимический анализ снабжает исследователей в данной области необходимой информацией об изучаемых растениях. Химический состав и метаболический профиль растений, используемых в пищевой и других областях промышленности, также устанавливают с помощью современных высокоинформативных методов анализа. Простота пробоподготовки и более высокая чувствительность в сравнении с ¹H ЯМР, а также более широкий диапазон масс и возможность непосредственно обнаруживать соединения из классов, недоступных (без применения дериватизации) для ГХ-МС анализа [5], сделали метод ВЭЖХ-МС одним из наиболее часто применимых инструментов в фитохимических и метаболомных исследованиях [6,7].

Одной из главных задач является идентификация метаболитов, решение которой стало настоящим «бутылочным горлом» в ТМ. Причиной этого является

¹ При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Stavrianidi 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%; 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%; Ставрианиди А.Н., Байгильдиев Т.М., Стекольников 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 высокoeffективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 1. С. 67–80. ИФ (РИНЦ) – 1,139. 40%; 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%.

химическое многообразие НП. Известно более 500 000 метаболитов растений [8], что значительно превышает число соединений, участвующих в метаболизме человека. Из-за большого числа ошибочных идентификаций [9], стало необходимым внедрение доказательного (evidence-based) подхода при исследовании биоактивности НП в традиционной медицине [10]. По этой причине применение в данной области новых высокоинформативных ВЭЖХ-МС методов ненаправленного (untargeted) и многоцелевого (multi-targeted) анализа должно быть сопряжено с использованием более надежных методов структурного анализа, таких как рентгеновская спектроскопия [11] и ЯМР-спектроскопия [12]. Тем не менее, МС с мягкими методами ионизации позволяет определить молекулярную массу исследуемого соединения, что является ключевым шагом при его идентификации [13]. Кроме того, использование тандемной МС позволяет провести быструю предварительную идентификацию и дерепликацию² известных соединений и их аналогов в изучаемых экстрактах, что значительно сужает поле для более детальных исследований [14,15]. Так, согласно рекомендациям МСИ (Metabolomics Standards Initiative, MSI) [16], проведение идентификации на самом высоком уровне достоверности (МСИ уровень 1) требует сравнения нескольких ортогональных параметров (например, времени удерживания и сигналов в масс-спектре) для аутентичного стандарта и обнаруженного соединения в одной и той же лаборатории и в одних и тех же условиях анализа. Второй уровень достоверности (МСИ уровень 2, “предположительно аннотируемое соединение”) может быть достигнут путем сопоставления с ранее опубликованным масс-спектром или спектрами структурных аналогов. На третьем уровне (МСИ уровень 3) идентифицируют лишь принадлежность к какому-то химическому классу на основании схожести сигналов в МС² спектре данного соединения и спектрах других соединений, относящихся к этому классу. Таким образом, используя данные ВЭЖХ-МС/МС анализа, можно отделить соединения, которым можно присвоить второй уровень, от принадлежащих к уровням 3 и 4 («неизвестное соединение»), и далее сосредоточить на последних основные усилия по выделению и структурному исследованию [15].

²Дерепликация - быстрая идентификация уже известных, ранее структурно охарактеризованных соединений.

Другой проблемой является недостаток коммерчески доступных индивидуальных стандартных образцов, что осложняет не только идентификацию, но и проведение количественного анализа в фитохимии [13]. Хотя существуют методы количественного сопоставления образцов в ненаправленном анализе, классический целевой анализ полностью полагается на такие стандартные образцы, которые получают непосредственным выделением из растительных экстрактов, и крайне редко синтетическим путем. Ненаправленный ВЭЖХ-МС анализ применяют для получения информации обо всех детектируемых метаболитах в исследуемом экстракте, обычно в целях метаболического профилирования или получения метаболического отпечатка пальца [17]. Метаболическое профилирование позволяет сравнивать содержания метаболитов по отдельности, находя статистические отличия между группами изучаемых образцов. В свою очередь метаболические отпечатки пальцев могут быть использованы для классификации образцов по суммарному паттерну наблюдаемых сигналов, безотносительно идентификации соединений, отвечающих этим сигналам. Применение этих методов требует работы с большими объемами данных. Дополнительно, ВЭЖХ-МС методы могут быть использованы для проведения группового (group-targeted, class-targeted) анализа, который обычно проводят методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [18], ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (ФП-ИЦР) [19] и флуоресцентной (ФЛ) спектроскопии [20]. Существуют довольно подробные обзорные статьи, в которых рассмотрены многие вопросы применения основанных на ВЭЖХ-МС аналитических стратегий, используемых для целевого анализа, дерепликации и ненаправленного метаболического профилирования [13,14,21–23]. Существуют также некоторые упоминания о применении метода ВЭЖХ-МС для группового анализа сложных смесей [24–34]. Новые варианты применения сочетания ВЭЖХ и масс-спектрометрии с применением мягких методов ионизации (электрораспылительной ионизации (ЭРИ) и химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) в фитохимическом анализе постоянно появляются в научных статьях. Зачастую в одном исследовании комбинируют несколько процедур пробоподготовки, режимов работы МС детектора и способов обработки данных. Поэтому возникает необходимость в построении классификации существующих подходов и выделении отдельных аналитических процедур, которые можно

использовать в качестве «строительных блоков» при выборе или разработке оптимальной стратегии для достижения поставленных целей исследования.

1.1 Выделение компонентов из растительного сырья перед проведением ВЭЖХ-МС анализа

Несмотря на тысячелетнюю историю использования лекарственных растений разработка подходящих и экономически эффективных методов выделения биологически активных соединений до сих пор остается трудной задачей. С аналитической точки зрения очень важная часть любой процедуры, применяемой для измерения содержания биологически активных соединений, это метод, разработанный для извлечения и разделения основных целевых аналитов на разных уровнях концентрации. Таким образом, применяют различные методы экстрагирования для достижения максимально возможного выхода биоактивных компонентов из растительного материала. Экстракция в аппарате Сокслета (ЭС) и мацерация – классические методы экстракции, которые широко используются для выделения биологически активных компонентов за счет доступности этих методов, эффективности и универсальности. Современные методы, такие как экстракция с помощью микроволн (МВЭ), ультразвуковая экстракция (УЗЭ), сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) и ускоренная экстракция растворителем под давлением (ЭРД) также активно используются. Для очистки полученных экстрактов применяют сорбционное концентрирование и колоночную хроматографию. Далее будут рассмотрены некоторые аспекты применения этих методов для извлечения трех распространенных групп метаболитов растений – циклических сахароспиртов, полифенолов и сапонинов [35].

Циклические сахароспирты (циклитолы) представляют особый интерес из-за их антидиабетических, антиоксидантных, противовоспалительных и противораковых свойств [36–38]. Они играют важную роль в функционировании клеток, участвуют в передаче сигнала, мембранном биогенезе, формировании клеточной стенки, накоплении фосфатов и осморегуляции [39]. В то же время эти вторичные метаболиты растений играют важную роль в самозащите растений от неблагоприятных условий внешней среды, солевого или водного стресса [40,41].

Полифенолы – это вещества, обычно присутствующие в растениях [42–46]. Они защищают клетки растений от вредного воздействия ультрафиолетового света,

облегчают опыление насекомыми и защищают против вредителей и микроорганизмов. По этим причинам, полифенолы наиболее обильно присутствуют в листьях, цветках и плодах покрытосеменных растений. Полифенолы представляют собой большую группу соединений растительного происхождения, в состав которой входят фенольные кислоты, флавоноиды, стильбены и лигнаны. Сильные антиоксидантные свойства флавоноидов имеют большое значение в остановке образования и устранении свободных радикалов [44]. Помимо антиоксидантной активности, которая очень важна для человеческого организма, флавоноиды обладают способностью индуцировать или поддерживать процесс клеточного апоптоза, в том числе гибели раковых клеток [47–51].

Сапонины являются вторичными метаболитами растительного сырья и относятся к группе гликозидов. В древности сапонины широко использовались в качестве бытовых моющих средств из-за их амфифильной природы благодаря наличию в их структуре жирорастворимого агликона и водорастворимой цепи [52]. Наличие сапонинов в растениях обеспечивает самозащиту от патогенов и травоядных, так что можно сказать, что они действуют как химический барьер [53]. Сапонины делятся на тритерпеноидные и стероидные гликозиды. Их строение может быть разнообразным, различается по количеству сахарных единиц, прикрепленных в разных позициях. Таким образом, сапонины состоят из несахарного агликона (сапогенина), связанного с одной (или 2-мя–3-мя) сахарными цепями (гликон) [54]. Сапонины в основном получают из растительного материала [55]. Эти соединения в настоящее время активно используются в фармацевтической промышленности благодаря широкому ассортименту фармакологических свойств. Многие недавние исследования были сосредоточены на сапонинах, в том числе их способности усиливать иммунные ответы [56], антибактериальных свойствах [57], антиоксидантной активности [59], противораковых, противодиабетических свойствах и активности против ожирения [59–61].

1.1.1 Извлечение биоактивных компонентов методом мацерации

Мацерация – это обычный и очень простой вариант экстрагирования: растительное сырье погружается в растворитель на период от пары часов до нескольких дней, после этого экстракт фильтруют от твердых взвесей. Используют различные растворители для извлечения компонентов из растительного материала.

Хотя мацерация предполагает использование больших количеств растворителей, преимущество заключается в том, что это очень удобный метод для термолабильных компонентов. Примеры применения [62–74] мацерации приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Примеры извлечения биоактивных соединений методом мацерации

Растение	Соединения	Параметры экстракции	Анализ*	Ссылка
<i>Agyrolobium-roseum</i>	Пинитол	Мацерация; р-ль: 95% этанол; 25°C; 4х15 ч	ВЭЖХ-УФ	[62]
Соя, Фасоль, Сахарная свекла, и др.	Муо-инозитол, D-chiro-инозитол, Пинитол, ононитол	Мацерация; р-ль: 80% этанол; 70°C; 30 мин	ГХ-МС	[63,64]
<i>Mucos duckei</i>	Борнеситол	Мацерация; р-ль: петролейный эфир : метанол (1:1); 25°C; 4 ч	ЯМР, ГХ-МС	[65]
Морковь	Scyllo-инозитол, муо-инозитол	Мацерация; р-ль: 80% этанол; 25°C; 2х20 мин	ГХ-МС	[66]
<i>Lens culinaris</i> (шелуха)	Антоцианидины, проантоцианидины, флавонолы, флавононы, флавоны	Мацерация; р-ль: ацетон : вода (70:30, v/v); 25°C; 1 ч	ВЭЖХ-МС	[67]
<i>Camellia sinensis</i> L.	Катехины и кофеин	Мацерация; р-ль: вода; 80°C; 1 ч	ВЭЖХ-ДМД	[68]
<i>Himanthalia elongate</i> (водоросли)	Флороглюцин, галовая кислота, катехин, ванилиновая кислота, эпикатехин, протокатехин, рутин, 2,5-дигидроксibenзойная, хлорогеновая, кофейная, кумаровая и феруловая кислоты, мирицетин, кверцетин	Мацерация; р-ль: вода и смеси ацетон : вода, этанол : вода, метанол : вода (60:40 и 40:60, v/v); 60°C; 2 ч	ВЭЖХ-ДМД	[69]
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Стероидные сапонины: офиопогонин В, офиопогонин D, офиопогонин D'	Мацерация; р-ль: метанол; 65°C; 1 ч	ВЭЖХ-ИДСР	[70]
<i>Camellia oleifera</i> Abel (жмых семян)	26 тритерпеновых сапонинов, олиферасапонин А1	Мацерация; р-ль: смеси этанола и воды, метанол; 65°C; 3х3 ч	ВЭЖХ-МСВР, ТСХ, ВЭЖХ-УФ-ИДСР	[71,72]
<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	Стероидный сапонин спиростанового типа	Мацерация; р-ль: метанол; 25°C; 72 ч	ЯМР, ИК, ГХ-ПИД, ГХ-МС, МАЛДИ-МС	[73]
Персидский лук-порей	Спиростан, фуροстан и холестеран	Мацерация; р-ль: гексан, метанол, хлороформ; 25°C; время: 24 ч	ЯМР, МС, ТСХ	[74]

*ИДСР – испарительный детектор по светорассеянию; ДМД – диодно-матричный детектор; ПИД – пламенно-ионизационный детектор.

Для сахаров и сахароспиртов подходящим растворителем является вода. Эффективность воды при извлечении этих высокополярных соединений была продемонстрирована на примере порошка стручков рожкового дерева, мацерированного в течение 7 дней вместе с 0,01% (масса/объем) сухих дрожжей при 30°C [75]. Этанол и метанол являются другими широко используемыми растворителями для экстракции циклитолов. Этанол предпочтительнее метанола из-за более низкой токсичности. Для экстракции мио-инозитола из *Peucedanum japonicum* Thunb применяли мацерацию с использованием 80% этанола, выдерживая материал при комнатной температуре в течение 7 дней [76]. Пинитол получают из растительного материала *Argyrolobium roseum* (*Papilionaceae*) после четырех циклов по 15 часов мацерации 95% этанолом при комнатной температуре [62]. Наиболее используемые растворители для экстракции полифенолов растений – метанол, ацетон и вода. Экстракция смесью 0.1% HCl в метаноле и воде (80:20, v/v) методом мацерации оказалась эффективной для выделения антоцианидинов, флаван-3-олов, проантоцианидинов, флаванолов, флавонов и подклассов флавонолов [67]. В случае сапонинов мацерация также продемонстрировала высокую эффективность. Порошок *Ophiopogon japonicus* выдерживали в метаноле в течение 1 ч при кипячении с обратным холодильником, а затем стероидные сапонины (офиопогонин В, офиопогонин D, офиопогонин D') идентифицировали с помощью ВЭЖХ-ИДСР [70]. Мацерация с использованием этанола, метанола и чистой воды была использована для извлечения 26 тритерпенов из жмыха чайных семян (*Camellia oleifera* Abel). Для их идентификации и количественного анализа применяли ВЭЖХ-МСВР, ТСХ и ВЭЖХ-УФ-ИДСР [71].

1.1.2 Извлечение биоактивных компонентов методом Сокслета

Экстракция по Сокслету является вторым традиционным методом для извлечения биоактивных компонентов, который обладает повышенной эффективностью по сравнению с мацерацией за счет нагрева растворителя до температуры кипения и возврата сконденсированных паров к емкости с образцом. Таким образом, многократную экстракцию по Сокслету можно проводить желаемое число раз (циклов). В качестве растворителей в этом методе наиболее часто используются вода и этанол из-за их доступности, эффективности и наименьшей токсичности. Примеры применения [77–81] этого подхода приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Примеры извлечения биоактивных соединений в аппарате Сокслета

Растение	Соединения	Параметры экстракции	Анализ	Ссылка
<i>Bauhinia variegata</i> Linn.	D-пинитол	Экстракция в аппарате Сокслета; р-ль: этанол	ТСХ, ИК, ЯМР, ВЭЖХ-МС	[77]
<i>Pinus nigra</i> ssp. <i>Laricio</i> (хвоя, кора, шишки)	Пинитол, <i>myo</i> -инозитол	Мацерация; р-ль: метанол; 25°C; 24 ч Экстракция в аппарате Сокслета; р-ль: пентан	ЯМР	[78]
<i>Populus Salicaceae</i> (древесина)	Катехол, ванилин, таннины, сахараиды	Экстракция в аппарате Сокслета; Р-ль: гексан, дихлорметан, этилацетат, метанол, вода; 24 ч	ГХ-МС	[79]
<i>Medicago arabica</i> (L.) Huds	2β-гидрокси керетаровая кислота, керетаровая кислота, хедерагенин, байогенин, соясапогенол В, олеаноловая кислота, 2β-гидроксиолеаноловая кислота	Экстракция в аппарате Сокслета; Р-ль: хлороформ	ГХ-ПИД, ВЭЖХ-ДМД	[80]
Lucerne (<i>Medicago genus</i>)	Соясапогенол А, соясапогенол В и их агликон, хедерагенин, байогенин, медакагеновая кислота, олеаноловая кислота	Экстракция в аппарате Сокслета; Р-ль: хлороформ	ГХ-МС, ГХ-ПИД, ВЭЖХ-ДМД, ТСХ	[81]

Из *Bauhinia variegata* впервые был выделен D-пинитол с использованием метода Сокслета [77], используя этанол в качестве растворителя. Более того, сахара и циклитолы, такие как пинитол, глюкоза, фруктоза, мио-инозитол, маннит, арабинит, ксилит и эритрит экстрагировали из различных морфологических частей *Pinus nigra* ssp. с помощью мацерации и метода Сокслета, используя в качестве растворителя пентан [78]. При экстракции органических соединений из древесины тополя наибольший выход достигался при использовании метанола, также в метанольных фракциях было обнаружено наибольшее содержание сахаров [79]. Высокое содержание фенольных соединений обнаруживалось во фракциях, выделенных из гексанового, этилацетатного и метанольного экстрактов, а оценка суммарного содержания фенольных соединений показала, что оптимальным растворителем для их извлечения является гексан. Его использование особенно

удобно в связи с последующим определением этих соединений методом ГХ-МС. Стероиды, такие как тигогенин, гитогенин, гекогенин и неогекогенин, были выделены из *Tribulus terrestris* экстракцией по Сокслету с этанолом в качестве растворителя. Время экстракции составило 24 часа и для проведения последующего анализа использовали ГХ/МС [82]. Соясапогенол А, соясапогенол В, гедерагенин, байогенин, олеаноловая кислота и другие соединения были выделены из люцерны с использованием экстракции по Сокслету с хлороформом в качестве растворителя, в то время как ГХ-МС, ГХ-ПВД, ВЭЖХ-ДМД и ТСХ использовали для разделения и количественного анализа [77].

1.1.3 Извлечение биоактивных компонентов методом экстракции под давлением и сверхкритической флюидной экстракции

Экстракция сверхкритическим флюидом является ценным и экологически безопасным методом извлечения разнообразных биоактивных соединений, преимуществами которого являются быстрота, и экономия органических растворителей.

Сверхкритическое состояние достигается, когда температура и давление жидкости поднимаются выше критической точки. Углекислый газ, наиболее часто используемый растворитель в СФЭ, очень малотоксичен и эффективен для экстракции липидов и других неполярных соединений.

Для извлечения полярных веществ, используют полярный модификатор, называемый сорастворителем (например, метанол, этанол, ацетонитрил, ацетон, вода, этиловый эфир или дихлорметан), добавляемый в сверхкритическую жидкость для повышения растворимости [83].

Ускоренная экстракция растворителем под давлением (ЭРД) — современный метод экстракции, который используется для извлечения биологически активных соединений с участием растворителей при высокой температуре и давлении, но без достижения критической точки. В этом методе применяются различные растворители и смеси растворителей, самыми популярными из которых являются вода, метанол и этанол.

Примеры применения [84–93] методов ЭРД и СФЭ представлены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Примеры извлечения биоактивных соединений методами СФЭ и ЭРД

Растение	Соединения	Параметры экстракции	Анализ	Ссылка
<i>Ceratonia silique</i> L. (стручки)	Д-пинитол	СФЭ; р-ль: CO ₂ ; скорость потока: 0.5 мл/мин; давление: 30 МПа; 60°C; время: 120 мин	ВЭЖХ-УФ	[84]
Дуб, каштан (древесина)	Мисо-инозитол, <i>chiro</i> -инозитол, <i>scyllo</i> -инозитол, <i>muo</i> -инозитол	ЭРД; р-ль: ацетон, метанол, вода; давление: 10.3 МПа; 90°C; время: 15 мин	ГХ-МС	[85]
<i>M. piperita</i> , <i>O. vulgare</i> , <i>R. officinalis</i> L. и <i>T. vulgaris</i> L.	Розмариновая кислота, эридиктиол, кверцетин, лютеолин, апигенин, карнозиновая кислота	Экстракция в аппарате Сокслета; метанол; соотношение фаз: 1:30 г/мл. ЭРД; р-ль: метанол; 125°C; время: 3х7 мин СФЭ; р-ль: CO ₂ (3% метанол); скорость потока: 30 г/мин; давление: 240 Бар; 60°C; время: 3.41 ч	ВЭЖХ-МС/МС	[86]
Виноградная мезга	Галловая, протокатехиновая, коричная, феруловая, 4-гидроксibenзойная, кофейная кислоты продельфинидин В3; галлоктехин, 4-, катехин эпигаллокатехин, эпикатехин, галлокатехин галлат, резвератрол, рутин, кемпферол	ЭРД; р-ль: этанол : вода; давление: 100 Бар; 140°C; время: 15 мин	ВЭЖХ-ДМД	[87]
<i>Olea europaea</i> (листья)	Апигенин -7-О-глюкозид, лютеолин -7-О-глюкозид, олеуропеин, кверцетин, вербаскозид, маннитол	Экстракция в аппарате Сокслета; Р-ль: 60% метанол; 4 ч ЭРД; р-ль: 60% метанол; давление: 10 МПа; 190°C; время: 5 мин	ВЭЖХ-ДМД	[88]
<i>Panax notoginseng</i>	Нотогинсенозид R ₆ , нотогинсенозид R ₁ , гинсенозид Rb ₁ , нотогинсенозид Spt ₁ , гинсенозид F ₄ , гинсенозид Rh ₄ , гинсенозид 20S-Rg ₃ , гинсенозид 20S-Rs ₃ гинсенозид Rk ₁	ЭРД; р-ль: этилацетат : вода : н-бутанол : гексан : метанол; 135°C; время: 10 мин	ВЭЖХ-ДМД, ЯМР	[89]

Продолжение таблицы 1.3

<i>Bupleurum chinense</i> DC. (корни)	Сайкосапонины	ЭРД; р-ль: 70% этанол; давление: 100 Бар; 120°C; время: 3x10 мин	ВЭЖХ- МС	[90]
<i>Aesculus chinensis</i> <i>Bunge</i>	Эсцин Ia, эсцин Ib, изоэсцин Ia и изоэсцин Ib	ЭРД; р-ль: 70% метанол; 120°C; время: 2x7 мин	ВЭЖХ- ДМД, ВЭЖХ- МС	[91]
<i>Medicago sativa</i>	Медикагеновая кислота, хедерагенин, байогенин, соксапогенол В	СФЭ р-ль: CO ₂ (96% EtOH); скорость потока: 4 мл/мин (1 мл/мин для 96% EtOH); давление: 150 Бар; 50°C; время: 40 мин	ВЭЖХ- ИДСР	[92]
<i>Bupleurum falcatum</i>	Сайкосапонин с, Сайкосапонин а, Сайкосапонин d	СФЭ р-ль: CO ₂ (80% EtOH); скорость потока: 2 л/мин; давление: 35 МПа; 45°C; время: 3 ч	ВЭЖХ- ДМД	[93]

При использовании ЭРД авторам работы [94] удалось заметно сократить время, затрачиваемое на экстракцию сахароспиртов по сравнению с другими методами. Кроме того, экстракция инозитов из кедровых орехов оказалась более эффективной при использовании ЭРД (5.7 мг/г, при следующих параметрах: 50°C, 18 мин, три цикла по 1.5 мл воды каждый, 10 МПа) по сравнению с мацерацией (3.7 мг/г, при комнатной температуре, 2 ч, два цикла по 5 мл воды) [95]. СФЭ использовалась для извлечения D-пинитола из стручков рожкового дерева, и параметры экстракции оптимизировали для получения максимальной степени извлечения с наименьшими затратами [84]. При использовании СФЭ удалось добиться удовлетворительного извлечения фенольных соединений из разных морфологических частей люцерны (*Medicago sativa*) [96]. Те же авторы извлекали сапонины люцерны методом СФЭ в аналогичных условиях [92]. ЭРД позволяет существенно сэкономить временные затраты при проведении экстракции. Так аналогичных по сравнению с методом ЭРД степеней извлечения фенольных соединений из листьев оливы удалось достигнуть лишь за 4 ч в аппарате Сокслета [88]. СФЭ и ЭРД также активно используют для извлечения сапонинов [90–93]. При извлечении четырех основных сапонинов из семян *Aesculus chinensis* использовали следующие условия: 70% MeOH, температура – 120°C, время статической

экстракции – 7 мин, число циклов – 2 [91]. При извлечении сапонинов методом СФЭ приходится использовать значительные количества этанола в качестве сорастворителей [92,93], это связано с наличием полярных сахаридных заместителей в их составе.

1.1.4 Извлечение биоактивных компонентов методом ультразвуковой и микроволновой экстракции

УЗЭ — эффективный метод извлечения, размещенный на условной границе между классическими и современными методами, и наиболее часто используется для экстрагирования различных биоактивных соединений [97]. По сравнению с мацерацией и экстракцией в аппарате Сокслета УЗЭ обладает рядом стратегических преимуществ: меньшая длительность экстракции, меньшее количество необходимого растворителя и более низкое потребление энергии. Принцип УЗЭ заключается в использовании ультразвука (волны с частотой от 20 до 100 МГц) для образования пузырьков внутри растворителя, которые из-за явления кавитации индуцируют разрушение клеточных стенок растений и ускоряют таким образом проникновение растворителя в растительный материал.

МВЭ — хорошо зарекомендовавшая себя техника, предложенная раньше по сравнению с другими современными методами (СФЭ и ЭРД). Тем не менее, МВЭ — многообещающая альтернатива традиционным методам экстракции; в МВЭ используют микроволны (неионизирующие электромагнитные волны с частотой от 0.3 до 300 ГГц). Поглощение микроволн полярными молекулами (такими как вода) и последующее выделение тепла облегчает диффузию растворителя в растительные образцы и высвобождение растворенных веществ из растительного материала в растворитель. Преимущества МВЭ перед другими методами – это значительная экономия времени, количества растворителя, потребления энергии и, следовательно, повышение эффективности извлечения.

Примеры применения [82,96–111] методов УЗЭ и МВЭ, в том числе в сравнении с другими способами извлечения циклитолов, фенольных соединений и сапонинов, приведены в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Примеры извлечения биоактивных соединений методами УЗЭ и МВЭ

Растение	Соединения	Параметры экстракции	Анализ	Ссылка
<i>Ceratonia siliqua</i>	D-пинитол	УЗЭ; р-ль: вода; 50°C; УЗВ мощность: 207 Ватт, разбавление: 1:4; время: 120 мин	ВЭЖХ-УФ	[98]
<i>Olea europaea</i> (фрукты, листья, стебли)	<i>Chiro</i> -инозитол, <i>муо</i> -инозитол, галактинол	УЗЭ; р-ль: дихлорметан : метанол (2:1); 80-90°C; УЗВ мощность: 450 Ватт; время: 10 мин	ГХ-МС/МС	[99]
<i>Cynarascolumus</i> L. (прицветники)	<i>Chiro</i> -инозитол, <i>scyllo</i> -инозитол, <i>муо</i> -инозитол	ЭРД; р-ль: вода; давление: 100 Бар; 75°C; время: 26.7 мин МВЭ; р-ль: вода; 60°C; соотношение фаз: 1:30 г/мл; время: 3 мин	ГХ-ПВД	[100]
<i>Morus atropurpurea</i> Roxb. (ягоды)	Флавонолы, флавононы, флавоны, гидроксисинапиновая и гидроксibenзойная кислоты, стильбены	ЭРД; р-ль: ацетон, метанол, вода, уксусная кислота; давление: 10.3 МПа; 100°C; время: 2x5 мин УЗЭ; р-ль: вода, смеси ацетона, уксусной кислоты; 60°C; УЗВ частота: 80 кГц; время: 20 мин	ВЭЖХ-МС/МС	[101]
<i>Fagus sylvatica</i> L. (кора)	Эпикатехины, гликозиды кумаровой и сиреневой кислот, таксифолина и конифирилового спирта, проантоцианидины	МВЭ; р-ль: метанол : вода (80:20 v/v), этанол : вода (80:20 v/v); 60, 80, 100, 120°C; время: 10-20 мин УЗЭ; 10,20,30 мин при комнатной температуре	ВЭЖХ-МС/МС	[102]
<i>Medicago sativa</i> (цветы, листья, стебли, корни)	Апигенин, лютеолин, кверцетин, рутин, биоханин А, кемпферол, галловая, синапиновая и кофейная кислоты	Мацерация; р-ль: 96% этанол, 50°C; 24 ч СФЭ р-ль: CO ₂ (96% EtOH); скорость потока: 4 мл/мин (1 мл/мин для 96% EtOH); давление: 10 МПа; 50°C; время: 70 мин УЗЭ; р-ль: 96% этанол, 50°C; 24 ч ЭРД; р-ль: 96% этанол; давление: 10 МПа; 50°C; 2x5 мин	ВЭЖХ-МС/МС	[96]
Яблочный жмых	Хлорогеновая, кофейная, коричная, кумаровая кислоты, сиригин, флоризин, процианидин В2, (-)-эпикатехин и кверцетин	МВЭ; р-ль: этанол 62.1%; мощность: 650.4 Ватт; соотношение фаз: 1:22.9 г/мл; время: 53.7 сек	ВЭЖХ-УФ	[103]

Продолжение таблицы 1.4

<i>Momordica charantia</i>	катехин, галовая, 2,5-дигидрокси-бензойная и хлорогеновая кислоты	СФЭ; р-ль: вода; скорость потока: 2 мл/мин; давление: 10 МПа; 150-200°C; время: 20-320 мин УЗЭ; р-ль: метанол и вода; 65°C; время: 6 ч	ВЭЖХ-УФ	[104]
<i>Vitis vinifera</i>	5-гидроксиметил-фурфураль, гидрокситирозол, протокатехиновая, гидроксibenзойная, галовая, сиреневая, ванилиновая и кумаровая кислоты катехин, кверцетин, ресвератрол	Мацерация; р-ль: этанол, метанол; 25°C; 19 ч МВЭ; р-ль: метанол; 110°C; мощность: 60 Ватт; время: 60 мин УЗЭ; р-ль: метанол; 25°C; УЗВ мощность: 60 Ватт; время: 60 мин ЭРД; р-ль: метанол; давление: 100-200 Бар; 110°C; время: 60 мин	ВЭЖХ-УФ	[105]
<i>Prunus dulcis</i> Mill. D. A. Webb	Прокатехиновая кислота, катехины, гликозиды нарингенина, кемпферола, изорамнетина, флвонолы, процианидин	УЗЭ; р-ль: ацетон : вода, (50:50, v/v); 60°C; время: 15 мин	ОФ ВЭЖХ-МС, НФ ВЭЖХ-ДМД, МАЛДИ-МС, МС/МС	[106]
<i>Rosmarinus officinalis, Vitex agnus, Origanum dictamnus, Origanum majorana, Syrach officinalis, и Teucrium polium</i>	Галовая, сиреневая, кофейная, кумаровая, ванилиновая и феруловая кислоты, (+)-катехин, кверцетин, рутин, нарингенин, лютеолин, апигенин, эридиктиол	Мацерация; р-ль: вода, ацетон, метанол, этилацетат; 90°C; 2 ч МВЭ; р-ль: ацетон, метанол, вода, этилацетат; 110°C; мощность: 750 Ватт; время: 4 мин	ВЭЖХ-УФ	[107]
<i>Tribulus terrestris</i>	Тигогенин, Гитогенин, Гекогенин и неогекогенин	Экстракция в аппарате сокслета; Р-ль: этанол; время: 24 ч МВЭ; р-ль: 70% этанол; мощность: 400 Ватт; время: 10 мин	ГХ-МС	[82]
<i>Phytolacca acinosa u Phytolacca americana</i>	60 тритерпеновых сапонинов	Мацерация; р-ль: вода : этанол (3:7, v/v); 80°C; соотношение фаз: 1:80 г/мл; время: 3x1.5 ч УЗЭ; р-ль: вода : этанол (3:7, v/v); 25°C; соотношение фаз: 1:80 г/мл; время: 3x30 мин	ВЭЖХ-МС/МС	[108]

Продолжение таблицы 1.4

<i>Panax quinquefolium</i>	Гинсенозиды	ЭРД; р-ль: вода : н-бутанол; давление: 10.3 МПа; 110°C; время: 30 мин УЗЭ; р-ль: вода : н-бутанол; 38°C; время: 120 мин	ВЭЖХ- ДМД	[109]
<i>Dioscorea zingiberensis</i>	Дельтонин, диглюкозид и триглюкозид диосгенина, триллин, диосгенин	МВЭ; р-ль: петролейный эфир : этанол : (NH ₄) ₂ SO ₄ ; соотношение фаз: 1:20 г/мл; время: 120 сек; мощность: 380 Ватт Экстракция в аппарате Сокслета; Р-ль: 70% этанол; 90°C; 4 ч	ВЭЖХ- УФ	[110]
<i>Pulsatilla turczaninovi</i>	Пульсатиллосапонин А ₃ , пульсатиллозид В, пульсатиллозид С, циреншенозид S, пульсатиллосапонин В ₄ , олеаноловая и гидроксигетулино- вая кислоты	МВЭ; р-ль: 70% этанол; 80°C; соотношение фаз: 1:20 г/мл; мощность: 500 Ватт; время: 3 мин УЗЭ; р-ль: этанол : вода (70:30, v/v); 25°C; время: 30 мин	ВЭЖХ- МС/МС	[111]

Многочисленные исследования сообщают об эффективности УЗЭ и МВЭ для экстракции циклитолов и сахаров путем варьирования параметров, например, температуры, мощности ультразвука (микроволнового воздействия), степени разбавления или длительности [98–100,112]. Самая высокая концентрация D-пинитола при использовании УЗЭ (11.89 г/л) была получена при следующих параметрах: температура – 50°C, мощность ультразвука – 207 Вт, соотношение при разбавлении – 1:4 и длительность экстракции – 120 мин [98]. Для извлечения инозитола из внешних прицветников артишока с использованием воды в качестве растворителя МВЭ показала наилучшие характеристики, 11.6 мг/г сухого образца, когда в качестве экспериментальных параметров использовалась температура – 60°C, время – 3 мин и 0.3 г высушенного образца на 10 мл воды [100].

В случае полифенолов, МВЭ с использованием воды, смесей метанол : вода (80 : 20 по объему), этанол : вода (80 : 20 по объему), а также различных температурных режимов применялась для экстракции 37 соединений из коры бука (*Fagus sylvatica* L.), среди которых были: процианидин, эпикатехины, гликозиды кумаровой кислоты, гликозиды таксифолина, гликозиды сиреневой кислоты, гликозиды кониферилового спирта [102]. По результатам этого исследования был сделан вывод о том, что МВЭ позволяет добиться высоких степеней извлечения

полифенолов. Однако авторы обнаружили, что в случае некоторых соединений, например процианидинов, это метод является не лучшим выбором, предположительно из-за теплового распада молекул при экстракции. Было проведено сравнительное исследование, в котором УЗЭ и ЭРД использовали для извлечения фенольных соединений из ягод шелковицы, с использованием девяти различных растворителей для экстракции и метода ВЭЖХ-МС/МС для анализа. Метод главных компонент был использован для определения наиболее подходящего растворителя и для того, чтобы различать разные классы фенольных соединений [101], а экспериментальные результаты показали превосходство ЭРД перед УЗЭ.

Быстрый метод экстракции стероидных сапонинов из *Tribulus terrestris* с использованием МВЭ с высокими степенями извлечения ($90 \pm 2\%$) был предложен авторами работы [82]. В качестве растворителя использовали 70% этанол, длительность экстракции составила 5 мин. УЗЭ с использованием смеси этанола-воды (7:3, v/v) в соотношении растворитель-образец 1:80 г/мл применили для выделения тритерпеноидов из корней *Phytolacca acinosa* Roxb, выращенного в разных провинциях Южного Китая и нескольких образцов *Phytolacca americana* L. [108]. С помощью ВЭЖХ-МС анализа, было установлено, что образцы из разных регионов различались как по количественному, так и по качественному составу сапонинов. Всего авторы обнаружили в общей сложности 60 тритерпеновых сапонинов, среди которых 22 были идентифицированы как общие для всех образцов.

В последние годы наблюдается также рост публикационной активности³ по тематике применения твердофазной экстракции, в том числе для выделения и очистки фракций тритерпеновых и стероидных гликозидов. Различные аспекты пробоподготовки, применяемой в аналитических стратегиях контроля качества растительного сырья также обсуждаются в существующих обзорах [113,114].

1.2 Использование МС и ВЭЖХ-МС методов для определения структуры метаболитов растений

Согласно вышеупомянутым рекомендациями МСИ [16], имея дело с предполагаемым источником НП, следует разделить его химические составляющие на три группы: известные соединения, их структурные аналоги из тех же химических

³ 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%.

классов и неизвестные (“unknowns”). Для достоверного установления структуры неизвестных соединений чаще всего используют традиционную процедуру выделения и очистки, основные стадии которой представлены на рисунке 1.1.

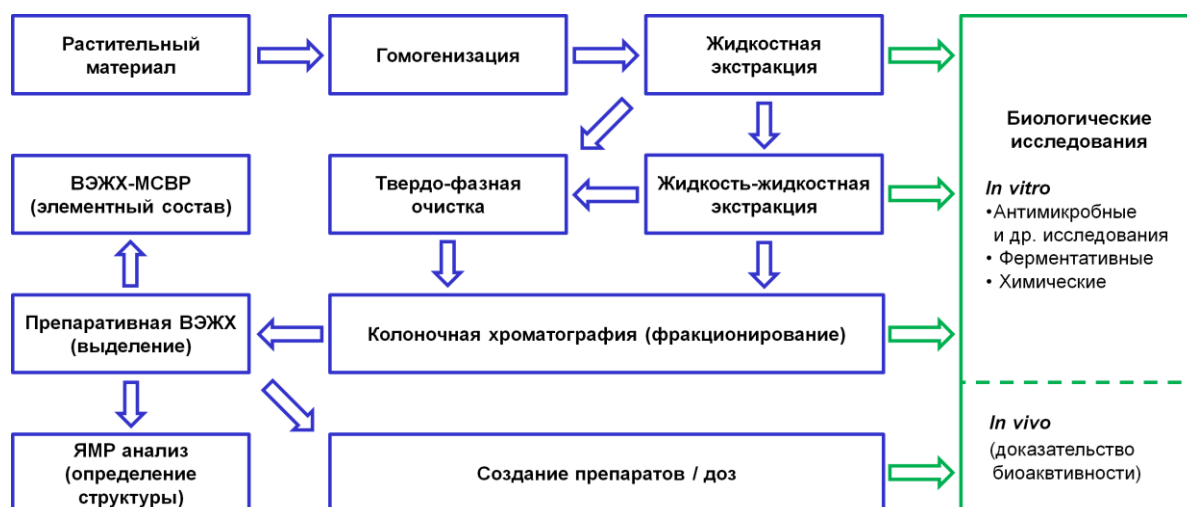


Рисунок 1.1 – Основные стадии выделения и последующего исследования НП.

Неочищенные экстракты часто фракционируют на несколько фракций с помощью жидкость-жидкостной экстракции [114], колоночной хроматографии [115] или противоточной жидкость-жидкостной хроматографии [116]. Отдельные компоненты могут быть впоследствии очищены с помощью препаративной ЖХ [117]. МС детектирование с бомбардировкой быстрыми атомами и ионизацией при атмосферном давлении используют для определения молекулярных масс выделенных соединений, а ЯМР-спектроскопия служит основным источником структурной информации [12]. Далее тандемную МС используют для подтверждения структуры нового соединения [21]. В настоящее время, элементный состав молекулярных и фрагментных ионов, определяемый с помощью МСВР, стал неотъемлемой частью информации, используемой для подтверждения новых структур [22]. Высокая разрешающая способность по массе и высокая точность измерения массы необходимы для обеспечения разделения изобарных ионов и правильного определения элементной формулы. Кандидаты обычно ранжируются по минимальной разнице значений m/z между наблюдаемым сигналом и вычисленным для кандидата теоретическим значением. Надежность определения моноизотопного элементного состава может быть повышена за счет точного определения соотношения интенсивностей изотопных ($M+1$ и $M+2$) сигналов, а также других сигналов, составляющих изотопный паттерн соединения. Степень ненасыщенности (RDBE) также может использоваться в качестве одного из

ограничений при присвоении химически возможных элементных формул [118]. Кроме того, значения степени ненасыщенности можно использовать для фильтрации или группировки наблюдаемых сигналов [119]. Кинд (Kind) и Фьен (Fiehn) [118] разработали высокоэффективную систему семи золотых правил для эвристической фильтрации молекулярных формул, которые часто используются для аннотации сигналов, полученных с помощью МСВР.

Дополнительные возможности открывает МС сверхвысокого разрешения (более 300 000 при m/z 400). Так, использование масс-спектрометров с ионным циклотронным резонансом с преобразованием Фурье (ФП-ИЦР МС) позволяет одновременно определять элементный состав компонентов сложных смесей, таких как продукты деградации лигнина [121]. Используя тонкий изотопный анализ: измерение m/z со сверхвысоким разрешением и точная оценка относительных интенсивностей изотопологов, можно устранить оставшиеся неопределенности в установленных молекулярных формулах, например, отличить серосодержащие продукты от кислородсодержащих из-за специфичности масс-дефектов ^{34}S и ^{18}O .

Хроматография в некоторых случаях помогает устранить неопределенности при идентификации изомерных соединений. Например, в работе [122], 20(R)- и 20(S)-гинсенозиды Rf были разделены в условиях ОФ ВЭЖХ, что дало возможность отличить свежие и подвергнутые обработке с паром корни женьшеня. Еще одним параметром при идентификации может служить сечение столкновения в спектрометрии ионной подвижности [123,124], открывая возможность различать вращательные изомеры, стабилизированные водородной связью [125].

1.2.1 De novo идентификация с использованием МС и МС/МС данных

В автоматическом или полуавтоматическом процессе оценки МС/МС данных обратный алгоритм поиска, показывающий насколько хорошо массы и интенсивности полученного спектра согласуются с найденными в библиотеке спектрами [126], используется наряду с прямым алгоритмом, который показывает, насколько хорошо сигналы библиотечного спектра согласуются с наблюдаемыми (без учета других масс, содержащихся в полученном спектре). Использование общей оценки соответствия, которая включает в себя как упомянутые оценки схожести масс-спектров, так и некоторые другие зарегистрированные данные, такие как RT, изотопный паттерн и образование аддуктов, помогло уменьшить количество

ложноположительных результатов среди идентифицированных фенольных соединений в продуктах растительного происхождения [127].

Фрагментные ионы являются важным источником информации, которую в конечном итоге можно использовать для реконструкции структуры соединения. В протеомике были разработаны методы идентификации пептидов *de novo*, способные интерпретировать данные МС без какой-либо базы данных, опираясь на установленные закономерности фрагментации [128,129]. Создание таких методов для спектров НП является более сложной задачей, поскольку метаболиты часто демонстрируют более разнообразную структуру: они не обладают ни линейной структурой, как пептиды, ни древовидной структурой, как полисахариды [130].

Для НП, структура которых, может быть представлена как линейная или древовидная, алгоритм ранжирования кандидатов может быть основан на деревьях фрагментных ионов [126,130-132]. Для линейных или древовидных структур, таких как гликаны, составляющие моносахариды могут быть объединены в полную структуру шаг за шагом. Промежуточные структуры, в свою очередь, могут быть представлены в виде поддеревьев. Наконец, ранжирование сгенерированных кандидатов полной структуры выполняется в соответствии с их совместимостью с зарегистрированными масс-спектрами [132]. Большинство существующих схем подсчета очков соответствия (*fit score*) представляют собой модифицированные версии подсчета общих пиков для экспериментального спектра и теоретического спектра. В подходе, предложенном в работе [130], для оценки гипотетического древа фрагментации для кандидата все пики фрагментных ионов распределяют так, чтобы сохранить только те молекулярные формулы, которые являются субмолекулами молекулярной формулы кандидата. Все эти формулы и молекула-кандидат считаются вершинами ориентированного графа. Для расчета окончательной оценки соответствия для каждого кандидата используется аддитивная схема оценки, основанная на весах ребер этого графа (древа фрагментации). Для всех 32 тестируемых соединений из *Arabidopsis thaliana* правильное решение попало в первую пятерку кандидатов, причем для 26 соединений первое предложение разработанного алгоритма оказалось правильным [130].

Стоит отметить, что для идентификации потенциальных субструктур из МСⁿ спектров неизвестных соединений могут быть использованы как древа фрагментов,

так и древа потерь [131]. В таком случае установленные корреляции структура-спектр также могут быть использованы для различения структурно родственных соединений, например 3-глюкозилкверцетина и кверцетин-3,4'-диглюкозида [133]. В качестве альтернативного подхода [126], кандидаты из базы данных соединений на основе PubChem были ранжированы по их штрафным баллам (рассчитанным на основе количества и типа связей, которые необходимо разорвать) для выполнения аннотации спектрального дерева и идентификации компонентов зеленого чая.

1.2.2 Дерепликация с использованием МС и МС/МС данных

В исследованиях по оценке биологической активности необходимо определить химический состав выбранных фракций/экстрактов, затратив разумное количество времени и усилий. Таким образом, недопустимо повторение всех стадий хроматографического разделения и ЯМР-анализа для определения структуры известных компонентов. Стандарты всех соединений, обнаруженных в том или ином природном объекте, редко присутствуют в лаборатории из-за их цены и доступности, поэтому прямое сравнение времен удерживания (RT) и масс-спектров может быть применимо не всегда. По этим причинам была введена концепция быстрой идентификации известных соединений, называемая дерепликацией [14].

Существует множество способов проведения дерепликации. Самый быстрый – это использование различных баз данных метаболитов (см. п. 1.4). Элементный состав, если он надежно определен с помощью высокоточного измерения молекулярной массы, наряду с характерными сигналами, наблюдаемыми в спектрах MS^2 , почти однозначно указывают на конкретный компонент в хорошо изученном природном объекте. Однако возможность неправильного отнесения пиков из-за путаницы с близкими структурными аналогами или изомерами, присутствующими в таких базах данных, всегда остается высокой. Многие исследователи до сих пор полагаются на ручную интерпретацию данных MS/MS , MS^2 и MS^n для дерепликации ограниченного числа соединений из одной или нескольких групп [134].

Примеры различных стратегий дерепликации [15,24,115,127,133,135–146] перечислены в таблице 1.5.

Таблица 1.5 – Примеры стратегий, применяемых для дерепликации и группового анализа

Источник НП	Соединения	Методы*	Описание	Ссылка
<i>P. pectinatus</i> , <i>P. lucens</i> , <i>P. crispus</i> <i>P. perfoliatus</i>	Флавоны, энглабда-новые дитерпеновые гликозиды	ВЭЖХ–ДМД–ХИАД(+)-QqQ/МС; С18, Н ₂ O – АСН (0.05% ТФУК); ВЭЖХ–ДМД–ХИАД(+)-ИЛ/МС (ИНА); С18, Н ₂ O – АСН (0.05% ТФУК); ВЭЖХ–ДМД с постколоночной дериватизацией; С18, Н ₂ O – АСН (0.05% ТФУК); ВЭЖХ-СФД-ЯМР; С18 (d - 8 мм), CH ₃ CN–D ₂ O;	Определение групповой принадлежности соединения на основе максимумов УФ и ДФИ; Подтверждение предложений путем постколоночного добавления реагентов для измерения УФ-сдвига; Введение (10 мг) в чувствительную систему детектирования ВЭЖХ– ¹ H ЯМР; Определение структуры соединений по данным ЯМР. Особенности: Добавка слабого основания (NaOAc) и AlCl ₃ , для установления локализации гидроксильных групп и сахаридных заместителей; Использование тех же хроматографических условий для прямой интерпретации данных.	[135]
<i>Eugenia jambos</i> L.	Флавоноиды флавоноидные гликозиды	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(-)-Q/МС; МС/МС (входной потенциал от 50 до 170 В); С18, Н ₂ O – АСН;	Сравнение данных, полученных в обычном режиме сканирования и в условиях фрагментации в источнике ионизации; Регистрация ДФИ агликона для гликозидов; Идентификация обнаруженных соединений по МС/МС данным. Особенности: Для агликонов спектры, снятые в режиме фрагментации были практически идентичны спектрам в обычном режиме сканирования.	[136]
<i>Taxus wallichiana</i>	Таксоиды	Прямой ввод, ЭРИ(+)-QqQ/МС; МС ³ (потенциал декластеризации 120–150В), капилляр из плавленного кварца (100-μм); 10 mM CH ₃ COONH ₄ в MeOH;	Первоначальная фрагментация молекулярных ионов в МС ³ эксперименте при высоком входном потенциале (120-150 В). Фрагментные ионы, полученные в результате фрагментации в источнике ионизации, подвергаются ДИС, для образования вторичных фрагментных ионов; Анализ спектров ДИС для индивидуальных стандартов и анализ субструктур известных соединений; Выбор ДФИ и ДНП; Групповой анализ с использованием сканирования ионов-предшественников как в условиях МС/МС, так и в условиях МС ³ ; Идентификация обнаруженных соединений путем анализа МС/МС данных. Особенности: Прямой МС анализ экстрактов; Дополнительная верификация по МС ² фрагментации выбранных ионов-предшественников.	[24]
<i>Hypericum perforatum</i>	Нафтодиантроны, флороглюцинолы,	Сбор данных о фрагментации из литературы; ВЭЖХ–СФД–ЭРИ(-)-ИЛ/МС; ИЗА; С18, Н ₂ O – АСН (0.1% МК); ВЭЖХ–ДМД–ТФЭ–СФД–ЯМР; С18, Н ₂ O – АСН;	Определение групповой принадлежности соединения на основе УФ-спектров; Идентификация агликона по МС/МС данным; Подтверждение и определение структуры неизвестных соединений с использованием данных ЯМР спектроскопии.	

Продолжение таблицы 1.5

	флавоноиды фенольные кислоты		Особенности: Использование колонок с неподвижной фазой из одного и того же материала разной емкости для повышения информативности при интерпретации данных; Для наблюдения за процессом захвата на выходе из ТФЭ картриджа устанавливали второй УФ-детектор.	[137]
<i>Garcinia xipshuanbannaensis</i>	Полипрени- ловые ксантоны	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-QTOF/МС; МС/МС/МС (входной потенциал, 60В); C18, H ₂ O – ACN (0.1%МК);	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Выбор пика на основе установленных длин волн максимумов УФ-поглощения; Сбор данных МС (ЭС, 5В), МС/МС (ЭС, 30В) и МС ³ ; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Дополнительно проведены исследования механизмов фрагментации.	[138]
<i>Lychnophora ericoides</i> Mart. (листья)	Хлорогено- вые кислоты, сесквитер- пеновые лактоны, флавоноиды	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)-QTOF/МС; C18, 2% УК в H ₂ O – ACN;	Идентификация соединений путем сравнения УФ-спектров и разумных элементных формул, рассчитанных на основе точных измерений массы, с литературными данными; Анализ МС/МС данных для выяснения структуры и поддержки/подтверждения отнесения пиков. Особенности: Тщательное изучение фрагментации ионов в режимах положительной и отрицательной ионизации для идентификации соединений из разных классов.	[139]
<i>Melicope vitiflora</i>	Стероиды, терпены, и др.	Выбор биоактивных фракций после колоночной хроматографии; Препаративная ТСХ, прямой ввод ЭРИ(+)-ЛИЛ/МС МС ⁿ , MeOH (0.1% МК)	Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Прямое ЭРИ-МС ⁿ исследование обнаруженных соединений.	[140]
Продукты питания из растений	Фенолы	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)-QTOF/МС; ИЗА; C18, H ₂ O – ACN (0.1% МК)	Изучение фрагментации для отрицательных ионов; Создание библиотеки соединений с использованием RT, МС параметров и МС ² спектров; Идентификация соединений с помощью автоматического поиска в библиотеке с использованием соответствующих оценок соответствия. Особенности: Для соударений использовали оба инертных газа N ₂ и Ar; Создание подробной библиотеки, содержащей несколько спектров для каждого соединения, параметры сбора данных и информацию, связанную с соединением.	[127]

Продолжение таблицы 1.5

<i>Cimicifuga racemosa</i> L.	Различные азотсодержащие метаболиты	2D/ВЭЖХ–ЭРИ(+)-QTOF/МС; C18, H ₂ O – ACN (0.1%МК); HILIC-NH ₂ , ACN – 10 мМ HCOONH ₄ (0.1% МК);	Исследование закономерностей фрагментации основных классов соединений; Определение элементного состава методом МСВР; Поиск элементных формул в базах данных; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Использование точных измерений массы для различения двух нейтральных потерь; Дополнительное использование ВЭЖХ–ЭРИ(+)-ITTOF/МС для получения данных МС ⁿ ; Применение биосинтетического подхода для характеристики соединений разных классов.	[15]
<i>P. ginseng</i> , <i>P. quinquefolius</i> , и <i>P. notoginseng</i> .	Гинсенозиды	Ортогональное разделение методом колоночной хроматографии; ВЭЖХ–ЭРИ(±)–ИЛ/МС; ИЗА; C18, 3 мМ CH ₃ COONH ₄ в H ₂ O – ACN – MeOH;	Изучение фрагментации агликонов в режиме регистрации отрицательных ионов; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных; Предложенные структуры были подтверждены высокоточными измерениями массы. Особенности: Изучение различных неподвижных фаз с различными механизмами разделения; Использование трехкомпонентной подвижной фазы.	[115]
<i>Ficus coronata</i> (кора и листья)	Кумарины	Выбор биоактивных фракций после колоночной хроматографии; Препаративная ТСХ; SE 60, УФ 254 (50:50 и 75:25 ацетон : петролейный эфир, 40-60 °С); Прямой ввод, ЭРИ(+)-ЛИЛ/МС; МС ⁿ (с варьированием ЭС), MeOH (0.1%МК); ВЭЖХ–ЭРИ(±)–ИЛ/МС; C18, H ₂ O – ACN	Определение молекулярных масс и установление закономерностей фрагментации для наблюдаемых ионов-предшественников; Поиск совпадений <i>m/z</i> в базе данных. Особенности: Препаративное ТСХ-фракционирование с выявлением детектируемых ионов в режиме ЭРИ-МС ⁿ .	[141]
<i>Annona muricata</i> L.	Замещенные ацетогенины	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–ФП/МС; МС ³ ; C18, H ₂ O – ACN; постколоночное добавление LiI (2 мМ в MeOH);	Анализ спектров ДИС для индивидуальных стандартов. Выделения хроматограмм для ионов-предшественников и ДФИ; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Постколоночное добавление LiI чтобы регистрировать [M+Li] ⁺ ионы и увеличить чувствительность.	[28]

Продолжение таблицы 1.5

<i>Amphimas pterocarpoides</i>	Изофлавоны	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–ФП/МС; ИЗА (нормированная ЭС: 25, 35 и 45%); C18, 0.1%МК в H ₂ O – MeOH;	Отбор целевых соединений по RT, log P и максимумов УФ-поглощения; Определение элементных составов на основе совпадения нескольких параметров (<i>m/z</i> , степени ненасыщенности и других) с теоретическими. Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Для проверки предложенных структур было селективно выделено и однозначно идентифицировано по данным ЯМР 11 соединений; В дополнение к ЭРИ использовали источник ХИАД.	[26]
<i>Aerides rosea</i> (стебли)	Производные фенантрена	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-QTOF/МС; C18, H ₂ O – ACN (0.05%МК); ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-ИЛ/МС–ТФЭ–СФД–ЯМР; C18, H ₂ O – ACN (0.05%МК);	Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Определение структур обнаруженных соединений по данным ЯМР спектроскопии. Особенности: Разделение элюата между ДМД–ТФЭ–ЯМР (95%) и МС (5%); Для наблюдения за процессом захвата на выходе из картриджа ТФЭ устанавливали второй УФ-детектор.	[142]
<i>Acronychia pedunculata</i>	Димеры ацетофенона	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)/ХИАД(±)–ИТ/МС; ИЗА; C18, 0.1%МК в H ₂ O – MeOH;	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Создание деревьев фрагментации; Предложение деревьев решений для идентификации структурных аналогов; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Фрагментация всех эталонных соединений включала четыре уровня (от МС ² до МС ⁵); В дополнение к ЭРИ использовали источник ХИАД.	[29]
<i>P. ginseng</i> (стебли и листья)	Гинсенозиды	2D ВЭЖХ–СФД (ТФЭ–ЯМР)–ЭРИ(±)–ФП/МС; ИЗА (НЭС - 50% и 80%); HILIC-NH ₂ , ACN – 0.05% NH ₄ OH в H ₂ O; C18, 2 mM УК в H ₂ O – ACN;	Построение двумерных ионных хроматограмм; Изучение фрагментации исследуемых соединений; Многократное улавливание аналитов для проведения автономного ЯМР-анализа; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС и ЯМР данных Особенности: Зеленый протокол для эффективного обнаружения новых НП.	[143]
<i>Pseudeleph antopus spiralis</i>	Гирсутинолидные сесквитерпеновые лактоны	Прямой ввод, ЭРИ(+)-ФП/МС; ИЗА–МС ⁿ , MeOH; ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-ЛИЛ/МС; C18, H ₂ O – ACN:MeOH 88:10 v/v (2% УК);	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Использование трехкомпонентной подвижной фазы.	[28]

Продолжение таблицы 1.5

<i>P. ginseng</i> , <i>P. quinquefolius</i> , и <i>P. notoginseng</i>	Малонил-гинсенозиды	ВЭЖХ–ЭРИ(±)–ИЛ/МС; ИЗА-МС/МС (НЭС 50 и 70%); C18, H ₂ O – ACN (3 mM CH ₃ COONH ₄);	Полная деконволюция набора спектров, зарегистрированных с разной ЭС (0 В, 70 В и 90 В) с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (Sieve 2.2 (Thermo Fisher Scientific, США); Скрининг созданного комбинированного списка ионов-предшественников с помощью ДНП с использованием специального программного обеспечения; Проверка отфильтрованных ионных пар, соответствующих НП, по МС ² ; Скрининг целевых соединений по списку ионов-предшественников; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МСВР данных. Особенности: Предлагаемая количественная оценка путем извлечения целевого иона в режиме фрагментации в источнике ионизации; Проверка наличия ацилирования компонентов путем основного гидролиза.	[30]
<i>Uncaria sinensis</i>	Индоловые алкалоиды, N-оксиды	Разработка in house базы данных; ВЭЖХ–ЭРИ(±)–ИЛ/МС; ИЗА-МС/МС (НЭС, 35%) и ИЗА-МС ³ (НЭС, 45%); C18, 0.05% NH ₄ OH в H ₂ O – ACN;	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Идентификация пиков с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (Sieve 2.2 (Thermo Fisher Scientific, США); Скрининг списка пиков с учетом ФДМ; Скрининг созданного комбинированного списка ионов-предшественников с помощью ДНП с использованием специального программного обеспечения; Характеристика наблюдаемых соединений путем сравнения данных МС/МС с данными эталонных стандартов в сочетании с литературой. Особенности: ФДМ ориентированный ступенчатый режим сканирование ионов-предшественников с динамическим исключением показал лучшую эффективность по сравнению со стандартными ИЗА режимами.	[31]
<i>Aconitum carmichaeli</i> (корни)	Фенилди-терпеновые алкалоиды	Прямой ввод, ЭРИ(+)-QTOF/МС; 0.1%МК в H ₂ O–AcN (1:1, v/v); ВЭЖХ–ЭРИ(+)-QqQ/МС; C18, 0.1%МК в H ₂ O–ACN;	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Выбор ДФИ для скрининга в режиме сканирования ионов-предшественников; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Расчет факторов отклика с использованием референтных стандартов; Количественная оценка обнаруженных соединений; Особенности: Применение КАМС ($f_x = 1$) с использованием скрининга ионов-предшественников.	[25]
<i>Actincephalus divaricatus</i>	Нафтопираны, флавоноиды сапонины	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–ФП/МС; C18, H ₂ O – ACN (0.1%МК);	Классификация и определение степени гликозилирования для каждого пика; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Настройка источника ЭРИ стандартным метанольным раствором растительного экстракта.	[133]

Продолжение таблицы 1.5

<i>Sinomenium acutum</i> Thunb.	Алкалоиды	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-ФП/МС; ИЗА; C18, H ₂ O – ACN (0.1%МК);	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Предложены механизмы фрагментации и начальные центры протонирования.	[144]
<i>P. notoginseng</i> (листья)	Гинсенозиды	Разработка in house базы данных; 2D ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)-QTOF/МС; ИЗА (ЭС 25–45 В и 60–80 В); HILIC-NH ₂ , ACN – H ₂ O; C18, 0.1%МК в H ₂ O – ACN;	Использование программного обеспечения UNIFI software (Waters, USA) для обнаружения соединений; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Доказана способность расширенного скрининга как основных, так и минорных соединений.	[145]
<i>Uncaria Ramulus Cum Unicis</i> (из 5 зон)	Индоловые алкалоиды	Создание списка ионов-предшественников 2D ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)-ФП/МС; ИЗА-МС ³ (НЭС, 35 и 45%); C18-NH ₂ 0.1%МК в H ₂ O – ACN; C18, 0.005% NH ₄ OH в H ₂ O – ACN;	Использование ФДМ для автоматического выбора ионов-предшественников; Выборочно запускаемый сбор МС ⁿ данных для потенциальных целей; Устранение ложных срабатываний путем ввода ограничений по элементному составу, степени ненасыщенности и ошибке определения массы; Использование ДФИ и ДНП для упрощения идентификации; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС ⁿ данных. Особенности: Извлечение аналитов с помощью основания; Сравнение разработанного подхода с ИЗА показало более высокую чувствительность и специфичность первого.	[32]
<i>P. ginseng</i> , <i>P. quinquefolius</i> , <i>P. notoginseng</i> (корни, листья, цветки)	Малонил-гинсенозиды	ВЭЖХ–ЭРИ(-)-ФП/МС; ИЗА-МС ² (НЭС, 35%), ИЗА-МС ³ (НЭС, 70%); C18, H ₂ O – ACN (2 мМ CH ₃ COONH ₄);	Отбор фрагментных ионов, образованных в результате ДНП и имеющих интенсивность выше пороговой; Сравнение наборов соединений, обнаруженных по НП 43,9898 Да (CO ₂) и НП 86,0004 Да (C ₃ H ₂ O ₃); Выполнение сканирования псевдонейтральных потерь при ДИС в источнике ионизации; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Дополнительная проверка ДНП с помощью полного сканирования с фрагментацией в источнике ионизации и сканирования ионов-предшественников.	[33]

Продолжение таблицы 1.5

<i>Acanthopanax senticosus</i> (листья)	Тритерпеновые сапонины	ВЭЖХ–ЭРИ(±)–QTOF/МС; SWATH (20 Да) и МС ^E (ЭС от 5 В до 75 В с интервалом 10 В; C18, H ₂ O – ACN (0.1% МК);	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Определение элементных формул по точным измерениям массы (при более низких ЭС); Поиск и идентификация соединений с помощью ДФИ (при более высоких ЭС); Применение сегментированного МС ^E (SWATH) режима для разрешения совместного элюируемых соединений. Обработка данных с помощью специального программного обеспечения (PeakView (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Предварительная идентификация агликонов с использованием биосинтетического подхода. Особенности: Применение двух ИЗА методов: МС ^E (МС ^{ALL}) и SWATH; МС ^E подход в режиме возрастающей ЭС применен для одновременной регистрации ионов-предшественников и соответствующих фрагментных ионов	[34]
Белый и красный женьшень	Гинсенозиды	Разработка <i>in house</i> базы данных; 2D ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–ИП–QTOF/МС; МС/МС, МС ^E (ЭС, 50-80В); HILIC-NH ₂ , 10 mM HCOONH ₄ в H ₂ O – ACN (0.2%МК), 0.2%МК в H ₂ O – ACN;	Использование программного обеспечения UNIFI software (Waters, USA) для обнаружения соединений; Идентификация обнаруженных соединений путем сравнения МС/МС данных с данными индивидуальных стандартов и литературными данными. Особенности: Возможность различать совместно элюирующиеся изомеры, разделенные по ионной подвижности.	[146]

*МК, (ТФ)УК – муравьиная и (трифтор)уксусная кислоты;

(Л)ИЛ – (линейная) ионная ловушка,

(Н)ЭС – (нормированная) энергия соударений;

ДИС – диссоциация, индуцированная соударениями;

Q, q – квадруполь;

QTOF – квадруполь/времяпролетный масс-анализатор.

Исследователи часто сосредотачиваются на определенной группе метаболитов (см. п. 1.6), чтобы составить предполагаемую схему фрагментации [24,34,115,147,148]. Использование таких шаблонов и правил фрагментации неизбежно для различения изомерных компонентов со сложной структурой. Использование такого режима сбора данных как информационно-зависимый анализ (ИЗА), позволяет автоматически собирать МС² спектры с заданными пользователем параметрами. Его часто сочетают с функцией динамического исключения, которая помогает игнорировать избыточные сигналы фоновых ионов, особенно при анализе неочищенных экстрактов [149]. Чем более изучены пути фрагментации, тем с большей точностью и достоверностью могут быть идентифицированы структуры соединений из данной группы. Такие тщательные исследования фрагментации ведут не только к идентификации известных соединений, но и к предварительной идентификации их структурных аналогов (МСИ уровень 3), максимально повышая информативность проводимой процедуры дерепликации [24,115,139]. Если исследованы все варианты структурного полиморфизма и процесс фрагментации становится полностью предсказуемым для конкретной группы соединений [138,144,150], может стать возможной компьютерная идентификация *de novo* с использованием ЖХ-МС/МС данных (п 1.2.1). Однако следует учитывать ограничения методов МС/МС по сравнению с ЯМР. Например, порядок связи сахаридных остатков в боковой цепи в большинстве случаев не может быть определен [115,133]. Другим примером является ряд кофеил-феруилхинных и диферуилхинной кислот в *L. ericoides* Mart, которые не удалось отличить друг от друга на основании ЖХ-МС/МС данных [34]. Те же проблемы актуальны для стереоизомеров и некоторых структурных изомеров из многих других классов НП. В качестве возможного решения может быть применен подход учета биосинтетических путей для ограничения пространства поиска молекулярных структур [34].

Использование мощных гибридных ВЭЖХ-МС-ЯМР методов является многообещающим способом выполнения дерепликации или подтверждения предложенных структур. Когда ЯМР сочетается с ЖХ, УФ и МС в *online* системе, расходуется большое количество дорогих растворителей (например, D₂O, CD₃CN) [151–153], поэтому более жизнеспособным вариантом является автономная *offline*

комбинация этих методов обнаружения. Это может быть осуществлено с помощью многократного захвата разделенных аналитов в системе ВЭЖХ-ДАД-МС-ТФЭ-ЯМР [137,142,154]. Подробная стереохимическая информация, получаемая посредством ЯМР-спектроскопии, позволяет идентифицировать изомеры, например гиперозид и изокверцитрин [137]. Подробный обзор существующих подходов на основе ЯМР можно найти в недавно опубликованных обзорных статьях [22,155]. Хотя дерепликация компонентов может быть выполнена непосредственно в неочищенных экстрактах, подготовка образцов для выделения целевых химических классов и фракционирование под контролем биоанализа (рис. 1.1) обычно приводят к обнаружению многих сопутствующих представляющих интерес соединений [14].

1.2.3 Предиктивный скрининг метаболитов

Предиктивный скрининг метаболитов (ПСМ) является многообещающим способом проведения дерепликации и целевого обнаружения структурно родственных соединений. Идея этого подхода относительно проста: на основании знаний о структурном полиморфизме и путях биосинтеза группы соединений можно предсказать ряд их структурных аналогов [145]. Затем следует построить расширенную *in silico* базу данных, содержащую структуры с одной или несколькими принятыми модификациями. Наконец, информация о путях фрагментации, полученная при анализе стандартных образцов эталонных соединений, может быть использована для подтверждения аннотации наблюдаемых соединений, которые имеют точное соответствие молекулярных масс с молекулярными массами из построенной базы данных. Используя эту стратегию, в листьях *P. ginseng* было обнаружено 945 основных и второстепенных гинсенозидов, включая 662 потенциально новых соединения [145]. Возможно, было бы целесообразно использовать аналогичный подход для прогнозирования биологической активности существующих НП и их аналогов [156], чтобы ограничить количество возможных мишеней для ПСМ.

1.3 Целевое ВЭЖХ-МС определение биомаркеров растений

Разработка системы контроля безопасности, подлинности и качества средств традиционной медицины, БАД и ФПП давно обсуждается в обществе [23]. Для этой цели биоактивные соединения, служащие биомаркерами (БМ), следует определять в сложной матрице, такой как экстракты растений, морских организмов и пищевых

продуктов. Поскольку целевые соединения могут быть как неполярными, так и полярными и термически лабильными, для их экстракции и определения часто могут потребоваться разные условия. БМ уже установлены для многих растительных препаратов, используемых в традиционной медицине [157]. Целевой список, содержащий МЗР переходы для всех БМ, может использоваться совместно со спектральной библиотекой для более надежной идентификации БМ в режиме ИЗА. Эта аналитическая методология позволила провести быстрый и эффективный скрининг 79 растительных препаратов с использованием 98 отобранных БМ для контроля качества растительных пищевых добавок. Анализы более 104 пищевых добавок показали хорошую эффективность разработанного метода. Токсичные вещества и примеси также могут быть обнаружены в пищевых добавках с использованием целевого подхода.

Для осуществления целевого скрининга БМ также может быть использован метод МСВР. Сбор данных в режиме полного сканирования МС с разрешением 60 000 и скрининг узких (5 м.д.) окон масс с использованием масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой с одновременной регистрацией МС² спектров в режиме ИЗА с разрешением 15 000 использовали для идентификации, количественной оценки и подтверждения незаконных фальсифицированных препаратов для похудения в растительных пищевых добавках [158].

Определение БМ в основном проводят методами внешнего или внутреннего стандарта с использованием факторов отклика (ФО) для каждого соединения или их соотношений с коэффициентом, рассчитанным для внутреннего стандарта, соответственно. Возможности этих методов могут быть расширены за счет применения относительно нового подхода – количественного анализа многокомпонентных систем (КАМС) [159]. Первоначально разработанный для простых и воспроизводимых методов ЖХ-УФ, этот метод показал приемлемую точность в гораздо более зависящих от внешних условий измерениях, проведенных методом ВЭЖХ-МС [25,160,161]. КАМС основан на расчете относительных факторов отклика (ОФО) с использованием одного из аналитов в качестве эталонного (реперного) соединения, концентрация которого рассчитывается методом внешнего стандарта. Таким образом, зарегистрированные интенсивности ионов-предшественников [25], ионных-переходов [161] и молекулярных ионов

[160], использовали для расчета ОФО для определяемых соединений. Для соединения, эталонный стандарт которого недоступен, ОФО может быть приравнен к 1.00 [25] или рассчитан путем усреднения ОФО его соседей по хроматограмме.

Целевое определение БМ методами ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР позволяет однозначно отбраковывать подделки и фальсифицированные продукты, но заменители, приготовленные с использованием другой части растения или более дешевого источника (например, родственного вида), все же могут быть ошибочно квалифицированы как годные [161]. По этой причине подробные химические профили используются в качестве «отпечатков пальцев», которые позволяют различать образцы разного качества и географического происхождения [162,163], а также образцы разного возраста и условий выращивания [164,165]. В этих исследованиях несколько выбранных гинсенозидов служили набором БМ женьшеня. После их определения с помощью ВЭЖХ-УФ или ВЭЖХ-МС были построены химические «отпечатки пальцев» для различных типов образцов, и показана возможность статистически выявлять различия между группами этих образцов. Абсолютные площади пиков [162], относительные площади пиков [165] и градуированные уровни концентрации [163], а также точные количества (концентрации) [166] соответствующих БМ могут в дальнейшем использоваться в качестве переменных в статистическом анализе, включая иерархический кластерный анализ (ИКА), анализ методом главных компонент (МГК), методом частичных наименьших квадратов в сочетании с дискриминантным анализом (МЧНК-ДА) и др. Например, на основе построенной МЧНК-ДА модели авторы работы [166] смогли определить степень смешения для образцов американского женьшеня и корейского белого женьшеня с разрешением на уровне 10% фальсификации.

Следует отметить, что во многих случаях из списков основных компонентов родственных видов или разных частей растений можно выбрать высокоспецифичные БМ. Было показано, что гинсенозид Rf не содержится в экстрактах североамериканского женьшеня (*P. quinquefolius*), которые вместо него содержат значительное количество псевдогинсенозида F₁₁ [167]. Таким образом, используя метод ВЭЖХ-УФ-МС/МС, можно определить отношение F₁₁ к Rf, которое следует использовать для идентификации азиатского женьшеня и

определения того, загрязнен ли он североамериканским женьшенем. Поэтому возможность выбора высокоспецифичных или уникальных БМ должна быть изучена до построения и применения зачастую плохо воспроизводимых «отпечатков пальцев» (см. п. 1.5).

Хотя целевой анализ и требует аналитических стандартов высокой чистоты, он обеспечивает прямые средства для оценки качества и кластерного анализа различных растительных материалов и других образцов природного происхождения, и, что важно, все последствия таких оценок основаны на подтвержденном содержании определенных биологически активных компонентов.

1.4 Ненаправленное ВЭЖХ-МС профилирование метаболитов растений

Для большинства вторичных метаболитов использование методов мягкой ионизации, таких как ЭРИ и ХИАД, позволяет обнаруживать молекулярные ионы или молекулярные аддукты. Таким образом, самый простой способ выполнить сравнение образцов — преобразовать исходные ВЭЖХ-МС данные для каждого образца в массив RT — значение m/z — площадь пика, тем самым создав новое пространство признаков для последующего статистического анализа данных. Для вторичных метаболитов морских микроорганизмов, растений, бактерий и грибов было предложено несколько протоколов для проведения ненаправленного профилирования метаболитов [168–171]. Объем информации, полученный даже за один ВЭЖХ-МС анализ, может быть обширным, и использование специального программного обеспечения для обработки и сравнения таких данных имеет решающее значение. Процедура получения и обработки данных включает несколько этапов. Во время сбора данных, в отличие от режима регистрации полного профиля сигналов (profile), в котором сигнал массы представлен кривой Гаусса, часто используется режим центрирования (centroid), который проецирует каждый сигнал как точное единичное значение m/z . Далее выделение и выравнивание хроматографических пиков может выполняться с помощью специализированного программного обеспечения, например MetAlign [172], XCMS [173], MZmine [174] и ACD/IntelliXtract [175]. Точные значения m/z часто преобразуют в номинальные массы, в основном из соображений более быстрой обработки данных. При этом, исходные точные значения m/z выровненных сигналов могут быть автоматически восстановлены, например, в MetAlign с помощью алгоритма MetAccure [172].

Другим ключевым этапом является устранение избыточности, вызванной наличием массовых сигналов изотопологов, аддуктов, димеров и побочной фрагментацией в источнике ионизации [176]. Для этой цели можно использовать собственное программное обеспечение или алгоритмы (скрипты) в MS Excel [168,176–178]. Далее проводится процедура аннотации пиков. Идентификация соединений, в частности вторичных метаболитов, с помощью метода метаболомного профилирования сталкивается с некоторыми серьезными трудностями и часто дает неоднозначные результаты. Во-первых, по сравнению с первичными метаболитами количество коммерчески доступных стандартов вторичных метаболитов все еще очень ограничено. Во-вторых, в автоматизированной онлайн-процедуре разделения ЖХ, УФ-детектирования, МС-измерения и/или МС/МС-фрагментации сигналов трудно достичь одинаковых оптимальных уровней для достоверной идентификации всех соединений [172]. Третьей проблемой является отсутствие исчерпывающих специализированных баз данных [171,172,174,178] и необходимость принятия стандартизированного формата записи [179]. Поэтому цель состоит в том, чтобы провести быструю дерепликацию известных компонентов, что может быть достигнуто путем поиска в базе данных с использованием полученных МС² спектров [169]. Несколько недавних обзоров были посвящены существующим базам данных, содержащим вторичные метаболиты [180,181]. Например, MS-FINDER версии 2.24 содержит в общей сложности 2 282 521 структур эндогенных и экзогенных метаболитов в качестве пространства поиска [182]. Химическое пространство, охватываемое только НП, также очень велико [183], и на сегодняшний день в базе Dictionary of Natural Products (DNP) зарегистрировано более 250 000 НП [184]. База данных KNApSAcK [185], разработанная в Нарском институте науки и технологии (NAIST, Япония), содержит 50 048 соединений природного происхождения с указанием их источников и литературных данных. Серия KEGG [186], разработанная в Институте химических исследований (Киотский университет, Япония), позволяет осуществлять поиск физико-химических свойств, путей биосинтеза, регуляции ферментов и метаболических взаимодействий по названию НП. Охват спектров в этих базах данных невелик по сравнению с общим количеством известных НП [179]. Более того, использование данных из

спектральных библиотек может приводить к искажениям при идентификации, так как они в основном содержат метаболиты организмов из хорошо изученных родов.

Различные основанные на ВЭЖХ-МС стратегии для ненаправленного метаболического профилирования [9,172,173,176–178,187–192] представлены в таблице 1.6. Эти подходы можно разделить на две основные группы: первые основываются на точном измерении m/z [168,172,177,187], а вторые – на регистрации MS^2 спектров [9,101]. Последнее часто требует проведения нескольких анализов с использованием отдельных диапазонов масс из-за ограниченной скорости сканирования масс-спектрометров [9,176]. В качестве альтернативы, на заключительном этапе MS^n данные могут быть получены только для выбранных маркерных соединений [172,177,187]. Когда приоритет отдается точности массы, времяпролетные (TOF) масс-анализаторы, которые имеют гораздо более высокую частоту сканирования как в режиме полного сканирования, так и в режиме сканирования $MS/MSBP$ без потери разрешения, превосходят приборы, основанные на преобразовании Фурье, например, орбитальные ионные ловушки, для которых разрешение пропорционально времени сканирования [169,193]. Окончательное отнесение соединений часто основано на объединении различных источников информации, т. е. точной массы, изотопного паттерна, RT , картины фрагментации, расчетных значений $\log P$ и pK_a , а также максимумов поглощения в УФ/видимой области [169,170,172,178].

Для углубленного изучения метаболических процессов необходимы дополнительные средства, такие как двумерное хроматографическое разделение или использование различных образцов, меченных изотопами. Использование особых условий выращивания растений, внесение в качестве питательных веществ $^{15}NH_4^{15}NO_3$ и $Mg^{34}SO_4$, выращивание в условиях $^{13}CO_2$) позволяет получать экстракты из образцов, обогащенных определенными изотопами. Сопоставление наборов данных, полученных при анализе таких экстрактов и экстрактов из тех же растений, выращенных в нормальных условиях, позволяет отбросить несколько сотен возможных элементных составов для каждого соединения, фиксируя все меченые изотопами элементы (C, N и S), и, наконец, приводит к извлечению одного элементного состава для каждого соединения [194,195].

Таблица 1.6 – Примеры применения стратегий ненаправленного профилирования

Источник НП	Соединения	Методы*	Описание	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i>	700 пиков; 200 отдельных компонентов.	капВЭЖХ–ЭРИ(±)–ИЛ/МС; ИЗА-МС ⁿ ; C18; H ₂ O – ACN (УК, pH 5.5, 6.5 mM CH ₃ COONH ₄);	Деконволюция с помощью программного обеспечения Mass Frontier 3.0 (Thermo Fisher Scientific); Идентификация сигналов и обработка данных с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (MetabAlign (альфа-версия); Идентификация соединений методом тандемной МС с использованием ИЗА-сканирования (НЭС, 40%). Особенности: Сравнение колонок разной длины. Использование более длинной колонки обеспечило гораздо большее количество разделенных пиков, по крайней мере, частично за счет уменьшения подавления ионизации;	[187]
<i>Arabidopsis</i> (листья и корни)	800/1400 сигналов (<i>m/z</i>); 21/24 предварительно идентифицированных компонентов.	капВЭЖХ–ЭРИ(±)–QTOF/МС; C18; H ₂ O – ACN (0.1% МК);	Разделение диапазона масс от 106 до 1000 Да на окна масс по 25 Да для ручного поиска сигналов; Идентификация сигналов по RT и <i>m/z</i> ; Идентификация сигналов и обработка данных с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (MetaboliteID, Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния); Обработка данных с использованием MS Excel и собственного программного обеспечения; Идентификация соединений методом тандемной МС. Особенности: Анализ различных разбавленных экстрактов и проверка полученных калибровочных кривых для оценки линейного диапазона;	[177]
Potatotuber (ткани)	1400 – 2000 пиков.	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(+)-QTOF/МС; C18; H ₂ O – ACN (0.1% МК);	Получение в режиме сканирования нескольких метаболических профилей в формате MassLynx (Waters, США); Идентификация сигналов и обработка данных с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (MetAlign). Использование алгоритма выравнивания для объединения всех пиков во всех наборах данных в упорядоченной матрице данных; Удаление пиков, представленных в менее, чем 4 образцах, отфильтрованы; Особенности: Для оценки правильности разработанного подхода в менее благоприятных условиях были включены не только градиентная фаза, но и хроматографические фазы пропускания и промывки; Матрица данных использовалась для расчета стандартного отклонения значений интенсивностей;	[188]
<i>Solanum lycopersicum</i> (фрукты, сок, мякоть)	4000 – 5000 пиков; 43 идентифицированных аналитов.	Разработка in house базы данных; ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)-QTOF/МС; C18; H ₂ O – ACN (0.1% МК);	Программная коррекция RT для выравнивания всех <i>m/z</i> сигналов; Обработка данных с помощью MetAlign. Извлечение сигналов с S/N выше 3; Использование сценария MetAccure для автоматического расчета корректных точных масс для сигналов, извлеченных и выровненных с помощью MetAlign; Идентификация путем сравнения значений <i>m/z</i> и RT со стандартами; Поиск совпадений <i>m/z</i> в базе данных; Идентификация и подтверждение метаболитов с использованием точных масс в сочетании с МС/МС данными; Идентификации	[172]

Продолжение таблицы 1.6

			с помощью расширенного внешнего поиска в базах данных PubChem и MedLine; Подтверждение поиском в Dictionary of Natural Products и базах данных SciFinder. Особенности: Создание внутренней in house базы данных; Установление динамического диапазона интенсивности сигнала для получения высокой точности измерения массы.	
<i>Arabidopsis</i> (ткани)	1000 пиков (50% пиков с MC^2 спектрами); 90 предварительно идентифицированных компонентов; 280 стандартных соединений.	Разработка in house базы данных; ВЭЖХ–ЭРИ(±)–QTOF/МС; ИЗА; C18; H_2O – ACN (0.1% МК);	Сканирование в сегментированных диапазонах масс (60 Да); Обработка данных с использованием методов нормализации, фильтрации низкоинтенсивных данных и деконволюции изотопных пиков; Идентификация путем сравнения значений m/z и RT со стандартами; Создание библиотеки МС/МС данных; Идентификация с использованием литературы и поиска по базам данных (MassBank, KNApSAcK). Особенности: 25 ВЭЖХ-МС анализов каждого образца; Создание внутренней in house базы данных; Обнаружение структурно родственных метаболитов с помощью поиска спектральных мотивов (ДФИ кемпферола).	[9]
14 растений из Brassicaceae, Gramineae и Fabaceae.	860 аутентичных стандартов; 497 соединений с МЗР переходами; 343 метаболитов во всех образцах;	ВЭЖХ–ЭРИ(±)–QTOF/МС; МЗР; C18; H_2O – ACN (0.1% МК);	Создание большой базы данных, состоящей из МС и MC^2 спектров, условий детектирования, МЗР, переходов и индексов RT; Идентификация и количественный анализ метаболитов в режиме МЗР. Особенности: Прямой мониторинг идентифицированных соединений, проводимый на основе заданных RT и МЗР переходов. Полностью автоматизированная подготовка проб с использованием автоматизированной системы обработки жидкостей (ALHS).	[189]
<i>L. salviaefolia</i> Cham., и <i>L. lupulina</i> Cham	14 аутентичных стандартов; 23 минорных пика предварительно идентифицированы	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–QTOF/МС; MC^3 ; C18, H_2O – ACN (0.1% МК);	Изучение фрагментации исследуемых соединений; Обработка данных с использованием программного обеспечения MassLynx (Waters, США); Выравнивание пиков на основе допуска смещения RT $\pm 0,05$ мин и $m/z \pm 0,05$ Да; Проверка наличия оставшихся молекулярных формул в базах данных (база данных PubChem и Dictionary of Natural Products); Перекрестный поиск соединений, о которых сообщалось в литературе; Соответствие зарегистрированным УФ-спектрам; Добавление хемотаксономической информации для окончательного выбора предполагаемых структур. Особенности: Использование Log P для идентификации; Исследование взаимных превращений аналитов; Аннотация основана на перекрестном поиске между информацией о хемотаксономии и молекулярными формулами.	[178]
African propolis	Более чем 100 признаков в каждом образце	ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(±)–ФП/МС; ИЗА- MC^3 , C18; H_2O – ACN (0.1 % МК);	Идентификация сигналов и обработка данных с использованием программного обеспечения для поиска метаболитов (MZMine); Выбор 100 признаков для каждого образца по площади пика; Аннотация пиков путем поиска точной массы в Dictionary of Natural Products с помощью собственного макроса MS Excel; Дальнейшая идентификация путем сравнения	[174]

Продолжение таблицы 1.6

			полученных картин фрагментации МС ⁿ и максимумов УФ-поглощения с литературными данными. Особенности: Для идентификации использовали информацию о количестве атомов углерода и кислорода в молекулах и степени ненасыщенности	
<i>O. sativa</i> L. ssp. <i>indica</i> , <i>O. sativa</i> L. ssp. <i>Japonica</i> (листья)	51 аутентичных стандартов; 698 метаболитов; 135 предварительно идентифицированных компонентов; 277 определены количественно;	ВЭЖХ–ЭРИ(±)–QqQ(ЛИЛ)/МС; ИЗА; С18; Н ₂ О – АСН (0.04% УК);	Обзорное сканирование в режиме СИМ (минимальная ЭС, 5В) в сочетании с МС ² ; Устранение избыточных сигналов с помощью собственного программного обеспечения; Создание библиотеки МС ² спектров; Получение точных значений <i>m/z</i> для идентификации/аннотации обнаруженных метаболитов; Идентификация путем сравнения значений <i>m/z</i> , RT и паттернов фрагментации со стандартами; Особенности: 80 ВЭЖХ-МС анализов для каждого образца; Использование собственного in house ПО для устранения избыточности данных; Использование временных сегментов (60-100 переходов, 3 в трех сегментах) для сбора данных в МЗР режиме.	[176]
<i>P. ginseng</i> (корни, листья, цветы, ягоды, семена)	2829 признаков около 60 в каждом образце	Разработка in house базы данных на основе UNIFI (Waters, USA); ВЭЖХ–ДМД–ЭРИ(–)–QTOF/МС; МС ^E (ЭС 50–100 В), С18; Н ₂ О – АСН (3 мМ УК);	Применение UNIFI 1.8 (Уотерс, Милфорд, США) в сочетании с поиском по внутренней библиотеке для автоматической аннотации метаболитов; Устранение ложных сигналов молекулярных ионов путем введения (1) диапазона значений интенсивности; (2) порога интенсивности; (3) диапазона RT; (4) учета аддуктов, включая димеры; (5) величины заряда <i>z</i> = 1; Многомерный статистический анализ МС ^E данных для поиска потенциальных БМ; Перекрестная проверка потенциальных БМ. Особенности: Пополнение библиотеки средств традиционной медицины, используемой в UNIFI, с обновлением и дополнением литературы; Проверка БМ путем разделения образцов на подлинные и фальсифицированные; Обнаружены неизвестные ацилированные гомологичные соединения.	[187]

*МК, (ТФ)УК – муравьиная и (трифтор)уксусная кислоты;

(Л)ИЛ – (линейная) ионная ловушка,

(Н)ЭС – (нормированная) энергия соударений;

Q, q – квадруполь;

QTOF – квадруполь/времяпролетный масс-анализатор.

Такая стратегия может быть использована для открытия многих новых вторичных метаболитов в лекарственных растениях. Примечательно, что наиболее часто применяемые для экстракции, разделения и детектирования процедуры нацелены в сторону соединений среднеполярной природы, поэтому можно ожидать, что в основном будут обнаруживаться вторичные метаболиты, такие как (поли)фенолы, гликозиды, алкалоиды и их производные. [172]. Различные стратегии подготовки образцов перед ЖХ-МС и ГХ-МС анализом для метаболомных исследований описаны в существующей литературе [196,197]. При работе с трудно ионизируемыми соединениями настоятельно рекомендуется очистка экстракта на колонках для твердофазной экстракции [198]. В условиях ОФ ВЭЖХ-МС могут наблюдаться ограничения, вызванные подавлением ионов из-за перекрывающихся пиков соединений, что затрудняет извлечение сигналов с низкой интенсивностью или не позволяет исключить m/z сигналы, вызванные неизбежной фрагментацией в источнике ионизации. Таким образом, возможным вариантом решения этой проблемы с целью охвата большей части метаболома является использование различных платформ, таких как капиллярная ЖХ [199,200], хроматография гидрофильного взаимодействия [201,202] и ортогональная двумерная ЖХ [32,143,145,146].

В исследовании [187] изучались возможности реализации нанопотоковой ВЭЖХ-МС для метаболомных исследований. Используя три монолитные колонки разной длины (30, 60 и 90 см) с одним и тем же внутренним диаметром 200 мкм, было продемонстрировано, что более длинная колонка может обеспечить гораздо большее количество разделенных пиков (около 200). Гидрофильная (ГФ) хроматография в сочетании с МС предлагает привлекательную альтернативу традиционной ОФ ВЭЖХ, учитывая большую долю полярных НП [201]. Разделение методом ГФ ВЭЖХ использовали для обнаружения олигосахаридов, гликозидов, аминокислот, аминокислот и сахарных нуклеотидов в экссудатах флоры черешков полностью разросшихся листьев *Cucurbita maxima* [202]. Таким образом, объединение данных, полученных с помощью ГФ и ОФ ВЭЖХ профилирования, приводит к обнаружению новых метаболитов в экстракте и более полной оценке его химического состава. Такая интеграция в форме метода 2D-ВЭЖХ была успешно применена для определения гинсенозидов в растениях рода *Panax* [143,145,146].

Более того, десять пар соэлюирующихся изобарных сапонинов женьшеня, которые не были разрешены с помощью 2D-ВЭЖХ-МС/PS, можно было разделить с помощью спектроскопии ионной подвижности [146]. Использование подобных многомерных аналитических подходов в ненаправленном метаболическом профилировании представляется чрезвычайно перспективным; однако многие дополнительные проблемы, связанные с выравниванием пиков и нормализацией, неизбежно возникают из-за сложности используемой аппаратуры.

Судя по всему, за последние годы был достигнут огромный прогресс в инструментальном оснащении метода ВЭЖХ-МС, создании доступных баз данных и программных инструментов обработки данных. Тем не менее обычно лишь небольшую часть обнаруженных метаболитов в конечном итоге удастся идентифицировать. Например, в работе [9] для хорошо изученного модельного растения (*Arabidopsis thaliana*, Резуховидка Таля) окончательно аннотировано только 2% пиков, несмотря на использование большого количества данных и множества баз данных. Следовательно, получение подробных, претендующих на полноту метаболических профилей невозможно, поскольку многие хроматографические пики могут быть аннотированы только с ограниченной степенью достоверности [168]. В качестве альтернативы в исследовании [188] с использованием специально разработанного программного обеспечения пики сначала были отранжированы на основе характеристик RT и m/z для получения матрицы выходных данных, которая затем использовалась для многофакторного анализа. В результате были четко определены различающиеся соединения, однако их идентификация потребовала дополнительных усилий.

Таким образом, большинство метаболомных исследований в конечном итоге ведут к открытию БМ и, как правило, следуют двумя путями: первый заключается в том, чтобы аннотировать и каталогизировать как можно больше соединений, что уже является серьезной проблемой [203], в то время как вторая стратегия сосредоточена на попытках аннотации пиков, которые статистически значимо различаются между образцами [188,194,195]. В последнем случае на основе визуализации и статистического анализа полученных данных можно сузить набор целевых соединений [168,188,192]. Путем ручной интерпретации MS² спектров выбранных пиков может быть выполнена дерепликация обнаруженных БМ (см. п. 1.2.2). На

следующем этапе можно оптимизировать условия определения, включая напряжения, энергии соударений (ЭС), выбрать внутренние стандарты, МЗР переходы, длины волн (для УФ-обнаружения) либо для выбранных, либо для всех аннотированных соединений. Когда количественная оценка выполняется в режиме МЗР, общее количество метаболитов, регистрируемых одновременно, может быть увеличено до 1000 с использованием сегментированного по времени режима МЗР [176]. Однако при метаболомных исследованиях абсолютные значения концентраций метаболитов удастся установить редко. Вместо этого распределение уровней содержания метаболитов количественно оценивается по сравнению с контрольной группой [202].

1.5 Кластеризация образцов с использованием исходных («сырых») МС и ВЭЖХ-МС данных

Контроль качества фармацевтических и растительных продуктов часто основывается на целевом определении активного ингредиента (ингредиентов) и примесей методом ВЭЖХ-УФ или ВЭЖХ-МС. Однако в более широком смысле оценку качества, подлинности и безопасности можно охарактеризовать как задачи, решаемые с помощью кластерного анализа [23], т.е. можно дифференцировать образцы по категориям, связанным с их качеством, возрастом, географическим происхождением и т.д. В настоящее время повсеместно внедряются методы распознавания образов с помощью машинного обучения, а аналитические методы также подвергаются все большей цифровизации [181]. ВЭЖХ-МС анализ образца дает набор измерений времени, m/z и интенсивности. Прямой МС анализ, как и ВЭЖХ-УФ-МС, может дать достаточно данных для работы статистических моделей (МГК, МЧНК-ДА, ИКА, ПФА и т.д.), и успех применения этих моделей подразумевает возможность различения образцов. Были попытки разработать такие ненаправленные аналитические подходы на основе неаннотированных (unassigned, annotation-free) МС данных [204–211].

1.5.1 Использование прямого МС анализа для распознавания образов

Прямой ЭРИ-МС анализ использовался для различения метаболитических отпечатков листьев *P. nil* в различных физиологических состояниях [204]. Анализ образцов нефракционированного сока дал сложные спектры с пиками на значениях m/z , согласующимися с $[M-H]^-$ ионами органических кислот и сахаров, которые, как

известно, присутствуют в апопласте листьев. Затем полные наборы данных, полученные для растений, отобранных через 24 часа, 48 часов или 1 неделю после воздействия коротким световым днем, с соответствующими контролем в условиях продолжительного дня, были подвергнуты разложению МГК с последующим дискриминантным функциональным анализом (ДФА), выполненным для ГК с учетом априорных знаний, какие спектры относились к какой группе образцов. Кластеры для каждой из 6 групп были полностью или частично разделены, что указывает на то, что эти растения были физиологически разными. Метод ЭРИ-МС с последующим извлечением признаков был предложен для МС-профилирования этанольных экстрактов прополиса [205]. Для каждой из исследуемых групп образцов (европейский, североамериканский, африканский, красный, коричневый и зеленый бразильский прополис) были отобраны два характерных сигнала m/z . Чтобы продемонстрировать четкое разделение образцов прополиса на группы, соответствующие географическим регионам на графике счетов МГК, были выбраны три ГК, покрывающие 58% общей дисперсии данных.

Подходы, основанные на времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС), имеют множество применений в анализе средств традиционной медицины [212]. Для быстрой идентификации клинически важных водорослей и микроорганизмов можно провести быстрое сравнение масс-спектров, полученных в режиме полного сканирования. Для проведения статистического анализа масс-спектры должны обрабатываться без потери количественных закономерностей. Например, в работе [206] все масс-спектры сначала были обработаны с использованием опций коррекции базовой линии и обнаружения пиков программы DataExplorer 4.0 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, США). Относительная интенсивность вычислялась путем нормализации, т.е. установлением 100% уровня для наиболее интенсивного пика в масс-спектре. Пики, включаемые в матрицы нагрузок, были отобраны по соответствию одному из следующих критериев: 1) присутствуют во всех спектрах; 2) присутствуют не менее чем в 80% спектров с минимальной интенсивностью 15%; 3) пики, имеющие минимальную интенсивность 30%. Дендрограммы строились методом невзвешенных парных групп со средними арифметическими (UPGMA). Сравнение дендрограмм, построенных с использованием МАЛДИ-МС и анализа

последовательности 16 S рДНК, показало, что оба подхода позволили разделить штаммы на одиннадцать эквивалентных групп. Примечательно, что в существующих публикациях, посвященных сравнению образцов трав, собранных из разных районов произрастания с применением метода МАЛДИ-МС, преобладают подходы, основанные на целевом выделении признаков [212-213].

Прямой анализ в масс-спектрометрии в реальном времени (DART) использовался как новый быстрый метод для идентификации средств традиционной медицины [140, 207, 214]. В этом методе после термодесорбции аналитов происходит ионизация за счет взаимодействия с частицами в возбужденном состоянии в потоке электрически разряженного газа. Масс-спектры DART инъекций Danshen, поставляемых пятью производителями, были обработаны с помощью МГК [207]. Данные были организованы в виде матрицы X размером $M \times N$ с M строками (выборками) и N столбцами (ионами). Площади пиков на хронограммах, полученных в режиме селективного ионного мониторинга (СИМ), были элементами в полученной матрице данных. До проведения МГК в качестве предварительной обработки применяли масштабирование до единичной дисперсии. На графике счетов МГК наблюдалась очевидная кластеризация образцов от разных производителей.

Таким образом, прямое снятие «отпечатков пальцев» на основе МС может служить высокопроизводительным инструментом для определения типа, происхождения и даже физиологического состояния образца растения и конкурентоспособно по скорости с ЯМР [215], ИК-Фурье [216] и методами, основанными на ФЛ обнаружении [217].

1.5.2 Использование ВЭЖХ-УФ-МС анализа для распознавания образов

После анализа большого набора образцов с помощью ЖХ-МС можно создать трехмерный массив, содержащий элементы, показывающие интенсивность иона с определенным отношением m/z при определенном RT в каждом образце. Для обработки таких наборов данных можно использовать такие методы, как PARFAC [218,219] и Tucker3 [220]; однако из-за сложности этих подходов их применение все еще очень ограничено. Разные способы уменьшения размерности для ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС данных были успешно применены для распознавания источников НП с использованием более простого подхода – МГК [208–211].

Для оценки химических характеристик образцов женьшеня *Rapax* разного возраста и сезона сбора, применяли ВЭЖХ-УФ-профилирование [208]. Отпечатки пальцев ВЭЖХ из 30 партий образцов оценивали с использованием МГК и ИКА. Были проанализированы хроматограммы, каждая из которых состояла из 9490 точек. После коррекции базовой линии, вейвлет-преобразования для шумоподавления и выравнивания пиков на основе шестнадцати общих сигналов во всех проанализированных образцах данные первых семи минут на всех хроматограммах были удалены, в результате чего была получена матрица данных 30×8290 . ИКА проводили с использованием расстояний Варда (Ward's Linkage) как способа кластеризации и расстояний Чебышева как способа измерения расстояний между образцами и кластерами [221,222]. Тридцать образцов были разделены на три основных кластера. Показано, что внутренние качества четырехлетних образцов были более приближены к трехлетним образцам по сравнению с пятилетними образцами *P. ginseng*.

При снятии ВЭЖХ-МС «отпечатков пальцев» обработка набора данных RT - m/z - I (интенсивность) является ключевой проблемой для разработки методов классификации и подтверждения принадлежности к классу. Одним из возможных вариантов уменьшения размерности, предложенным в работе [209], является отбрасывание значений RT после процедуры разметки пиков и использование только максимальных интенсивностей из всех возможных пиков отклика для каждого значения m/z . В результате логистическая регрессия, метод опорных векторов и случайный лес были применены для классификации 36 видов лекарственных растений с достаточной ($> 95\%$) точностью. Применяя нейронную сеть автоэнкодера для уменьшения размерности входных данных, авторы расширили применимость разработанного подхода [210]. Предложенная модель смогла выделить 76 классов, каждый из которых представлял пару (вид, часть растения). Алгоритмы показали высокую способность различать большинство классов (точность до 92%), исключая очень похожие пары классов (т.е. корни и корневища).

Оценивая раннюю реакцию клеток *A. thaliana* на воздействие ионов кадмия, в работе [211] сравнили три различных варианта уменьшения размерности: 1) усреднение интенсивности каждого отношения m/z за время сбора данных;

2) группировка путем разделения хроматограмм на фракции по 5 мин;

3) использование программного обеспечения для деконволюции и создания списков пиков для каждого образца. При решении проблемы сдвига RT первый подход приводит к потере информации об изобарных ионах (т.е. об ионах с одинаковой номинальной массой). Классификация контрольных образцов и образцов, подвергшихся воздействию кадмия, прошла успешно, однако были обнаружены только наиболее распространенные метаболиты. Использование процедуры группировки – компромиссное решение между временем, отведенным на предварительную обработку, и потерей информации, вызванной высоким фоновым шумом и присутствием изобарных соединений. Для каждой 5-минутной зоны была построена отдельная МЧНК модель. Классификация контрольных образцов и образцов, подвергшихся воздействию кадмия, была еще более успешной, и были обнаружены дополнительные пептидные БМ воздействия по сравнению с первым подходом. По сравнению с процедурой группировки данные, обработанные с помощью MetAlign, отображаемые в виде матрицы, содержащей значения интенсивностей для каждой пары отношений m/z и RT, включали меньшее, но сравнимое количество переменных. Параметры качества построенной МЧНК модели также оказались схожими. В результате те же выводы, что и для процедуры группировки, удалось сделать, проведя лишь одну процедуру статистического анализа. Исследование доказывает, что уменьшение размерности за счет свертывания оси времени приводит к потере информации. Тем не менее, кластеризация выборок может быть достигнута без какой-либо аннотации пиков.

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 [209]. Основными препятствиями при реализации таких методик являются неопределенность характера полученных ложноположительных/отрицательных результатов и сомнительная воспроизводимость полученных «отпечатков пальцев». Причина такой слабой достоверности в случае безаннотационного профилирования заключается в том, что используемые классификаторы работают с математическими

переменными, которые не всегда явно связаны с реальными количествами метаболитов.

1.6 Групповой анализ

Многие вторичные метаболиты растений можно сгруппировать в классы, в рамках так называемых фитохимических групп [223]. Таким образом, выполняя анализ направленный, на определенные функциональные группы (или целевые классы веществ), можно установить наличие различных групп компонентов, включая флавоноиды, терпены, фенилпропаноиды, стероидные гликозиды, алкалоиды и т.д. Исторически ВЭЖХ-ДМД профили использовали для получения информации о химических классах, присутствующих в растительном экстракте. Сходство профилей ВЭЖХ было исследовано для около 60 видов растений, что позволило включить ВЭЖХ-УФ спектр («отпечаток пальца»), содержащий RT и УФ-максимумы, в фармакопейные монографы этих растительных материалов [224]. В 2000 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ, WHO) разработала технические рекомендации по оценке растительных лекарственных средств, в которые в качестве альтернативы целевым аналитическим методам были включены такие ВЭЖХ-УФ «отпечатки пальцев» [225]. При использовании МС детектирования появляется много дополнительных возможностей для проведения группового анализа.

1.6.1 Мониторинг диагностических ионов и нейтральных потерь

На основании картин фрагментации, полученных для представителей каждой исследуемой группы соединений, могут быть выбраны диагностические нейтральные потери (ДНП, DNL) [30,33,226] и диагностические фрагментные ионы (ДФИ, DFI) [24,25–29,34]. Построение хроматограмм в режиме сканирования ионов-предшественников или СИМ с использованием сигналов ДНП и ДФИ в режиме ИЗА, соответственно, помогает визуализировать разделение аналитов из выбранных химических классов [227,228]. Например, химические профили экстракта *Eugenia jambos* L., содержащего флавоноиды и флавоноидные гликозиды, были построены с использованием ЭРИ-МС и условий диссоциации, индуцированной соударениями (ДИС) в источнике ионизации, путем регистрации сигналов, соответствующих агликонам [139]. Та же концепция применялась в недавних исследованиях [195,198], где использовались методы МСВР и МС^E (регистрация фрагментных ионов из всех

ионов-предшественников) в режиме мониторинга ионов с точными значениями m/z 287,05501 и 303,04993 для пиков, содержащих кемпферол и кверцетин, соответственно, с целью непосредственно оценить распределение этих флавоноидов с различными количествами и видами сахаридных заместителей в растениях *A. thaliana*. Запись профилей сигналов ДФИ, соответствующих конкретным группам вторичных метаболитов, может привести к прямому определению фальсифицированных продуктов. Кроме того, можно использовать режимы сканирования ДНП или псевдо-ДНП для скрининга специфических групп метаболитов, например, малонил-замещенных тритерпеновых сапонинов [30,33]. Такое групповое профилирование часто используется для облегчения дерепликации и идентификации неизвестных соединений из выбранных химических классов (таблица 1.5).

1.6.2 Фильтрация по дефекту массы

Фильтрация дефектов массы (ФДМ) в ВЭЖХ-МСВР данных уже давно используется для обнаружения метаболитов в биологических матрицах [229,230]. Первым шагом при проведении ФДМ является определение масс-дефекта эталона в соответствии с основной подструктурой. Далее по сумме дефектов массы различных заместителей рассчитывают максимальное и минимальное значения дефекта массы [231]. Интересующие молекулы могут быть выбраны из определенной таким образом прямоугольной области пространства m/z -ДМ. В качестве альтернативы для группировки сигналов метаболитов можно использовать относительный дефект массы (ОДМ), который рассчитывается в частях на миллион (дефект массы / измеренная моноизотопная масса $\times 10^6$). Например, ОДМ терпенового строительного блока изопрена (920 частей на миллион) остается постоянным для более крупных монотерпеновых, дитерпеновых и тритерпеновых олигомеров, которые имеют такое же фракционное содержание водорода [232]. ФДМ также можно применять для устранения помех сложной матрицы (например, растительного экстракта) и быстрого выделения пиков целевых соединений на масс-хроматограммах, зарегистрированных в режиме сканирования [231]. Таким образом, ФДМ в качестве метода интеллектуального анализа данных может применяться после сбора данных, что позволяет проводить повторную интерпретацию данных, если интересующие соединения относятся могут быть разделены на группы,

характеризующиеся одинаковым типом общего углеродного скелета [233–235]. Как правило, ФДМ реализуется на основе специализированного программного обеспечения, такого как PeakView (AB Sciex, Framingham, MA, USA), Metabolynx XS (Waters, Milford, MA, USA), Metworks (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) и т.д. Несколько примеров применения ФДМ [31, 231–234, 236–242] в исследовании НП представлено в таблице 1.7.

ФДМ может быть интегрирован в метод ИЗА для выполнения растрового ФДМ скрининга, например, путем задания определенной ширины по шкале m/z в режиме ступенчатого сканирования ионов-предшественников [32]. В данной работе, используя выбранное значение ширины ± 55 мДа, было сформировано правило для ИЗА, основанное на простом линейном уравнении ($y = a \times x + b$), где x – номинальная масса, y – дефект массы, а коэффициенты предсказаны теоретически. В данном случае вместо прямоугольных [239,243] и многоугольных [31,242] окон для ФДМ использовали параллелограммное окно. В стратегиях дерепликации ФДМ обычно используется в сочетании с фильтрацией по ДФИ, чтобы уменьшить количество ложноположительных идентификаций [233–235]. Рассчитанные ОДМ фрагментных ионов также могут предоставить дополнительную полезную информацию [232]. Таким образом, интеграция фильтров, основанных на ДМ, ДФИ и ДНП может повысить эффективность обработки данных [240].

1.6.3 Применение метода молекулярных сетей

Огромный объем информации МС/МС данных требует использования мощных вычислительных инструментов для комплексного структурного охарактеризовывания соединений нескольких классов. НП, имеющие одинаковую основную субструктуру (остов), обычно демонстрируют сходные модели фрагментации [231,244]. Таким образом, часто встречающиеся ионы, вероятно, являются фрагментами нескольких различных ионов-предшественников из одной или структурно родственной групп биоактивных соединений [195]. Построение молекулярной сети (molecular networking, MN) оказалось мощным инструментом для обработки МС/МС данных [244,245].

Таблица 1.7 – Параметры масс-дефект фильтров, выбранные для обнаружения соединений из разных классов

Источник НП	Компоненты	Границы масс-дефект фильтра (масса / ДМ)	Ссылка
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Офиопогононы и офиопогонины	- от C ₁₆ H ₁₁ O ₇ (0.0501 Да) до C ₂₁ H ₂₃ O ₄ (0.1590 Да) (офиопогононы) - от C ₃₂ H ₄₉ O ₉ (0.3363 Да) до C ₆₁ H ₉₅ O ₂₆ (0.6084 Да) (офиопогонины)	[231]
Semen strychni	Дигидроиндоловые алкалоиды	335–441 Да/C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂ ⁺ ± 50 мДа	[236]
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Полиметоксилированные флавоноиды	от C ₁₇ H ₁₇ O ₉ (0.070 Да) до C ₂₂ H ₂₇ O ₉ (0.1660 Да)	[237]
<i>Solanum habrochaites</i>	Гликозиды сесквитерпеноидов	ОДМ от 463 до 636 м.д. в интервале <i>m/z</i> 383-870	[232]
Radix Astragali	Астаргалозиды	- 775.4682–1015.4666 Да/440.13–562.64 мДа в положительном режиме - 773.4536–1037.4745 Да/443.63–525.92 мДа в отрицательном режиме	[238]
Отвар Wu-Zhu-Yu: <i>Euodia rutaecarpa</i> (фрукты), <i>Zingiber officinale</i> (корни), <i>Panax ginseng</i> (корни), <i>Ziziphus jujube</i> (фрукты)	Аналогичные эводиамину алкалоиды и лимониды	- 200–400 Да/144.4 мДа ±50 мДа для алкалоидов - 400–600 Да/201.3 мДа ±50 мДа для лимонидов	[233]
<i>Triticum aestivum</i> L.	Апигениновые и лютеолиновые С-гликозиды	- 400.8–447.3 Да/80.0–104.0 мДа для моногликозидов - 533.0–609.3 Да/122.0–161.5 мДа для дигликозидов - 665.0–771.5 Да/164.0–219.0 мДа для тригликозидов - 709.0–815.5 Да/169.0–219.0 мДа для ацилдигликозидов - 841.0–977.5 Да/211.0–276.5 мДа для ацилтригликозидов	[239]
<i>Lindgomyces madisonensis</i> и <i>Clonostachys</i> sp.	Эпиолитиодиоксиперазиновые алкалоиды	C ₃₁ H ₃₀ N ₆ O ₆ S ₄ ± 150 Да / ± 50 мДа	[234]
<i>Artemisiae Argyi</i> (листья)	Метоксилированные флавоноиды и хлорогеновые кислоты	- 267–418 Да/0.04–0.12 Да для флавоноидов - 337–398 Да/0.08–0.12 Да для моно- производных хлорогеновой кислоты - 483–604 Да/0.10–0.18 Да для ди- производных хлорогеновой кислоты - 629–810 Да/0.13–0.23 Да для три- производных хлорогеновой кислоты	[240]
<i>Fructus Gardeniae</i> – <i>Fructus Forsythiae</i> herb	Метаболиты из разных классов	±250 мДа / ±10 мДа	[241]
<i>Panax notoginseng</i>	Гинсенозиды	Пятиугольник (a–e): a: <i>m/z</i> 441.3738 (C ₃₀ H ₄₉ O ₂), b: <i>m/z</i> 503.3378 (C ₃₀ H ₄₇ O ₆), c: <i>m/z</i> 1421.5505 (C ₆₄ H ₉₃ O ₃₅), d: <i>m/z</i> 1467.8105 (C ₇₂ H ₁₂₃ O ₃₀), e: <i>m/z</i> 591.4630 (C ₃₆ H ₆₃ O ₆)	[242]
<i>Uncaria sinensis</i>	Индоловые алкалоиды	Восьмиугольник (a–h): a: <i>m/z</i> 182.0812 (C ₉ H ₁₁ NO ₃ ⁺), b: <i>m/z</i> 183.0917 (C ₁₂ H ₁₁ N ₂ ⁺), c: <i>m/z</i> 210.1125 (C ₁₁ H ₁₆ NO ₃ ⁺), d: <i>m/z</i> 383.2329 (C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₃ ⁺), e: <i>m/z</i> 737.3909 (C ₄₃ H ₅₃ N ₄ O ₇ ⁺), f: <i>m/z</i> 903.3758 (C ₄₄ H ₅₉ N ₂ O ₁₈ ⁺), g: <i>m/z</i> 943.3343 (C ₄₅ H ₅₅ N ₂ O ₂₀ ⁺), h: <i>m/z</i> 571.1923 (C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₁₁ ⁺)±5 мДа	[31]

Концепция MN основана на построении карты спектрального сходства посредством установления модифицированного косинусного показателя схожести спектров, где часто встречающиеся ионы представлены в виде узлов с несколькими входящими ребрами, отмечающими наличие соответствующих фрагментов для группы соединений. Поскольку структурно родственные соединения имеют сходные модели фрагментации, их узлы склонны собираться вместе, образуя кластеры. Таким образом, структурная аннотация этих узлов является ключевым этапом в MN. Используя визуализатор сети на веб-сайте глобальной молекулярной сети GNPS: Global NPs (<http://gnps.ucsd.edu>), спектры ДИС можно просмотреть и сравнить с согласованными эталонными спектрами из библиотеки GNPS, содержащей более 140 000 НП [245,246]. В работе [247] сигналы в MS² спектрах были аннотированы с использованием *in silico* баз данных всех структур НП, о которых ранее сообщалось, как о встречающихся у семейства Euphorbiaceae (подмножество Dictionary of Natural Products) [184,248]. Кластеризация соединений в сети облегчает процесс дерепликации, позволяя распространять аннотацию узлов, подключенных к идентифицированной подструктуре, и помогает определить, заслуживает ли кластер дальнейшего изучения.

MN позволяет визуализировать большие наборы данных и дает возможность отображать дополнительную информацию по сетям [247,249,250]. Например, одновременное картирование химической и таксономической информации наряду с биологической активностью позволяет целенаправленно выделять структурно новые соединения, обладающие определенной биологической активностью [247,251,252]. В работе [253] продемонстрировали полезность этого подхода для обнаружения НП путем дерепликации 58 НП из морских и наземных микроорганизмов. В другом исследовании [254] использовали комбинацию MN и добавки меченых стабильными изотопами соединений для идентификации новых аналогов нидуланин А и фунгиспорин в хорошо изученном грибе *Aspergillus nidulans*.

1.7 Классификация основанных на ВЭЖХ-МС техник, используемых в фитохимическом анализе

С точки зрения аналитической химии задача любого измерения состоит в получении качественной или количественной информации о химическом составе

образца путем оценки характеристичных сигналов, извлеченных из исходных данных, полученных в ходе анализа. В исследовании НП идентификация потенциально активных вторичных метаболитов и качественное/количественное сравнение образцов являются двумя основными задачами химиков-аналитиков. Таким образом, методы, основанные на ВЭЖХ-МС, можно разделить на три категории: методы, используемые для идентификации структурного или элементного состава; целевые и нецелевые методы количественной оценки; и методы, работающие с исходным набором данных, чтобы выполнить кластерный анализ и определить сигналы, позволяющие различать образцы или группы образцов.

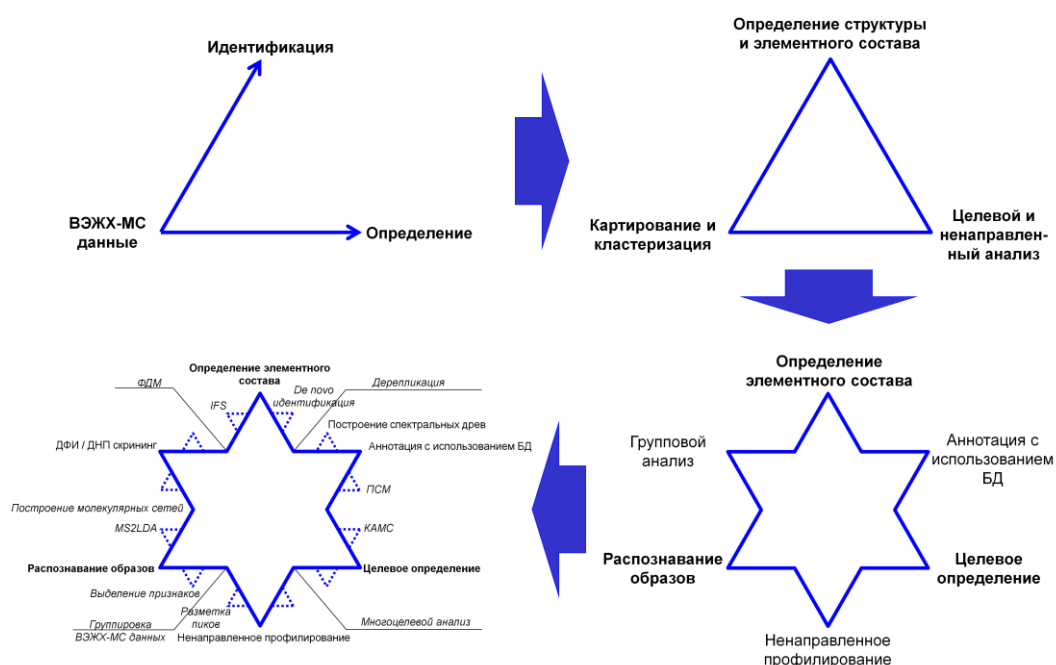


Рисунок 1.2 – Классификация процедур, применяемых в рамках ВЭЖХ-МС анализа НП.

Эти три категории образуют исходный треугольник (рис. 1.2), который служит базой для дальнейшей классификации техник и процедур, основанных на ВЭЖХ-МС. Звезда Коха [255] была выбрана в качестве модели для дальнейшей классификации используемых процедур (таблица 1.8), которые связаны друг с другом с точки зрения логики релевантности.

Как упоминалось выше (см. п. 1.5.2), трехмерные ВЭЖХ-МС данные слишком сложны, чтобы их можно было использовать в исходном виде. В нескольких исследованиях было выполнено прямое сравнение образцов с помощью метода «отпечатков пальцев» на основе МС данных [204–207]. В качестве альтернативы можно выполнить уменьшение размерности данных, включая извлечение

характеристичных m/z сигналов, путем игнорирования времен удерживания, группировки или профилирования хроматографических пиков [211]. После автоматизированной обработки данных, в последнем случае, аналитик начинает работать с выделенными признаками (пары m/z - RT вместо отдельных сигналов m/z) и их количественными характеристиками (интенсивностью соответствующих сигналов), используя их в качестве переменных в последующем статистическом анализе. Другим важным шагом является удаление избыточности, что приводит к работе с сигналами, соответствующими конкретным соединениям вместо абстрактных признаков, в то время как площади, которые более часто применяют для количественного анализа, или высоты соответствующих пиков могут использоваться в ненаправленном метаболическом профилировании [174]. Целевая количественная оценка с использованием нескольких доступных стандартов метаболитов может привести к построению химических «отпечатков пальцев» и определению уровней концентрации наиболее важных биомаркеров в каждой группе образцов. Будучи очень похожим на этот подход, многоцелевое профилирование метаболитов отличается не только процедурой количественного определения (таблица 1.8), но также требует более сложной обработки данных, включая выравнивание пиков и проверку идентичности пиков с помощью базы данных из-за возможной неправильной идентификации.

Целевое определение аналита предполагает его идентификацию, однако эта идентификация основана на сравнении с эталонным стандартом. Следовательно, это следует отличать от процедур идентификации, которые основаны на параметрах, зависящих от структуры, например, в КАМС относительное время удерживания используется для идентификации аналитов. Такие параметры, включая, конечно, сигналы в масс-спектрах, полученных в режиме сканирования и MS^2 спектрах, можно найти во многих базах данных, используемых при анализе НП. Таким образом, аннотация пиков с помощью базы данных является самым быстрым способом выполнить предварительную идентификацию компонентов экстракта с помощью ВЭЖХ-МС. Предсказывание таких параметров в расширенных *in silico* базах данных открывает новые возможности для обнаружения и определения структурных аналогов известных НП.

Таблица 1.8 – Список аналитических процедур, выполняемых с помощью МС и ВЭЖХ-МС методов при анализе НП

Аналитическая процедура	Краткое описание	МСВР	МС/МС	Стандарты	ПО и БД	Лит. данные
Определение элементного состава	Элементный состав предполагается путем прямого сравнения наблюдаемого номинального значения и дефекта массы и относительного содержания изотопов с теоретическими. Могут применяться дополнительные ограничения [118].	Да	Да/Нет	Нет	Да	Нет
<i>De novo</i> идентификация	Для иона-предшественника оцениваются данные фрагментации с целью ранжирования кандидатов на основе рассчитанных весов сгенерированных поддеревьев.	Да	Да	Нет	Да	Нет
Тонкий изотопный анализ	Точное измерение массы и соотношения отдельных изотопологов. Непрерывное накопление выбранных ионов применяют, когда интенсивности исследуемых сигналов недостаточны.	Да	Да/Нет	Нет	Да	Нет
Дерепликация по МС/МС данным	Быстрая идентификация соединения из широко изученной группы НП путем изучения картины фрагментации.	Да/Нет	Да	Да, обычно	Да, обычно	Да
Аннотация с помощью баз данных (БД)	Быстрая предварительная идентификация метаболитов с использованием поиска в БД, содержащей ЖХ, УФ, МСВР и МС/МС данные. Следует проводить ручную проверку на предмет нерелевантных результатов.	Да, обычно	Да/Нет	Да/Нет	Да	Да/Нет
Предиктивный скрининг метаболитов	Обнаружение пиков и их аннотация с использованием расширенной <i>in silico</i> БД, которая содержит интересующие соединения с несколькими принятыми модификациями. Часто сочетается с последующей ручной или полуавтоматической оценкой картин фрагментации для подтверждения обнаруженных соединений.	Да, обычно	Да, обычно	Да, обычно	Да	Да
Аннотация с помощью спектральных деревьев	Извлечение спектральных деревьев из полученных МС/МС данных с последующей аннотацией субструктур и сравнением со спектрами из библиотеки. Совпадения и несоответствия используют для начисления баллов или штрафных баллов для ранжирования кандидатов.	Да	Да	Нет	Да	Да, обычно
Целевое определение	Количественная оценка известных БМ с использованием характерных <i>m/z</i> сигналов или МЗР переходов. Чаще всего используют методы внешнего и внутреннего стандарта.	Да/Нет	Да/Нет	Да	Да/Нет	Нет
Количественный анализ многокомпонентной системы	Количественная оценка известных БМ с использованием рассчитанных относительных факторов отклика. Идентификацию соединений в анализируемых образцах можно проводить с использованием относительного времени удерживания.	Да/Нет	Да/Нет	Да	Да/Нет	Да/Нет

Продолжение таблицы 1.8

Создание химических «отпечатков пальцев»	Эта процедура следует за целевым определением БМ. После анализа набора проб проводят кластерный анализ, чтобы разделить его на несколько групп и установить соответствующие уровни для выбранных маркерных соединений.	Да/Нет	Да/Нет	Да	Да	Нет
Многоцелевое профилирование	Используя выбранные условия регистрации соединений, стандартные образцы которых имеются в наличии, количественный анализ исследуемого набора образцов проводят с использованием контрольной (эталонной) группы образцов.	Да/Нет	Да/Нет	Да	Да	Нет
Ненаправленное профилирование	ВЭЖХ-МС анализ набора образцов с последующим выравниванием пиков, коррекцией базовой линии, извлечением пиков и устранением избыточных сигналов для получения признакового пространства пар m/z -RT. Далее с помощью инструментов статистического анализа можно выявить характерные БМ.	Да, обычно	Да, обычно	Нет	Да	Нет
Масс-спектральное профилирование	МС-анализ набора образцов с последующим выравниванием пиков, устранением шума, выделением пиков без проведения их аннотации и последующим статистическим анализом.	Да/Нет	Да/Нет	Нет	Да	Нет
Выявление признаков	Отбор наиболее интенсивных (типичных) характерных признаков для каждой группы исследуемых образцов перед проведением статистического анализа.	Да/Нет	Да/Нет	Нет	Да	Да/Нет
Группировка ВЭЖХ-МС данных	ВЭЖХ-МС анализ набора образцов с последующим уменьшением размерности путем сегментирования и отброса оси времени удерживания.	Да/Нет	Да/Нет	Нет	Да	Нет
Кластеризация сигналов в молекулярные сети	Кластеризация выполняется на основе совпадения пиков в МС ² спектрах, полученных из большого набора данных. Для разрыва нерелевантных связей применяется ряд задаваемых ограничений.	Да	Да	Нет	Да	Нет
Скрининг ДФИ/ДНП	Приоритизация ионов-предшественников, соответствующих соединениям из выбранных групп, путем скрининга выбранных диагностических фрагментных ионов и нейтральных потерей.	Да, обычно	Да	Да, обычно	Да/Нет	Да, обычно
Фильтрация по дефекту массы	Приоритизация ионов с заданным дефектом массы в соответствующем диапазоне масс.	Да	Да/Нет	Да/Нет	Да, обычно	Да

Дерепликация известных соединений с использованием МС/МС данных может быть выполнена вручную путем сравнения паттернов фрагментации с известными из литературы и полученными при анализе эталонных стандартов, или с помощью компьютерных процедур, таких как сравнение спектров на основе спектрального древа [131], включая алгоритмы аннотации метаболитов *in silico*, такие как MAGMa [126]. Точно так же для определения молекулярной формулы неизвестного метаболита проводится оценка кандидатов с использованием МС/МСВР сигналов из деревьев фрагментации [130].

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-ФП) и подходы на основе флуоресцентной спектроскопии используются для идентификации функциональных групп и других субструктур, а также могут использоваться для построения «отпечатков пальцев». Точно так же групповое ВЭЖХ-МС профилирование с использованием процедур скрининга ДФИ и ДНП в режиме ИЗА может привести к идентификации соединений из нескольких выбранных групп НП, занимая свое место между методами идентификации и распознавания образов в предлагаемой схематической классификации (рис. 1.2). И ФДМ и MN служат для группировки молекул определенных классов, чтобы облегчить их последующую дерепликацию, но ФДМ расположен ближе к традиционным процедурам идентификации, основанным на точных измерениях массы, таких как тонкий изотопный анализ. MN можно рассматривать как цифровую версию дерепликации, проводимой вручную с использованием сигналов из МС² спектров, в котором каркасы НП и другие субструктуры выделяются из полного набора МС/МС данных. Кроме того, на карту можно нанести новые инструменты, такие как MS2LDA (LDA — Latent Dirichlet Allocation [256]), который используется для визуализации меньших субструктур, в отличие от MN, что является цифровым аналогом скрининга ДФИ.

Инструменты и техники ВЭЖХ-МС анализа постоянно совершенствуются, и разработанная система классификации, имеющая бесконечное количество бесконечно масштабируемых сегментов, может быть дополнительно детализирована по мере появления новых процедур и концепций. Все описанные процедуры могут быть использованы в качестве строительных блоков для построения различных стратегий дерепликации, контроля качества и ненаправленного метаболического профилирования. Методы спектроскопии

ионной подвижности, основанные на МС и ЯМР измерениях, дают дополнительные возможности для группового анализа и идентификации [257].

1.8 Выбор стратегии проведения фитохимического анализа

Современные аналитические методы, основанные на ВЭЖХ-МС, могут генерировать огромное количество данных, которые часто превышают доступные вычислительные и человеческие ресурсы для их интерпретации. Таким образом, выбор техник проведения ВЭЖХ-МС анализа должен быть оправдан конечными целями исследования. Этапами исследования природного экстракта может быть следующее: 1) ненаправленное профилирование метаболитов; 2) группировка составляющих в молекулярные семейства; 3) дерепликация известных НП; 4) выявление неизвестных соединений; 5) сравнение выборок и кластерный анализ; 6) подбор БМ, соответствующих желаемым свойствам (например, наличие определенной биоактивности). Конечно, информация, полученная в ходе биотестирования, может облегчить эти процедуры, как это было показано в случае применения MN [247]. Когда шаг 5 выполняется сразу после шага 1, для дальнейшего исследования могут быть выбраны только те соединения, которые отвечают за различие образцов между собой. Если не ограничиваться поиском в базе данных, дерепликация, вероятно, будет вторым наиболее сложным и затратным этапом в таких исследованиях после выделения и идентификации неизвестных соединений. Ранее было наглядно показано, что в зависимости от исследуемых природных источников дерепликация не обязательно должна быть единой, четко определенной пошаговой процедурой [14]. Арсенал основанных на ВЭЖХ-МС процедур, которые можно использовать, включает классификацию соединений при проведении дерепликации (MN, ФДМ, скрининг ДФИ/ДНП и т.д.), а также программные методы, облегчающие сравнение и сопоставление спектров. При построении стратегии обнаружения и идентификации НП следует учитывать включение методов и вычислительных подходов для оценки нескольких, по возможности, ортогональных спектральных или физико-химических параметров. Этого можно достичь, объединив несколько процедур (таблица 1.8) в одну стратегию. Среди наиболее часто применяемых комбинаций — ненаправленное профилирование метаболитов с последующей аннотацией пиков с помощью БД [9,145,172,174,176–178,188,192] и разделение обнаруженных соединений на классы

методами группового анализа с последующим анализом паттернов фрагментации и дерепликацией/идентификацией структурно родственных соединений [24–34]. В контроле качества средств традиционной медицины применяется сочетание целевого определения БМ с построением химического «отпечатка пальца» [162–166,258].

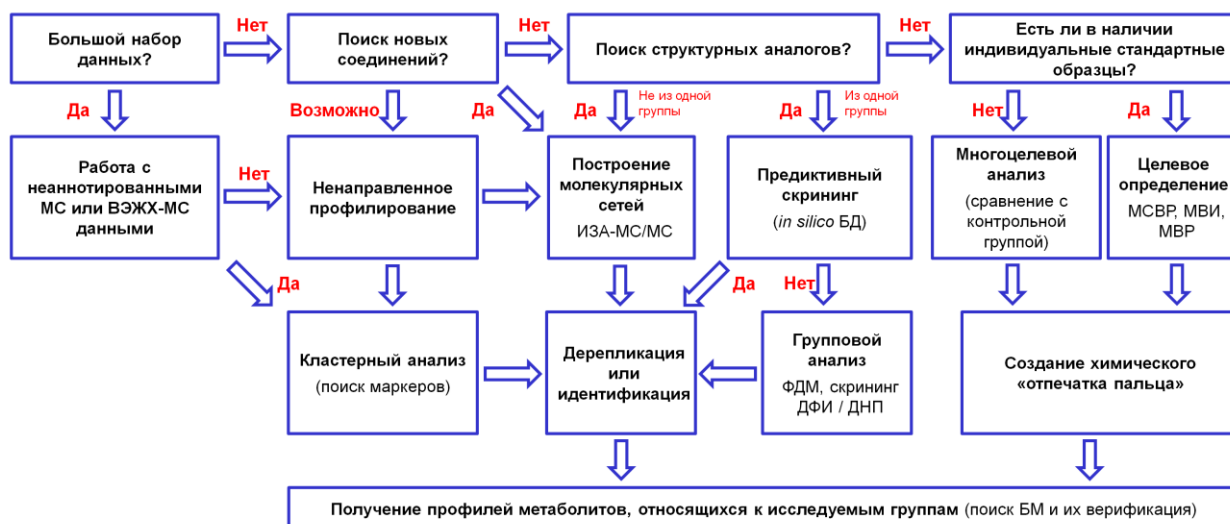


Рисунок 1.3 – Схема создания основанного на ВЭЖХ-МС данных подхода к решению задач исследования НП.

Таким образом, в рамках предложенной классификации при планировании исследования химику-аналитику необходимо ответить на несколько вопросов (рис. 1.3):

- Будут ли исследования касаться больших библиотек экстрактов НП?
- Будет ли он сосредоточен на известных НП или на поиске относительно новых биоактивных соединений?
- Есть ли необходимость найти структурные аналоги интересующих молекул?
- Будет ли разработана методика контроля качества?

Чем больше структурно различных метаболитов необходимо найти в экстрактах, тем более сложные подходы следует применять. Поэтому, в зависимости от целей исследования, возможно как упрощение, так и усложнение указанного алгоритма.

1.9 Выводы к главе 1

Растительное сырье выступает незаменимым источником многих групп биоактивных компонентов, включая лигнаны, флавоноиды, алкалоиды, тритерпеновые и стероидные сапонины и др. Одной из наиболее актуальных задач в

фитохимии и доказательной традиционной медицине является выделение и идентификация натуральных продуктов. Для извлечения компонентов из растительных материалов применяют мацерацию, жидкость-жидкостную экстракцию, кипячение в различных растворителях, а также ультразвуковую, микроволновую и твердофазную экстракцию. Для проведения идентификации используют информацию, получаемую с помощью современных высокоинформативных методов анализа, включая хроматомасс-спектрометрию и спектроскопию ЯМР. В этом процессе исследователи часто опираются на существующие литературные данные и др. источники, однако многообразие компонентов в растительных объектах столь велико, что для получения достоверных результатов необходимо применять систематизированный подход к их извлечению, выделению, разделению и структурному охарактеризовыванию, а также по возможности соотносить описываемые структуры соединений с известными путями их биосинтеза. Другой важной задачей является комплексная оценка качественного и количественного состава растительных экстрактов, поскольку их фармакологические свойства зачастую зависят от синергетического эффекта нескольких неизвестных заранее компонентов. В этом случае, пики отдельных компонентов могут быть рассмотрены как часть общей картины - общего паттерна, сигналов, составляющих характерный «отпечаток пальца» для образцов заданного типа. При этом аннотация некоторых наиболее значимых из выбранных сигналов может быть осуществлена на последней стадии исследования.

При всем многообразии приборного обеспечения и режимов работы современных аналитических инструментов, решение поставленных задач требует применения продуманной, последовательной и наименее затратной (включая вычислительные мощности на обработку полученной информации) стратегии проведения анализа. На сегодняшний день, в качестве базовых парадигм при создании таких стратегий используют целевой (targeted) и нецелевой (untargeted) анализ. В дополнение групповой подход применяют при идентификации и дерепликации соединений, относящихся к одному классу. Другие возможности проведения группового анализа с использованием метода ВЭЖХ-МС недостаточно хорошо исследованы.

На основании проведенного литературного обзора, удалось выявить отдельные аналитические процедуры, применяемые на стадии сбора и обработки ВЭЖХ-МС данных, которые являются «строительными блоками» при создании вышеупомянутых комплексных стратегий анализа растительного сырья и продуктов на его основе. Также была предложена блок-схема выбора таких процедур для оптимального решения задач исследования.

Основными ограничениями внедрения современных ВЭЖХ-МС методов в области контроля качества и исследования натуральных продуктов является большая стоимость по сравнению с фармакопейными методами (ТСХ, ВЭЖХ-УФ и др.), а также большая стоимость и отсутствие в коммерческой продаже индивидуальных стандартных образцов и их изотопно-меченных аналогов. В этой связи, актуальной является разработка новых подходов к анализу растительных объектов с использованием простых квадрупольных масс-анализаторов и минимального числа стандартных образцов.

ГЛАВА 2. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующее аналитическое оборудование:

- 1) ВЭЖХ-МС систему, состоящую из гибридного tandemного квадрупольного масс-спектрометрического детектора AB Sciex QTrap 3200 (Канада) с линейной ионной ловушкой, оснащенного источником ионизации электрораспылением; и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst 1.5.1 (Канада).
- 2) ВЭЖХ-МСВР систему, состоящую из масс-спектрометрического детектора с орбитальной ионной ловушкой Orbitrap Exactive (Германия), оснащенного источником ионизации электрораспылением; и жидкостного хроматографа Thermo Scientific Acella HPLC system (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Xcalibur™ Software (версия 2.2) предоставленную компанией Thermo Scientific™.
- 3) ВЭЖХ-МС систему, состоящую из хроматографа «Dionex» (США), с насосом UltiMate 3000RS, встроенным дегазатором, оборудованный системой автоматического ввода пробы UltiMate WPS – 3000TFC с микроколлектором фракций, диодно-матричным детектором Ultimate 3000RS и масс – спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь TSQ Vantage фирмы «Thermo Scientific», оснащенного источником ИЭР. Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программного пакета XCalibur версия 2.2;
- 4) ВЭЖХ-МС систему, состоящую из хроматографа «Agilent 1200 SL» фирмы «Agilent» с высокоэффективным градиентным жидкостным насосом, встроенным дегазатором, оборудованный системой автоматического ввода пробы с масс – спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь 6460 Triple Quad LC/ MS фирмы «Agilent», оснащенного источником ИЭР. Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программного пакета Mass Hunter B.07.01;

- 5) ВЭЖХ-МС систему, состоящую из хроматографа «1290 Infinity II» фирмы «Agilent» с ультравысоко-эффективным градиентным жидкостным насосом, встроенным дегазатором, оборудованный системой автоматического ввода пробы с масс – спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь 6470 Triple Quad LC/ MS фирмы «Agilent», оснащенного электрораспылительным фокусирующим источником «Jet Stream». Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программного пакета Mass Hunter B.07.01;
- 6) ВЭЖХ-МС систему, состоящую из хроматографа «Shimadzu» (Япония), оснащенный насосом подвижной фазы, встроенным дегазатором, системой автоматического ввода пробы и моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS – 2020, снабженного ИЭР, фирмы «Shimadzu». Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программного пакета LabSolution версия 5.60 SP2;
- 7) ЯМР спектрометр Bruker Avance – III – 500 (Карлсруэ, Германия) в лаборатории ЯМР ИНЭОС РАН;

Разделение проводили на следующих хроматографических колонках:

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

В работе использовали следующее оборудование для пробоподготовки:

- 1) Взвешивание навесок проводили на весах Explorer Pro (Ohaus Corporation, США).
- 2) Для экстракции растительного сырья применяли ультразвуковые ванны «Branson 2210 E-DTC» (Branson, США) и «САПФИР 1,3» (ЗАО НПО "Техноком"), и водяную баню «IKA HB 10» (IKA WORKS, Германия).

- 3) Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия).
- 4) Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более $\pm 5\%$ (LABMATE, Польша) и наконечники необходимых объемов.
- 5) Для проведения твердофазной экстракции использовали вакуумный блок CHROMABOND (Macherey-Nagel, Германия), а также картриджи Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) (30 мг, 1 мл) приобретенные в фирме Waters (Милфорд, США) и Discovery DSC-18 (500 мг, 6 мл) в Sigma Aldrich, (Дармштадт, Германия).

В работе использовали следующие растворы и реагенты:

Диосцин, протодиосцин, диосгенин, экдистерон, салидрозид, розавин, розарин, элеутерозид В, элеутерозид Е, кверцетин, гиперозид, кемпферол, кверцетин-3-глюкоронид, кверцетин-рутинозид-7-глюкозид, кверцетин-7-рамнозид, кверцетин-7-рамнозид-глюкозид, лютеолин, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин-7-о-глюкуронид, гинкголовая кислота C13:0, гинкголовая кислота C15:1, гинкголевая кислота C17:1, витексин, вогонин, скутелларин, байкалин, байкалеин, глицирризинин, магниферин, силибин, гинсенозиды R₁, Rg₁, RT₅, Rh₁, Rc, Rb₃, Rd, Rg₃, Rh₂, Rh₃, Re, F₁₁, Rf, Rg₂, Rb₁, Rb₂, С-К, схизандрол А, схизандрол В, аскорбиновая кислота, хлорогеновая кислота, рутин, кофеин, β -цитостирол, дельфинидин-3-о-глюкозид, кумарин, изорамнетин, изорамнетин-3-рутинозид, апигенин, диосметин, хризоеприол, акацетин, гиперидин, апигенин-7-гликозид, хризин, катехин, эпикатехин были приобретены у PhytoLab GmbH (Германия). Гинсенозиды Ro, F1, F2, Rk₃, F₄, Rh₄, Rg₆, Rg₅ и Rk₁ были приобретены в Chromadex (США). Эритритол, ксилитол, рибитол, арабитол, пинитол, сорбитол, маннитол, мальтитол, дульцитол приобретены в Supelco (США); ксилоза, арабиноза, инозитол, рамноза, фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, трегалоза и раффиноза были куплены в Sigma-Aldrich (Германия); секвоитол получены из Carbosynth (Англия).

Деионизованная вода (после очистки системой Milli-Q (Millipore, США); метанол для ВЭЖХ (Burdick & Jackson, Германия); ацетонитрил, изопропанол и н-бутиловый спирт для ВЭЖХ (Panreac, Испания), этанол чистотой >99.8%, ацетат

аммония >98% и формиат аммония >97%, диметилсульфоксид (DMSO) ≥99.9%, хлористый метилен ≥99.9%, диэтиловый эфир ≥99.9%, муравьиная кислота ≥99.9 %, метилат натрия (MeONa) 95 % и гидроксид калия (KOH) 99.99% из Sigma-Aldrich (Дармштадт, Германия).

В работе использовали следующие образцы:

Образцы трав от российских и китайских производителей (таблица 2.1) были приобретены в аптечных сетях Москвы и Шанхая.

Таблица 2.1 – Образцы растительных материалов и части использованные для анализа

Вид растения	Части	Производитель
<i>Leuzea carthamoides</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Rhodiola rosea</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Ginkgo biloba</i>	Листья	«Русские корни»
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Корни	«КрасногорскЛекСредства»
<i>Hedysarum coronarium</i>	Корни	«Беловодье»
<i>Silybum marianum</i>	Семена	«Беловодье»
<i>Panax ginseng</i>	Корни	Leiyunshang (США)
<i>Panax quinquefolius</i>	Корни	Leiyunshang (США)
<i>Schisandra chinensis</i>	Плоды	«Русские корни»
<i>Tribulus terrestris</i>	Плоды	«Беловодье»
<i>Crataegus laevigata</i>	Плоды	«КрасногорскЛекСредства»
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Serratula tinctoria</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Eurycoma longifolia</i>	Корни	«Русские корни»
<i>Paullinia cupana</i>	Плоды	«Русские корни»
<i>Tanacetum vulgare</i>	Цветы	«КрасногорскЛекСредства»
<i>Eryngium campestre</i>	Стебли	«Хорст»
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Цветы	«Русские корни»
<i>Matricaria chamomilla</i>	Цветы	«КрасногорскЛекСредства»
<i>Bupleurum falcatum</i>	Стебли	«Русские корни»
<i>Trifolium pratense</i>	Листья	«Беловодье»
<i>Cichorium intybus</i>	Корни	«Беловодье»
<i>Ocimum basilicum</i>	Листья	«Котани»

Продолжение таблицы 2.1

<i>Origanum vulgare</i>	Листья	«Русские корни»
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Листья	«Русские корни»
<i>Hypericum perforatum</i>	Цветы	«КрасногорскЛекСредства»
<i>Geranium pratense</i>	Листья	«Русские корни»
<i>Humulus lupulus</i>	Плоды	«Беловодье»

Контрольные образцы корней *Panax ginseng*, а также листьев *Glycyrrhiza glabra* и *Abrus precatorius* были взяты из коллекции «Гербария Московского университета» (ваучеры образцов - MW0107398, MW0548195, MW0740989 соответственно). Коммерческие образцы сухого корня *P. ginseng* и *G. glabra* были приобретены в ООО «Азбука Трав» (Барнаул, Россия). Коммерческие листья *A. precatorius* были получены от Herbalveda (Норхолт, Англия). Три коммерческих образца чая улун были приобретены в ООО «Леаланис», ООО «Никтеа» и ООО «101 Чай» (Москва, Россия), четвертый – в Huanglongtai tea co., Ltd. (Шанхай, Китай). Корейский красный женьшень и Корейский женьшеневый чай приобретены в Korean Ginseng MFG., Ltd. (Пхёнтхэк, Южная Корея) и Korea Ginseng Industrial co., Ltd. (Соннам, Южная Корея), соответственно. Препарат-биодобавка «Гербион® Женьшень» (с содержанием суммы гинсенозидов — 21 мг в 350 мг сухого экстракта) приобретен у производителя ООО «КРКА ФАРМА» (Словения).

2.2 Техника проведения экспериментов

2.2.1 Схема эксперимента по целевому определению биомаркеров в экстрактах из лекарственных растений

Экстракция и пробоподготовка. Стоковые растворы аналитов готовились из навески 2 мг каждого стандарта и 1 мл метанола. Градуировочные растворы готовили последовательным разбавлением приготовленных стоковых растворов в день проведения анализа. Стоковые растворы хранили при температуре 4 °С или ниже в защищенном от света месте в течение всего исследования.

Навеску сухого образца растительного материала (0.1 г) и 10 мл водно-спиртовой смеси переносили в колбу на 15 мл и помещали в ультразвуковую баню на 30 мин. Экстракцию повторяли дважды, а затем экстракты объединяли. После этого 1 мл экстракта отбирали и затем центрифугировали 10 мин при 16 000 об/мин, затем надосадочную жидкость фильтровали с помощью фильтрующего элемента

размером 0.45 мкм CHROMAFIL Xtra (Macherey-Nagel, Германия). Отфильтрованные растворы разбавляли подвижной фазой перед проведением ВЭЖХ-МС анализа.

Хроматографические условия. Анализ образцов проводили на системе, состоящей из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 колонки Acclaim RSLC 120 C18 и масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200 при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл/мин. Температура термостата колонки 25 °С. Объем вводимой пробы составлял 0.020 мл. Использовали систему из двух растворителей: (А) 0.5% водный раствор HCOOH; и (В) MeCN. Условия градиентного элюирования: 0–2 мин, 10% В; 2–12 мин от 10 до 90% В; 12–15 мин 90% В; 15–16 мин от 90 до 10% В; 16–20 мин 10% В. Для разделения флавоноидов и сапонинов использовали длинную программу градиента: 0–2 мин, 20% В; 2–36 мин, от 20 до 39% В; 36–40 мин, от 39 до 70% В; 40–45 мин, от 70 до 97% В; 45–50 мин, 97% В; 50–55 мин, 20% В.

Условия МС детектирования. Масс-спектрометрическое детектирование проводили с использованием ионизации электрораспылением, в режиме регистрации положительно и отрицательных ионов при следующих параметрах: напряжение на распыляющем капилляре, +5500 В / –4500 В; температура в источнике ионизации, 350 °С; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 1.0×10^5 Па.

Условия проведения МС анализа методом прямого ввода. Анализ стандартных растворов (с концентрацией 1-10 мкг/мл в 1 мл смеси ацетонитрил : вода, 1 : 1), приготовленных из стоковых растворов, проводили с помощью шприцевого насоса с постоянной скоростью потока 30 мкл/мин. Условия МС детектирования отличались от описанных в предыдущем пункте только температурой – 100 °С.

Обработка данных. После проведения ВЭЖХ-МС анализа градуировочных образцов линейные диапазоны и коэффициенты детерминации были установлены для каждого определяемого соединения. Инструментальные пределы обнаружения ($C_{\min}$) и определения ($C_{\lim}$) были определены как концентрации аналита, для которых значения полученных отношений сигнал / шум (S/N) были равны 3 и 10,

соответственно. Инструментальная повторяемость (s_r , %) была оценена путем проведения 3-х параллельных измерений для хроматографируемых растворов на среднем уровне линейного диапазона концентраций.

2.2.2 Схема экспериментов по извлечению стероидных сапонинов из растительных материалов и суспензий клеточных культур

Пробоподготовка. В работе использовали суспензию клеточной культуры *D. deltoidea* (№ IFR-DM-0.5-03), находящуюся на хранении во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ИФР РАН). Условия выращивания данной клеточной культуры в биореакторах описаны в работах [259,260]. Растения *D. deltoidea* были выращены в теплицах на кафедре физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (внутренний ваучер № MW0753847). Растительный материал надземной части растения *T. terrestris* (№ MW0112358) был разделен на три части, включая стебли, листья и плоды. В случае *D. deltoidea* использовали корневище.

Пробы растительного материала заморозили в жидком азоте и измельчили до однородного порошка. Измельченный растительный материал и высушенные образцы суспензий клеточных культур использовали в дальнейших экспериментах по выбору условий извлечения стероидных сапонинов.

Ультразвуковую экстракцию (УЗЭ) проводили в ультразвуковой ванне (SAPHIRE, Sapphire Ltd., Россия) с постоянной мощностью 280 Вт при частоте 35 кГц. Аппарат был оснащен цифровой системой управления длительностью воздействия ультразвука и температурой. Навески растительного материала (0.2, 0.1, 0.05, 0.025 г) помещали в закрытую пластиковую пробирку (15 мл) и смешивали с 10 мл растворителя. УЗЭ проводили в ультразвуковой ванне, наполненной 4 л воды, длительность экстракции была различной. При проведении экстракции пробирки с анализируемым веществом помещали в центр ультразвукового устройства на глубину 6 см.

Экстракцию кипящим растворителем (ЭКР) при нормально и пониженном давлении (ЭКРПД) проводил в стеклянной круглодонной колбе и кипятили (92°C) с обратным холодильником на водяной бане. Навеску измельченной травы (1.0, 0.5, 0.25, 0.125 г) смешивали с 50 мл растворителя. Время экстракции варьировали. После завершения экстракции смесь охлаждали до комнатной температуры.

Аналогично, в случае с ЭКРПД, примерно 0.20-0.25 г измельченного растительного материала смешивали с 50 мл 50% раствора изопропанола в стеклянной круглодонной колбе и кипятили с обратным холодильником, подключенным к вакуумному насосу V-700 с вакуумным контроллером V-850 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария) на водяной бане, варьируя давление и длительность экстракции.

Экстракцию в аппарате Сокслета (ЭС) проводили в экстракторе Сокслета объемом 250 мл с обратным холодильником. Навеску пробы (0.75 г) помещали в фильтровальную бумагу Whatman №1. Экстрактор заполняли 150 мл растворителя (91% изопропанола в воде) и кипятили с обратным холодильником на водяной бане, длительность экстракции варьировали. Экстракцию проводили при температуре водяной бани 82°C в течение 4, 8, 12, 18 и 24 часов. После завершения экстракции смесь охлаждали до комнатной температуры.

По завершении экстракции смеси охлаждали до комнатной температуры. Полученные растворы отфильтровывали через 0.45 мкм шприц-фильтр. Очищенные экстракты хранили при 4 °C до проведения анализа. Экстрагирование выполняли в трех повторностях.

Хроматографические условия. Использовали хроматографическую систему Dionex (США) Ultimate 3000 с МС детектором AB Sciex Qtrap 3200 (Канада). Разделение проводили на C18 колонке (2.2 μ м, 2.1 $\times$ 150 мм, RSLC 120 Acclaim) (Thermo Scientific, США). Подвижная фаза состояла из 5 мМ раствора $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования, использованная для разделения экстрактов из растительного материала *T. terrestris*: 0–10 мин, от 24 до 93% В; 10–16 мин 93% В; 16–22.5 мин 24% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35°C. Программа градиентного элюирования, использованная для разделения экстрактов из растительного материала *D. deltoidea*: 0–2 мин, 8% В; 2–4 мин, от 8 до 24% В; 4–17 мин, от 24 до 39% В; 17–19 мин, от 39 до 57% В; 19–27 мин, от 57 до 75% В; 27–28 мин, от 75 до 83% В; 28–36 мин 83% В; 36–41 мин 83% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35°C.

Условия МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +5500 В; температура в источнике ионизации, 350 °C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 1.0×10^5 Па; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10

В; энергия соударений, 5 В. Запись хроматограмм осуществляли в режиме СИМ: m/z 1031.0, 869.0, 415.3 и 397.3, соответствующих $[M+H]^+$ ионам определяемых соединений.

2.2.3 Схема эксперимента по извлечению сахаров и сахароспиртов из хвойных растений

Экстракция и пробоподготовка. Для приготовления стандартной смеси точные навески (50 мг) индивидуальных стандартов сахаров и сахароспиртов помещали в колбу объемом 50.00 мл и доводили до метки 10% раствором ацетонитрила в воде. Исходный раствор разбавляли в 10 раз тем же растворителем для получения стандартного раствора с концентрацией 0.1 мг/мл. Этот раствор использовался для приготовления градуировочных растворов в 95% ацетонитриле. Все растворы хранили при температуре 4°C до проведения анализа.

В работе использовали хвойные иголки растений 5 видов, относящихся к 5 различным родам: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* (*Pinaceae*) и *Juniperus* (*Cupressaceae*). Каждый вид был представлен двумя гербарными образцами (таблица. 2.2), собранными в течение летнего сезона в период с 2005 по 2016 год. Каждый образец разделяли на 3 части, первая использовалась в нативном виде (тип 1), вторая была измельчена до 2-4 мм фрагментов (тип 2), третья – до гомогенного порошка после заморозки в жидком азоте (тип 3).

Таблица 2.2 – Описание использованных в работе образцов хвои

№	Вид	№ Ваучера	Локация	Координаты сбора	Дата сбора	Ссылка
1	<i>Abies sibirica</i>	MW0211309	РФ, Костромская область	58.56946°N, 42.61935°E	05.08.2009	[261]
2	<i>Abies sibirica</i>	MW0211325	РФ, Нижегородская область	~57°N, ~47°E	08.08.2005	[262]
3	<i>Juniperus communis</i>	MW0211418	РФ, Новгородская область	57.0541°N, 30.4343°E	02.05.2009	[263]
4	<i>Juniperus communis</i>	MW0211435	РБ, Минская область	~54°N, ~26°E	01.07.2006	[264]
5	<i>Larix gmelinii</i>	MW0155987	РФ, Красноярский край	71.9440°N, 103.9981°E	01.07.2013	[265]
6	<i>Larix gmelinii</i>	MW0001043	РФ, Забайкальский край	50.8124°N, 117.78°E	23.07.2011	[266]
7	<i>Picea abies</i>	MW0211154	РФ, Владимирская область	55.5930°N, 40.2620°E	02.05.2007	[267]

Продолжение таблицы 2.2

№	Вид	№ Ваучера	Локация	Координаты сбора	Дата сбора	Ссылка
8	<i>Picea abies</i>	MW0211217	РФ, Саратовская область	~52°N, ~46°E	18.06.2008	[268]
9	<i>Pinus sibirica</i>	MW0001209	РФ, Республика Бурятия	50.7850°N, 107.3500°E	01.01.2012	[269]
10	<i>Pinus sibirica</i>	MW0159653	РФ, Республика Бурятия	51.32714°N, 105.50403°E	25.08.2016	[270]

УЗЭ проводили по процедуре, аналогичной описанной в п. 2.2.2. Навески растительного материала (0.020 г) помещали в пластиковую пробирку (2 мл) с крышкой перед добавлением необходимого количества растворителя. При проведении последовательной экстракции после центрифугирования всю надосадочную жидкость извлекали из пробирок с помощью шприца, затем прибавляли новую порцию растворителя. Для оценки потерь при экстракции методом «введено-найдено» перед экстракцией к образцам добавляли стандартную смесь сахаров и сахароспиртов (500 нг/мл). Все эксперименты выполняли в трех повторностях.

Хроматографические условия. Использовали хроматографическую систему Dionex (США) Ultimate 3000 с МС детектором AB Sciex Qtrap 3200 (Канада). Разделение проводили на колонке Asahipak NH2P-40 2D; (4.0 μ м, 2.0 $\times$ 150 мм) (Shodex, Япония). Подвижная фаза состояла из деионизированной воды (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования, использованная для разделения экстрактов из растительного материала *T. terrestris*: 0–8 мин, 94% В (скорость потока 0.5 мл/мин); 8–17 мин от 94 до 68% В (0.5 мл/мин); 17–20 мин от 68 % (0.5 мл/мин) до 60% В (0.3 мл/мин); 20–24 мин 60% В (0.3 мл/мин); 24–30 мин 94% В (0.5 мл/мин). Температура термостата колонки – 40°C.

Условия МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре - 4500 В; температура в источнике ионизации, 350 °С; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 1.0×10^5 Па; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10 В; энергия соударений, 5 В. Запись хроматограмм осуществляли в режиме МЗР (время регистрации каждого ионного перехода – 20 мс).

2.2.4 Схема эксперимента по извлечению сапонинов и очистке экстрактов из женьшеневого улуна

Экстракция и пробоподготовка. К навеске образца улуна (Леаланис, Россия) массой 2 г последовательно добавляли 5 мл метанола и 5 мл деионизованной воды, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 минут, а затем выдерживали в ультразвуковой ванне в течении 30 минут, после чего центрифугировали (10 минут, 4000 об/мин). Полученный супернатант досуха упаривали в токе азота. К сухому остатку прибавляли 10 мл деионизованной воды и 10 мл диэтилового эфира, смесь перемешивали на орбитальном шейкере (10 мин) и центрифугировали (10 минут, 4000 об/мин). Верхний слой диэтилового эфира отбрасывали, к нижнему прибавляли 10 мл насыщенного водой н-бутилового спирта, смесь перемешивали на орбитальном шейкере (10 мин) и центрифугировали (10 минут, 4000 об/мин). Затем отделяли слой н-бутилового спирта, содержащий целевые соединения, упаривали досуха в токе азота, остаток перерастворяли в деионизованной воде.

Для дополнительной очистки экстракт женьшеневого улуна после стадии жидкость-жидкостной экстракции помещали на картридж для сорбционного концентрирования Discovery DSC-18 500-mg (Sigma Aldrich, Германия), который предварительно кондиционировали ацетонитрилом и деионизованной водой. Сорбент последовательно промывали деионизованной водой, 20 и 40%-ными растворами ацетонитрила в воде, целевые вещества элюировали раствором 60%-ного ацетонитрила в воде, затем проводили анализ методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

Проведение кислотного гидролиза. К 0.5 мл очищенного при помощи жидкость-жидкостной экстракции женьшеневого улуна прибавляли 1 мл раствора 1 М соляной кислоты в смеси метанол:деионизованная вода (50:50) и выдерживали при температуре 80°C в течение 3 часов. После чего образец упаривали досуха в токе азота, прибавляли по 1 мл деионизованной воды и трихлорметана, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 минут, центрифугировали (10 минут, 4000 об/мин), органический слой отбирали, упаривали досуха и перерастворяли в 5%-ном растворе метанола в деионизованной воде [271].

Для альтернативного варианта проведения гидролиза в кислой среде к 0.5 мл очищенного экстракта женьшеневого улуна прибавляли 1 мл раствора 2 М

трифторуксусной кислоты в деионизованной воде, выдерживали при 120°C в течение 3 часов. Далее извлечение целевых веществ проводили при помощи экстракции трихлорметаном, аналогично описанному выше [272].

Проведение щелочного гидролиза. К 0.5 мл очищенного экстракта женьшеневого улуна добавляли навеску 52 мг гидроксида натрия, выдерживали при 80°C в течение 6 часов. Далее извлечение целевых веществ проводили при помощи экстракции трихлорметаном, аналогично описанному выше [273,274].

Для альтернативного варианта проведения гидролиза в щелочной среде к аликвоте 0.5 мл водно-метанольного экстракта женьшеневого улуна прибавляли 150 мг гидроксида натрия, выдерживали при 90°C в течение суток. Полученный образец упаривали досуха и по описанной ранее схеме осуществляли последовательную жидкость-жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром и н-бутанолом, после чего органический слой трижды промывали эквивалентным объемом воды [275,276].

Микропрепаративное выделение неизвестного гликозида. Для микропрепаративного выделения фракции женьшеневого сапонина использовали колонку SUPELCOSIL LC18. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования, с использованием (А) деионизованной воды и (Б) ацетонитрила в качестве подвижной фазы). Программа градиентного элюирования: 0–5 мин, 40% В; 5–25 мин, от 40 до 80 % В; 25–27 мин, 100% В; 27–33 мин, 40% В. Температура термостата колонки поддерживалась равной 35 °С, объем вводимой пробы составлял 50 мкл. Детектирование проводили с использованием ДМД на длине волны 203 нм. Фракцию исследуемого образца отбирали в заданный интервал времени при помощи системы автоматического коллектора фракций. Полученный раствор лиофилизировали.

Леофильная сушка фракции гликозида. Программа леофильной сушки: заморозка образцов при -70 °С (3 часа); увеличение температуры до -55 °С со скоростью 0,05 °С/сек (выдерживание 7 часов); нагревание до -45 °С со скоростью 0,07 °С/сек (выдерживание 18 часов); нагревание до -15 °С со скоростью 0,1 °С/сек (выдерживали 6 часов); нагревание до +15 °С со скоростью 0,15 °С/сек (выдерживали 5 часов); нагревание до +35 °С со скоростью 0,3 °С/сек (выдерживали 5 часов). Сухой остаток перерастворяли в 0.5 мл ДМСО-d₆ для проведения анализа

методом ЯМР спектроскопии. Регистрацию спектров ПМР проводили на частоте 600.22 МГц и 500.13 МГц, спектров ЯМР на ядрах ^{13}C – на частоте 125.76 МГц.

Хроматографические условия. Использовали хроматографическую систему Dionex (США) Ultimate 3000 с МС детектором AB Sciex Qtrap 3200 (Канада). Разделение проводили на C18 колонке (2.2 μm , 2.1 $\times$ 150 мм, RSLC 120 Acclaim) (Thermo Scientific, США). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–11.5 мин, от 20 до 23.5% В; 11.5–13.5 мин, от 23.5 до 35.5% В; 13.5–24 мин, от 35.5 до 42% В; 24–26 мин, от 42 до 57% В; 26–37 мин, 57% В; 37–38 мин, от 57 до 74% В; 38–39 мин, от 74 до 93% В; 39–43, 93% В; 43–44 мин, от 93 до 20% В; 44–50 мин, 20% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35°C. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Диапазон сканирования ДМД детектора – 190-800 нм.

Условия МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +5500 В; температура в источнике ионизации, 450°C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 8.3×10^4 Па; потенциал декластеризации, 20 В; входной потенциал, 10 В; энергия соударений, 10 В. Запись хроматограмм осуществляли в режиме сканирование с использованием ЛИЛ в диапазоне m/z 70-1300.

Условия проведения ВЭЖХ-МСВР анализа. Использовали хроматографическую систему ВЭЖХ-МСВР систему, состоящую из хроматографа Thermo Scientific Acella HPLC system (США) и масс-анализатора Orbitrap Exactive (Германия). Разделение проводили на C18 колонке (3 μm , 2.1 $\times$ 150 мм, Hypersil Gold aQ) с предколонкой Hypersil Gold aQ 10.2 $\times$ 2.1 мм (Thermo Scientific, USA). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и 0.1% раствора HCOOH в ацетонитриле (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–2 мин, 5% В; 2–15 мин, от 5 до 95% В; 15–18 мин, 95% В; 18–19 мин, от 95 до 5% В; 19–23 мин, 5% В. Скорость потока – 0.5 мл/мин при 30°C. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Параметры МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +3500 В; температура в источнике ионизации, 270°C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 5 у.е.; давление осушающего газа, 40 у.е.; газ-завесы, 10 у.е.; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10 В; энергия соударений, 5 В. Запись хроматограмм

осуществляли в режиме сканирования: m/z 90 – 1350 (с разрешением 35000 при m/z 400). MS^2 спектры получали с применением энергии соударений на уровне 35% от максимума.

2.2.5 Схема эксперимента по получению характеристичных хроматограмм и групповой идентификации компонентов в растительных экстрактах

Экстракция и пробоподготовка. Для построения характеристичных хроматограмм были проанализированы 34 образца экстрактов растений, в том числе 12 индивидуальных экстрактов (листья *A. precatorius*, корни *G. glabra* и *P. ginseng*); 12 двойных смесей и 4 тройных смеси этих же образцов, а также 6 образцов ароматизированного чая (улуна). Навески измельченных в ступке растительных материалов (0.050 г) переносили в пробирки объемом 10 мл и добавляли 5 мл 70% водноспиртового раствора. Перед анализом экстракты разбавляли в 10-20 раз подвижной фазой.

1) Построение характеристичных хроматограмм в режиме сканирования

Хроматографические условия: C18 колонке (2.2 μ м, 2.1 $\times$ 150 мм, RSLC 120 Acclaim) (Thermo Scientific, США). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–2 мин, 25% В; 2–21 мин, от 25 до 95% В; 21–26 мин, 95% В; 26–31 мин, 25% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35°C, объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

Условия MS детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +5500 В; температура в источнике ионизации, 350°C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 8.3×10^4 Па; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10 В. Регистрация в режиме сканирования в линейной ионной ловушке в диапазоне 100–1300 m/z .

Обработка данных. Каждый образец был представлен в виде трехмерных данных: первое измерение - время удерживания, второе измерение - отношение массы к заряду, m/z , третье - интенсивность сигнала. Одну точку данных (полный масс-спектр) регистрировали каждые 0.03-0.04 минуты (в зависимости от округления). Для приведения матриц образцов к единой форме потребовались некоторые преобразования исходного трехмерного набора данных. Так,

интенсивности всех сигналов с массовыми дефектами в диапазоне от -0.35 до +0.65 [277] были просуммированы и присвоены соответствующей ячейке с целочисленным значением m/z . После этого шаг временной оси был изменен с 0.03-0.04 на фиксированное значение в 0.03 мин, путем линейной интерполяции, или 0.05 мин, путем суммирования сигналов, попавших в один диапазон. Окончательная шкала времени была обрезана до значений от 2 до 20 минут, чтобы убрать ту часть данных, которая считается нетрилинейной, в том числе неударживаемые соединения, слишком зашумленные сигналы примесей и соединений, элюируемых при высоком процентном содержании ацетонитрила, а также неинформативный участок кондиционирования хроматографической системы на начальные условия в конце анализа. Далее были выбраны параметры для алгоритмов сглаживания шума и построения базовой линии по каждому значению m/z . Для сглаживания масс-хроматограмм опционально использовали фильтр Савицкого-Голея. Уровень базовой линии для каждой временной точки определялся с использованием алгоритма итеративной полиномиальной регрессии со степенью полинома 4. В том случае, если аппроксимированная базовая линия опускалась ниже нулевой отметки, то она заменялась на среднее значение базовой линии для данной масс-хроматограммы. Для построения конечных массивов использовали все точки каждой масс-хроматограммы, которые были более чем в 3 раза выше, чем рассчитанная базовая линия на том же временном интервале. Остальные точки данных были заменены нулевыми значениями. Шкалы интенсивностей по каждому m/z сигналу были нормированы от 0 до 1 (0 – 100%). Разложение по методу ПФА проводили с условием неотрицательности по моде времен и моде m/z . Все этапы работы с данными были реализованы с помощью Python 3 с использованием программных пакетов с открытым кодом: `pymzML`; `scipy.signal`; `peakutils`; `tensorly`.

2) Построение характеристичных хроматограмм в режиме СИМ

Хроматографические условия: C18 колонке (2.2 μm , 2.1 $\times$ 150 мм, RSLC 120 Acclaim) (Thermo Scientific, США). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–2 мин, 10% В; 2–35 мин, от 10 до 57% В; 35–41 мин, от 57 до 95% В; 41–44 мин, 95% В; 44–49 мин, 10% В. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35°C, объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

Условия МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +5500 В; температура в источнике ионизации, 350°C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 2.1×10^5 Па; давление осушающего газа, 2.8×10^5 Па; газ-завесы, 8.3×10^4 Па; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10 В. Регистрация в режиме СИМ по выбранным характеристичным диагностическим ионам использовали сигналы с m/z 441, 423, 405, 443, 425, 407, 457, 439, 421, 393 – для гинсенозидов женьшеня; m/z 485, 467, 449, 431, 439, 421, 403 – для абрусозидов абруса; m/z 503, 485, 467, 471, 453, 435, 425, 487, 469, 451, 473, 455, 437 – для гликозидов солодки.

Обработка данных. Все масс-хроматограммы были сглажены с помощью встроенного в программное обеспечение фильтра Гаусса с шириной окна 400% от минимального расстояния между точками. После удаления шумовых сигналов (< 2000 cps) и замены их нулевыми значениями относительные площади отдельных пиков (в некоторых случаях, суммы площадей 2-3-х пиков) с шагом 0.4 мин (от 2 до 38.4 мин) записывались в таблицу, каждый столбец которой представлял образец, а каждая строка – соответствующий временной сегмент на масс-хроматограммах по заданному списку сигналов от m/z 393 до m/z 503.

2.2.6 Схема эксперимента по разработке ВЭЖХ-МС-КАМС подхода к групповому определению гинсенозидов женьшеня

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Стандартные растворы гинсенозидов R₁, Rg₁, RT₅, Rh₁, Rc, Ro, Rb₃, Rd, Rg₃, Rh₂, Rh₃, Re, F₁₁, Rf, Rg₂, Rb₁, Rb₂, F₁, F₂, C-K, Rk₃, F₄, Rh₄, Rg₆, Rg₅ и Rk₁ концентрацией 1000 мкг/мл готовили растворением точных навесок 1 мг в 1 мл метанола, после чего, готовили стандартную смесь с концентрацией 50 мкг/мл в колбе на 10 мл, добавляя смесь ацетонитрил : вода (1 : 1) и последовательным разбавлением готовили градуировочные растворы в день проведения анализа

Выбор хроматографических условий разделения осуществляли, используя хроматографическую систему Dionex (США) Ultimate 3000 с МС детектором AB Sciex Qtrap 3200 (Канада). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза Б). Скорость потока – 0.4 (0.5) мл/мин при 35°C, объем вводимой пробы – 20 мкл. МС детектирование с использованием ЭРИ осуществляли в режиме СИМ m/z 405.3; 407.3; 421.3; 423.3;

425.3; 439.3. Начальные параметры работы источника ЭРИ: температура источника ионизации, 350 °С; ПД = 60 В; ВП = 10 В; напряжение на распыляющем капилляре, + 5500 В; давление газа-распылителя, 2.07 Бар, газа-осушителя и газа-завесы 2.76 Бар и 0.83 Бар, соответственно. На каждой хроматографической колонке программу градиентного элюирования подбирали индивидуально, добиваясь наилучшего разделения критических пар гинсенозидов. Для разделения на колонке с пентафторфенильными группами использовали следующую программу градиентного элюирования: 0–11.5 мин, от 20 до 23.5% Б; 11.5–13.5 мин, от 23.5 до 35.5% Б; 13.5–24 мин, от 35.5 до 42% Б; 24–26 мин, от 42 до 57% Б; 26–37 мин, 57% Б; 37–38 мин, от 57 до 74% Б; 38–39 мин, от 74 до 93% Б; 39–43, 93% Б; 43–44 мин, от 93 до 20% Б; 44–50 мин, 20% Б.

Определение линейной градуировочной зависимости и метрологических характеристик. Диапазон линейности определяли как участок на графике зависимости аналитического сигнала (площади хроматографического пика) от концентрации гинсенозида, который аппроксимируется линейной функцией с коэффициентом корреляции $R > 0,99$. Пределом обнаружения считали концентрации гинсенозидов, при которых достигалось отношение сигнала анализируемой пробы к шуму холостой пробы равное 3:1. Нижняя граница определяемых содержаний устанавливалась как концентрация, при которой достигается отношение сигнала анализируемой пробы к шуму холостой пробы равное 10:1.

Для оценки матричного эффекта (МЭ) к образцам высушенных корней женьшеня массой 0.1 г добавляли заданные количества гинсенозида Rd (210 мкг/мл), и гинсенозида F₂ (115 мкг/мл). Таким образом, получили экстракты корней женьшеня с добавками на уровнях концентраций: 0, 0.2, 0.6 мкг/мл для анализа методом ВЭЖХ-МС и 0, 5, 10 мкг/мл для анализа методом ВЭЖХ-УФ. Помимо образцов корней, аналогичным образом готовили водно-метанольные растворы добавок на уровнях концентраций 0.2, 0.6 мкг/мл для F₂ и 5, 10 мкг/мл для Rd. Проводили ультразвуковую экстракцию гинсенозидов, МЭ оценивали по формуле (2.1):

$$\text{МЭ} = \frac{S_1 - S_2}{S_1} \times 100\%, \quad (2.1)$$

где S_1 - величина аналитического сигнала корня с добавкой, S_2 - величина аналитического сигнала добавки в смеси вода:метанол.

Для оценки стабильности факторов отклика варьировали различные параметры разделения и детектирования гинсенозидов, указанные в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Варьирование параметров ВЭЖХ-МС определения гинсенозидов

Параметр	Значения
Концентрация муравьиной кислоты	0.04; 0.1; 0.2; 0.3 %
Температура источника	300, 350, 400, 450, 500 °C
Давление потока газа-завесы	0.7; 0.8; 1.0; 1.2 Бар
Газ-распылитель / (Газ-осушитель)	1.4 (1.4); 1.7 (2.1); 2.1 (2.8); 2.4 (3.4); 3.1 (4.1) Бар
Напряжение на капилляре	5500, 5000, 4500, 4000 В
Скорость потока элюента	0.36; 0.38; 0.40; 0.42; 0.44 мл/мин
Температура колонки	29, 32, 35; 38; 41 °C
Объем вводимой пробы	16; 18; 20; 22; 24 мкл
Потенциал декластеризации	20; 40; 60; 80; 120 В
Входной потенциал на нулевом квадруполе	4; 6; 8; 10; 12 В

Пробоподготовка образцов растительных экстрактов. Подготовленные образцы корней растений *P. ginseng*, в т.ч. красный корейский женьшень, измельченные в блендере; сушеные кольца корня американского женьшеня; корейский женьшеневый чай, метанольный экстракт из 50 г сухого корня женьшеня (Дальний Восток), высушенный в токе воздуха при температуре 50 °C и биологически активная добавка «Гербион® Женьшень» были измельчены в ступке. К навескам 0.1 г измельченных образцов растительных материалов и коммерческих продуктов добавляли экстрагент, представлявший собой смесь метанола с водой. Затем проводили экстрагирование в ультразвуковом поле при 30°C в течение 30 минут. После экстракции отбирали надосадочную жидкость и центрифугировали (5 минут при 16000 оборотах в минуту). Затем пробы пропускали через пористый фильтр (0.45 мкм) и переносили в новые пробирки. Наконец, отбирали по 1 мл образцов в вials перед проведением ВЭЖХ-УФ-МС анализа. Значение площади для каждого гинсенозида измеряли в том разбавлении образца, при котором она была в области линейности градуировочного графика.

2.2.7 Схема эксперимента по разработке ВЭЖХ-МС-КАМС подхода к групповому определению стероидных сапонинов якорцев стелющихся

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Растворы протодиосцина, диосцина и диосгенина с концентрацией 1 мг/мл готовили аналогично растворам гинсенозидов (см. п. 2.2.6). Полученные растворы использовали для приготовления серий градуировочных растворов с концентрациями 15,125; 32,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 и 2000 нг/мл последовательным разбавлением в подвижной фазе.

Подбор хроматографических условий разделения осуществляли, используя хроматографическую систему Dionex (США) Ultimate 3000 с МС детектором AB Sciex Qtrap 3200 (Канада). Разделение проводили на колонке Acclaim 120 Å C18 (150 × 2.1 мм; 2.2 мкм). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–1.5 мин, 15% Б; 1.5–7.5 мин, 15–93% Б; 7.5–14.0 мин, 95% Б; 14.0–14.2 мин, 95–15% Б, 14.2–18.2 мин, 15% Б. Скорость потока – 0.4 мл/мин при 35 °С, объем вводимой пробы – 20 мкл. МС детектирование с использованием ЭРИ осуществляли в режиме СИМ m/z 415.3 и 397.3. Начальные параметры работы источника ЭРИ: температура источника ионизации, 350 °С; ПД = 40 В; ВП = 10 В; напряжение на распыляющем капилляре, + 5500 В; давление газа-распылителя, 2.1×10^5 Па, газа-осушителя и газа-завесы 2.7×10^5 Па и 1.0×10^5 Па, соответственно.

Пробоподготовка образцов растительных экстрактов. Для анализа отбирали 50 г образца («№1») измельченных надземных частей растения *T. terrestris* и последовательно добавляли 70 % раствора этанола тремя порциями по 350, 250 и 250 мл соответственно. После добавления каждой порции экстрагента, смесь оставляли перемешиваться на шейкере в течение одного часа. Объединенные этанольные вытяжки упаривали на песчаной бане до получения сухого экстракта массой 0.4172 г (образец «№2»). Навески (100 мг) образцов «№1» и «№2» отбирали в трех повторностях. К навескам в пробирке объемом 15 мл добавляли 10 мл смеси метанол:вода (1:1). Ультразвуковую экстракцию проводили в течение 15 минут при 30 °С. Экстракты центрифугировали при 16 000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали через 0.45 мкм фильтр CHROMAFIL Xtra (Macherey-Nagel, Германия). Далее растворы разбавляли в 10 и 50 раз подвижной фазой для ВЭЖХ-МС анализа.

2.2.8 Схема эксперимента по гидролизу и валовому групповому определению гинсенозидов женьшеня

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Помимо индивидуальных стандартных образцов гинсенозидов женьшеня использовали стандарты панаксатриола (ПТ), панаксадиола (ПД), протопанаксатриола (ППТ), протопанаксадиола (ППД) с чистотой >98%, приобретенные в PhytoLab GmbH (Германия). Исходные индивидуальные стандартные растворы и рабочие растворы готовили по процедурам, аналогичным описанным в п. 2.2.6.

Пробоподготовка образцов растительных экстрактов. Образцы продуктов на основе женьшеня (сухие кольца корней американского женьшеня и ломтики красного женьшеня) измельчали до фрагментов <2 мм. Также использовали сухие образцы пищевой добавки и гранул корейского женьшеневого чая. Навески образцов (0.2 г) помещали в полипропиленовые пробирки (15 мл) и добавляли 5 мл 70% водного метанола. После 10 минут перемешивания пробирки переносили в ультразвуковую ванну на 40 мин. Надосадочный раствор отделяли центрифугированием при 4000 об./мин. Повторяли процедуру извлечения после добавления новой порции 5 мл растворителя. Перед проведением гидролиза полученные экстракты разбавляли в 500 раз (сухие кольца), 50 раз (красный женьшень), 80 раз (корейский чай), 2000 раз (биодобавка). Аликвоту (100 мкл) полученного раствора разбавляли в 10 раз водой и переносили в картридж Oasis-HLB (1 мл, 30 мг, Waters, США). Полярные компоненты удаляли двумя промывками 0.5 мл смесью 5 % метанола в воде, для элюирования сапонинов пропускали двумя порциями 0.5 мл чистого метанола.

Проведение гидролиза в кислой среде. Аликвоты (100 мкл) индивидуальных стандартных растворов гинсенозидов Rg₁, Rb₁, RT₅ (5 г/мл) в метаноле смешивали с 200 мкл 0.12 М (1.2 М) соляной кислоты в метаноле. Растворы нагревали до 80 °С и выдерживали от 0.5 до 3 часов. Растворитель удаляли в токе азота при комнатной температуре. Осадок в пробирке (1.5 мл) перерастворяли в 750 мкл деионизированной воды и 750 мкл хлороформа, интенсивно перемешивая в течение 10 минут. Органический слой отделяли после центрифугирования (10 мин, 4000 об./мин) и упаривали в токе азота в виалах (1.5 мл), затем добавляли 100 мкл подвижной фазы и перемешивали перед проведением ВЭЖХ-МС анализа.

Проведение гидролиза в щелочной среде. Аликвоты (100 мкл) индивидуальных стандартных растворов гинсенозидов Rg₁, Rf, Rh₁, Re, Rb₁, Rd, Rb₃, RT₅, F₁₁ (5 г/мл) в метаноле смешивали с навеской CH₃ONa (1.5, 3, 12 мг) и 3 мл орастворителя (метанол, ацетонитрил, диметилсульфоксид, пиридин) или 3 мл 5% КОН в воде. Растворы выдерживали при нагревании в течение 3 часов. Растворитель удаляли в токе азота при комнатной температуре. Осадок в пробирке (15 мл) перерастворяли в 3 мл смеси 5% метанола в воде, добавляя 1% муравьиную кислоту до нейтральной реакции. Полученный раствор пропускали через картридж Oasis-HLB (1 мл, 30 мг, Waters, США). Картридж промывали 0.5 мл смеси 5 % метанола в воде, затем элюировали продукты реакции двумя порциями 0.5 мл метанола. Растворитель упаривали в токе азота в виалах (1.5 мл), затем добавляли 100 мкл подвижной фазы и перемешивали перед проведением ВЭЖХ-МС анализа.

Выбор хроматографических условий разделения осуществляли, используя систему ВЭЖХ-МСВР систему, состоящую из хроматографа Thermo Scientific Acella HPLC system (США) и масс-анализатора Orbitrap Exactive (Германия). Разделение проводили на C18 колонке (3 мкм, 2.1 × 150 мм, Hypersil Gold aQ) с предколонкой Hypersil Gold aQ 10.2 × 2.1 мм (Thermo Scientific, USA). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора HCOOH в деионизированной воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиентного элюирования: 0–2 мин, 5% В; 2–15 мин от 5 до 95% В; 15–18 мин 95% В; 18–19 мин от 95 до 5% В; 19–23 мин 5% В. Скорость потока – 0.5 мл/мин при 30°C, объем вводимой пробы – 3 мкл.

Условия МС детектирования: напряжение на распыляющем капилляре +4000 В; температура в источнике ионизации, 270°C; давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов, 5 у.е.; давление осушающего газа, 40 у.е.; газ-завесы, 10 у.е.; потенциал декластеризации, 60 В; входной потенциал, 10 В; энергия соударений, 5 В. Запись хроматограмм осуществляли в режиме сканирования: m/z 90 – 1350 (с разрешением 35000 при m/z 400) и в режиме СИМ (m/z 405.3518, 423.3623, 441.3729 для ППТ и ПТ; m/z 407.3674, 425.3781, 443.3881 для ППД и ПД; m/z 421.3645, 439.3717, 457.3912 для ОТ).

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОСТАВА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ⁴

Описание проблемы. Постановка задачи. Большинство контролируемых соединений, отвечающих за качество и целебные свойства растительных материалов, представляют собой достаточно сложные по структуре органические соединения, за исключением некоторых групп, таких как алкалоиды, состоящие из углерода, кислорода и водорода. С точки зрения хроматографии они большей частью относятся к среднеполярным соединениям, поскольку обычно состоят из объемного углеводородного остова (например, тритерпены, стероиды) и нескольких полярных заместителей (ОН-групп, сахаров и др.). Традиционно для определения этих соединений используют ВЭЖХ с УФ-детектированием [278,279], однако при этом часто игнорируют пики структурных аналогов и изомеров, стандарты которых отсутствуют в лаборатории или отсутствуют в продаже. В качестве примера можно рассмотреть методику контроля качества растительного материала – корневищ родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.). В актуальной фармакопейной статье (ФС.2.5.0036.15 [280]) для этого вида растительного сырья приведены рекомендации для проверки визуальных и микроскопических признаков, а также методика ТСХ

⁴ При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Turova P., Stekolshchikova E., Baygildiev T., Shpigun O., Rodin I., Stavrianidi 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%; 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 tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9. № 1. С. 61–65. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 50%; 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%; Ставрианиди А.Н., Родин И.А., Браун А.В., Стеколыщикова Е.А., Шпигун О.А. Определение биомаркеров *P. quinquefolius* в растительных материалах и коммерческих продуктах комбинированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии. // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. № 1. С. 45–52. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 40%; 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 tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Химия раст. сырья. 2015. № 3. С. 97–104. ИФ (РИНЦ) – 0,411. 50%; Ставрианиди А.Н., Стеколыщикова 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%; 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 tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2018. Т. 15. № 1. С. 5–11. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 40%; 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%.

определения основных групп биологически активных веществ и ВЭЖХ методика определения содержания салидрозида и гликозидов коричневого спирта (суммарно). Для определения салидрозида рекомендованная длина волны детектирования – 219 нм, а для гликозидов коричневого спирта – 250 нм. Сумма содержаний гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин должна быть не менее 1%, салидрозида не менее 0.8%.

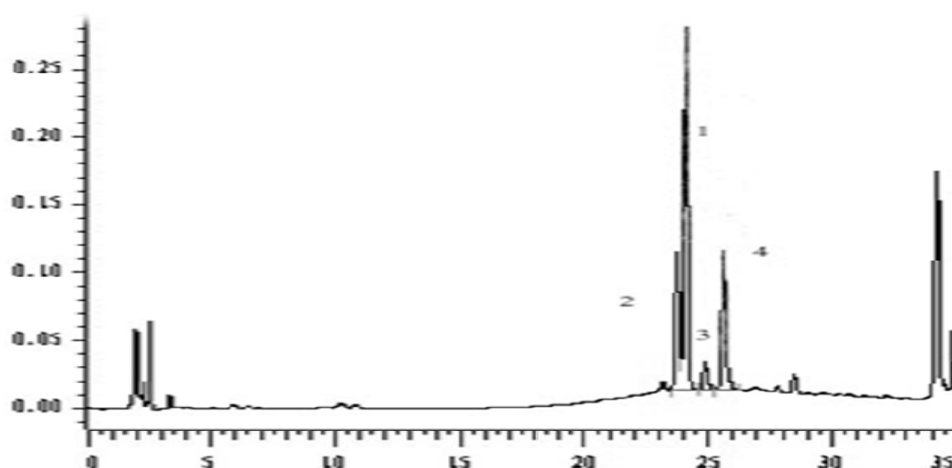


Рисунок 3.1 – Хроматограмма разделения гликозидов коричневого спирта в экстракте из корневищ родиолы розовой (250 нм) [280].

Кроме того, для гликозидов коричневого спирта отмечается, что пик розавина должен быть самым большим по площади, а 3 других пика должны находиться слева и справа от него (1 пик и 2 пика, соответственно), однако полное соответствие данному описанию не числится среди жестких требований к сырью. На рисунке 3.1 приведена хроматограмма из данной статьи.

Таким образом, определять содержания двух маркеров – салидрозида и розавина недостаточно, а оценка суммы площадей нескольких пиков без учета соотношения отдельных гликозидов и их факторов отклика является не совсем надежным и стабильным показателем качества данного сырья, следовательно имеет смысл расширить список контролируемых соединений до трех – салидрозида, розавина и розарина (рис. 3.2), стандартные образцы которых коммерчески доступны, а также использовать ВЭЖХ-МС для точного их определения на фоне присутствия других гликозидов коричневого спирта и других компонентов экстракта.

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. Таким образом, логичным усовершенствованием существующих и описанных в фармакопеях разных стран методик анализа таких образцов является разработка стратегии целевого ВЭЖХ-МС определения заданного набора биомаркеров.

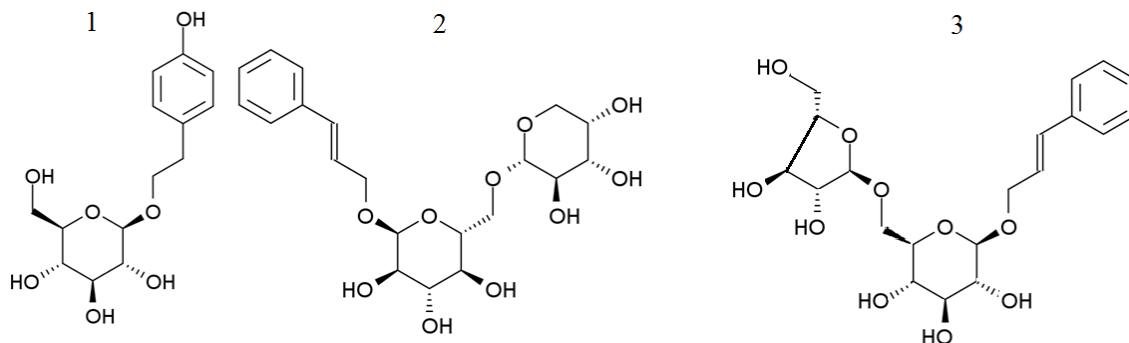


Рисунок 3.2 – Структурные формулы салидрозида (1), розавина (2) и розарина (3).

На первой стадии разработки ВЭЖХ-МС методик необходимо определиться с выбором таких соединений-маркеров. Изначально путем фракционирования экстракты из растительных материалов разделяли на отдельные части, обнаруживали и выбирали компоненты с наибольшим содержанием в качестве основных представителей 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. 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 [157,258]. В свою очередь, стандартные образцы этих компонентов таким же образом выкапливали в необходимых количествах, выделяя из тех же экстрактов, 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. Фактически, на сегодняшний день, как правило, используют все доступные стандартные образцы соединений, ранее обнаруженных в составе данного растения,

для разработки новых методик более комплексной оценки качества и лекарственного потенциала. Однако, для быстрого скрининга присутствия тех или иных растений в составе рассматриваемого продукта, число определяемых биомаркеров может быть уменьшено.

3.1 Разработка методик целевого ВЭЖХ-МС определения биомаркеров растительного сырья

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, тем не менее, что одна методика может быть адаптирована под разные объекты анализа и условия пробоподготовки могут быть изменены. Так, в коммерческой продаже зачастую можно встретить экстракты, настойки и отвары, пробоподготовка для которых может включать меньше стадий, например, только разбавление подвижной фазой (dilute-and-shoot).

3.1.1 Выбор условий МС/МС детектирования соединений-маркеров

На стадии проведения оптимизации условий tandemного масс-спектрометрического детектирования осуществляли подбор параметров, отвечающих за образование и перемещение ионов (потенциал декластеризации, 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 и розавин (рис. 3.2, 3.3) или элеутерозиды (рис. 3.4) 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 фрагментных ионов этих соединений (рис. 3.3 и 3.5) можно обнаружить несколько интенсивных сигналов, предположительно относящихся как к отщепляемым сахаридным остаткам, так и к фенольным фрагментам с депротонированной свободной гидроксильной группой.

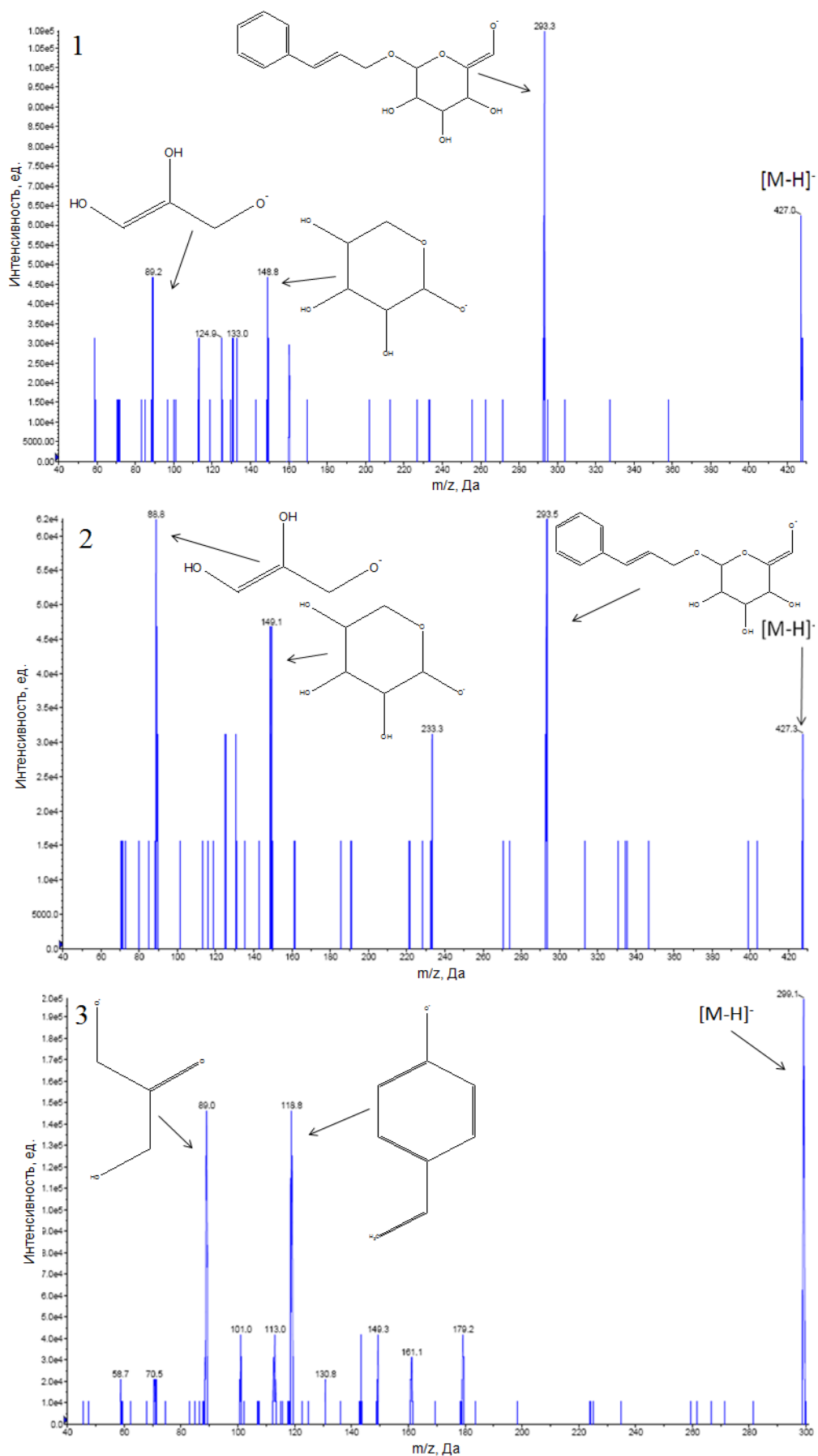


Рисунок 3.3 – Масс-спектры ДИС и предполагаемые структуры фрагментных ионов для депротонированных молекул розарина (1), розавина (2) и салидрозида (3).

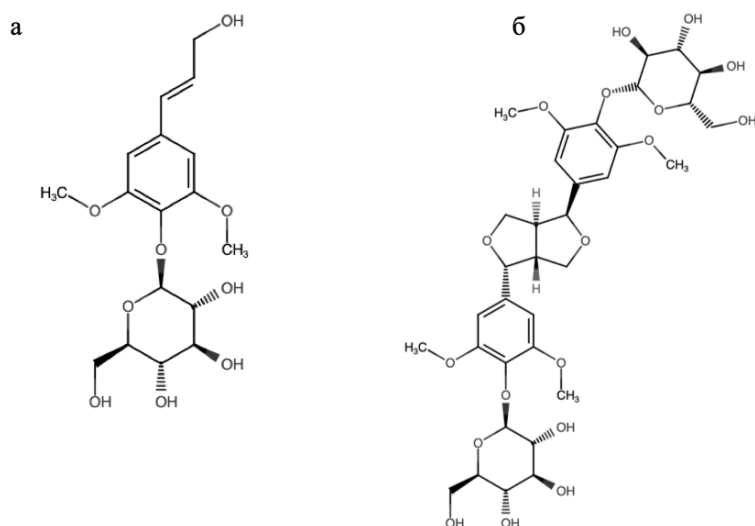


Рисунок 3.4 – Структурные формулы элеутерозида В (а) и элеутерозида Е (б).
 Элеутерозид В: брутто-формула – $C_{17}H_{24}O_9$, молекулярная масса – 372.37 Да. Элеутерозид Е: брутто-формула – $C_{34}H_{46}O_{18}$, молекулярная масса – 742.72 Да.

Аналогичная картина наблюдается для флавоноидных гликозидов, в частности скутелларина и байкалина (рис. 3.6).

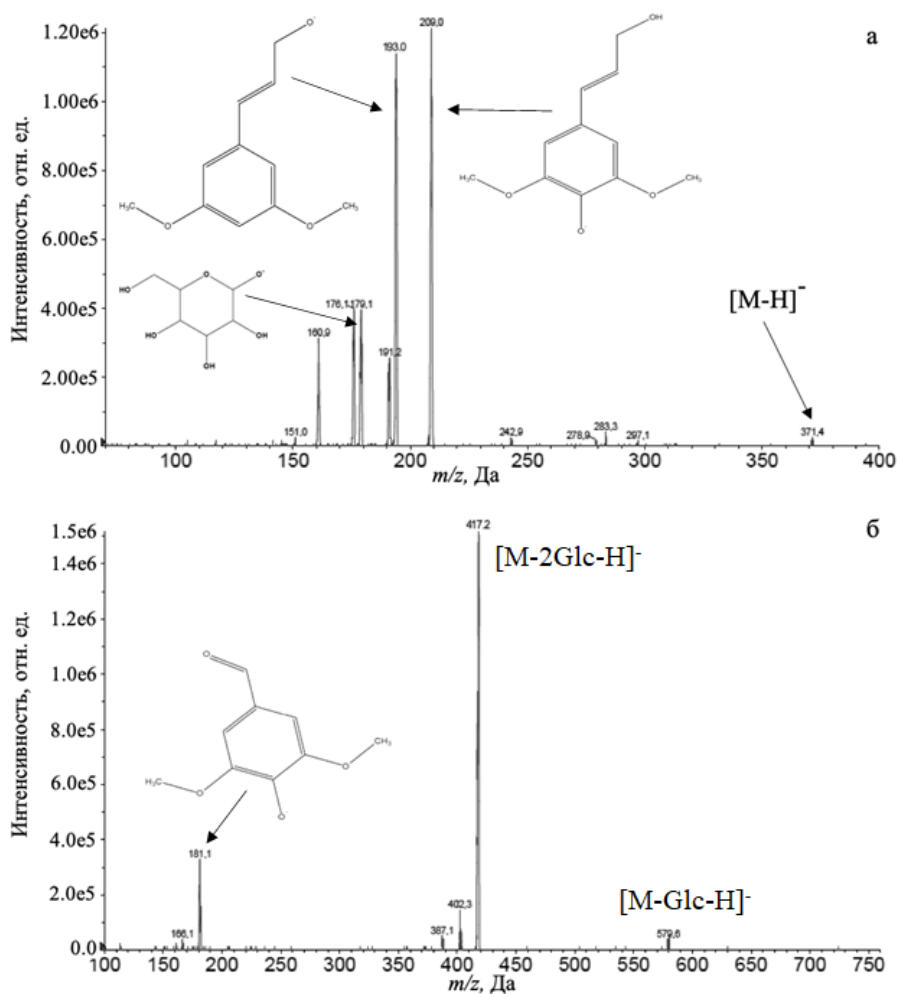


Рисунок 3.5 – Масс-спектры ДИС и предполагаемые структуры фрагментных ионов для депротонированных молекул: элеутерозида В с m/z 371 (а) и элеутерозида Е с m/z 741 (б).

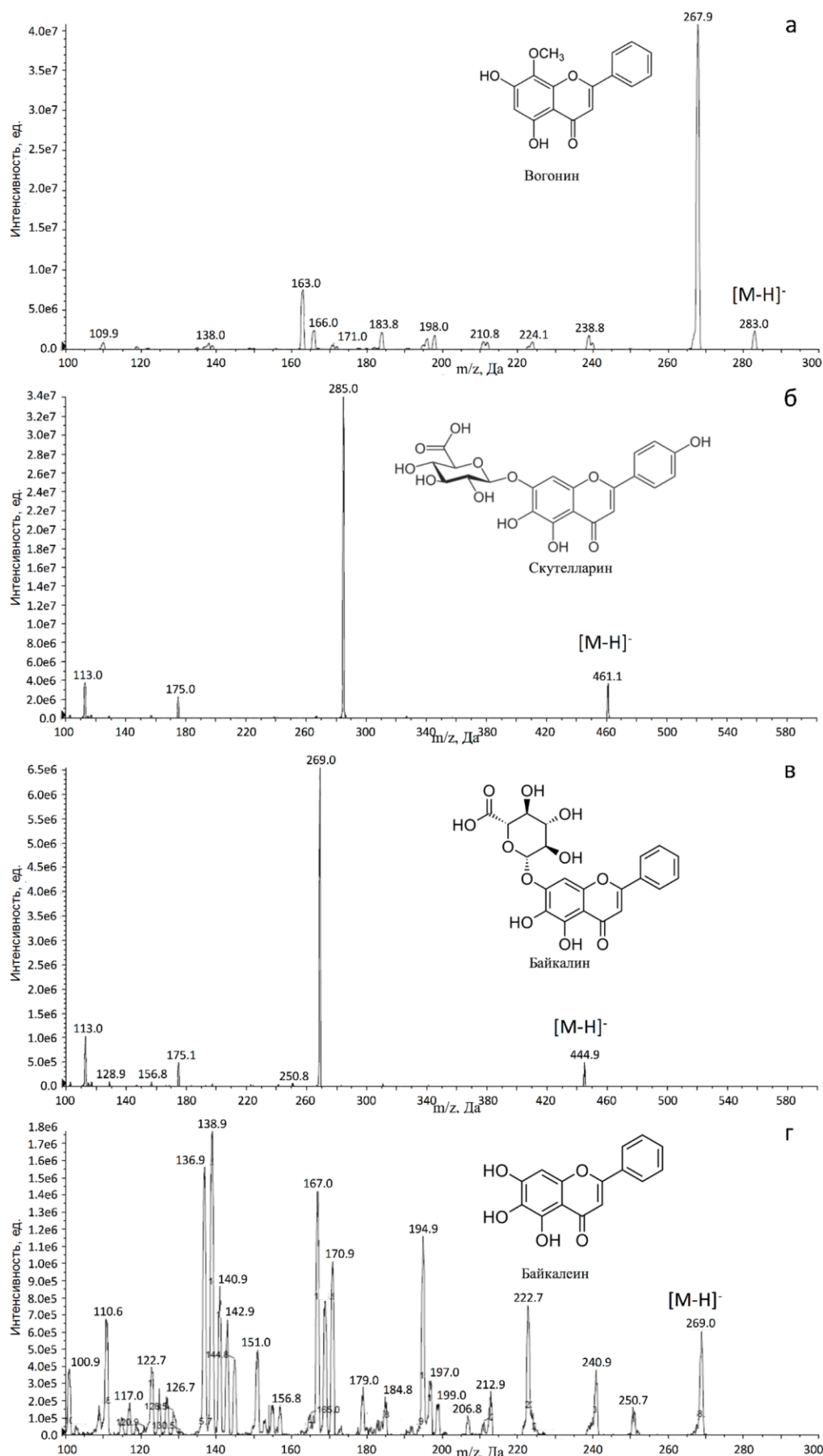


Рисунок 3.6 – Масс-спектры ДИС для депротонированных молекул: вогонина (а) с m/z 283; скутелларина с m/z 461 (б); байкалина с m/z 481 (в); байкалеина с m/z 481 (г).

В то время как для соединений, не содержащих в своей структуре таких легко уходящих групп как сахара, например, лигнанов или флавоноидов имеющих агликоновую природу (в т.ч. вогонин, байкалеин), в МС² наблюдаются значительно менее интенсивные сигналы (рис. 3.6, 3.7).

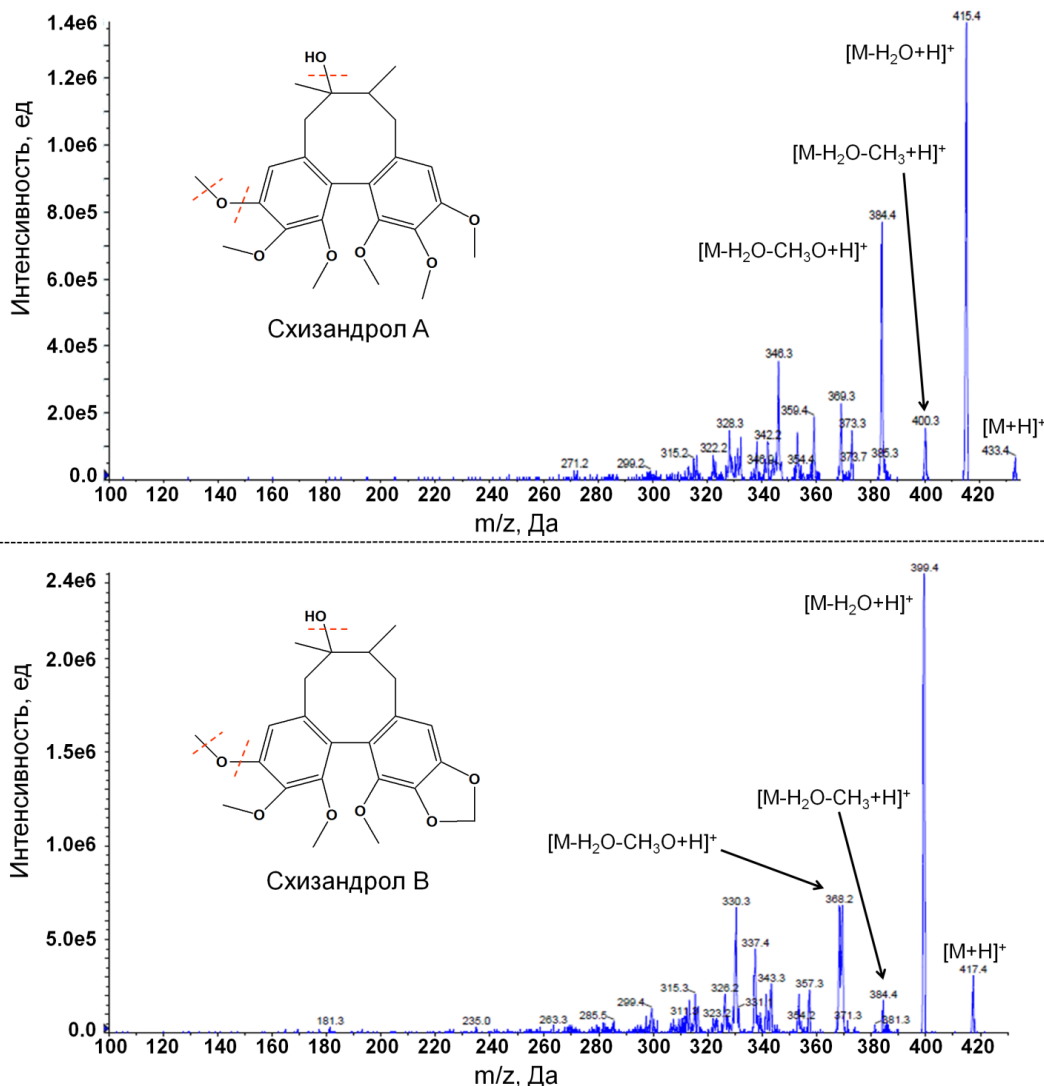


Рисунок 3.7 – Масс-спектры ДИС для протонированных молекул схизандролов А и В.

Критерием выбора оптимальных значений потенциала декластеризации (ПД), входного потенциала (ВП) на нулевом квадруполе масс-спектрометра и энергии соударений (ЭС) является максимальная интенсивность получаемых в режиме МЗР сигналов. Значения этих параметров на всем диапазоне заданных значений ($\pm 0-200$ В для ДП, $\pm 0-12$ В для ВП, $\pm 0-150$ В для ЭС) изменяли в автоматическом режиме с шагом 1 В для определения положения максимума сигнала. Таким образом, были выбраны условия МС детектирования для всех определяемых соединений (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Параметры, выбранные для определения биомаркеров, связанных с исследуемыми растениями

Растение	Биомаркер	Ссылка	ЭРИ режим	ПД	ВП	ЭС	МЗР	
							Переход 1	Переход 2
<i>Leuzea carthamoides</i> (и <i>Serratula coronata</i> / <i>tinctoria</i>)	Экдистерон	[281]	-	-50	-6	-25	479 → 319	479 → 159
<i>Rhodiola rosea</i>	Салидрозид	[282]	-	-25	-5	-18	299 → 119	299 → 89
	Розавин		-	-40	-11	-22	427 → 293	427 → 149
	Розарин		-	-26	-5	-18	427 → 293	427 → 149
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Элеутерозид В	[283]	-	-44	-9	-32	371 → 209	371 → 194
	Элеутерозид Е		-	-43	-9	-62	741 → 209	741 → 194
<i>Ginkgo biloba</i>	Гинкголовая кислота C ₁₃ :0	[284]	-	-65	-10	-48	319 → 106	319 → 276
	Гинкголовая кислота C ₁₅ :1		-	-54	-10	-54	345 → 106	345 → 301
	Гинкголовая кислота C ₁₇ :1		-	-40	-10	-65	373 → 106	373 → 329
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Вогонин	[285]	-	-32	-10	-30	283 → 268	283 → 163
	Скутелларин		-	-32	-10	-25	461 → 285	461 → 175
	Байкалин		-	-26	-10	-23	445 → 269	269 → 195
	Байкалеин		-	-45	-10	-38	445 → 175	269 → 139
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Глицирризин	[157]	-	-97	-10	-56	821 → 351	821 → 193
<i>Hedysarum coronarium</i>	Мангиферин	[286]	-	-35	-10	-29	421 → 301	421 → 331
<i>Silybum marianum</i>	Силибин	[157]	-	-34	-10	-26	481 → 301	481 → 453
<i>Panax ginseng</i>	Гинсенозид Rb ₁	[157]	-	-130	-10	-70	1107 → 179	1107 → 945
	Гинсенозид Rg ₁		-	-80	-10	-50	799 → 475	799 → 159
<i>Panax quinquefolius</i>	Псевдогинсенозид F ₁₁	[167]	+	50	7	30	801 → 439	801 → 143
	Псевдогинсенозид RT ₅		+	50	7	30	655 → 439	655 → 143
<i>Schisandra chinensis</i>	Схизандрол А	[287]	+	31	8	38	433 → 415	433 → 384
	Схизандрол В		+	31	8	12	417 → 399	417 → 368
<i>Crataegus laevigata</i>	Аскорбиновая кислота	[288]	-	-21	-5	-17	175 → 115	175 → 87
	Кверцетин		-	-44	-10	-46	301 → 121	301 → 151
	Гиперозид		-	-80	-10	-48	465 → 299	465 → 271
	Кемпферол		-	-48	-10	-56	285 → 255	285 → 227
	Витексин		-	-31	-10	-29	431 → 311	431 → 341

Продолжение таблицы 3.1

<i>L. carthamoides, S. tinctoria</i>	Хлорогеновая кислота	[289,290]	-	-33	-4	-25	353 → 191	353 → 161
<i>Eurycoma longifolia</i>	Лютеолин	[291]	-	-42	-10	-37.5	285 → 133	285 → 151
	Лютеолин-7-глюкозид		-	-50	-10	-35	447 → 285	447 → 255
	Лютеолин-7-о-глюкоронид		-	-45	-10	-7	461 → 285	461 → 133
<i>L. carthamoides, S. tinctoria</i>	Рутин	[292,293]	-	-73	-6	-45	609 → 301	609 → 271
<i>Paullinia cupana</i>	Кофеин	[294]	+	44	9	23	195 → 138	195 → 110
<i>Tanacetum vulgare</i>	Кверцетин-3-клюдоронид	[295]	-	-38	-10	-20	477 → 301	477 → 151
	Кверцетин-3-рутинозид-7-глюкозид		-	-146	-10	-85	771 → 299	771 → 271
	Кверцетин-7-рамозид		-	-185	-10	-30	447 → 301	447 → 151
<i>Eryngium campestre</i>	Кверцетин -7- глюкозид	[296]	-	-185	-10	-30	463 → 301	463 → 300
	Кверцетин -3- глюкозид		-	-185	-10	-30	463 → 301	463 → 300
	Апигенин-7- глюкозид		-	-37	-10	-38	445 → 269	445 → 113
<i>Tribulus terrestris</i>	β-ситостерол ($[M-H_2O+H]^+$)	[297]	+	33	10	22	397 → 175	397 → 215
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Дельфинидин-3-о-глюкозид	[298]	-	-67	-10	-32	463 → 300	463 → 125
<i>Matricaria chamomilla</i>	Кумарин	[299]	+	41	10	26	147 → 91	147 → 103
<i>Bupleurum falcatum</i>	Изорамнетин	[300]	-	-50	-7	-30	315 → 300	315 → 151
	Изорамнетин -3-рутинозид		-	-71	-10	-40	623 → 315	623 → 300
<i>Matricaria chamomilla, Trifolium pratense, Cichorium intybus</i>	Апигенин	[301-303]	-	-45	-10	-31	269 → 225	269 → 149
<i>Ocimum basilicum, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis</i>	Диосметин	[304-306]	-	-60	-10	-26	299 → 284	299 → 151
	Хризоеиол		-	-60	-10	-27	299 → 284	299 → 256
	Акацетин		-	-60	-10	-28	283 → 269	283 → 212
<i>Hypericum perforatum</i>	Гиперицин	[307]	-	-100	-10	-30	503 → 434	503 → 406
<i>Geranium pratense, Matricaria chamomilla</i>	Хризин	[308,309]	-	-160	-10	-30	253 → 63	253 → 143
<i>Geranium pratense, Humulus lupulus</i>	Катехин	[310,311]	-	-45	-10	-7	289 → 245	289 → 109
	Эпикатехин		-	-45	-10	-7	289 → 245	289 → 109

3.1.2 Выбор условий хроматографического разделения соединений-маркеров

Как уже было показано на примере гликозидов родиолы розовой (рис. 3.1), необходимо определять целевые соединения-маркеры, пики которых зачастую не полностью разделены с пиками их структурных аналогов и изомеров на хроматограмме. 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 рисунке 3.8 продемонстрированы участки хроматограмм стандартной смеси и растительных экстрактов из семян лимонника китайского, на которых практически отсутствуют какие-либо колебания базовой линии.

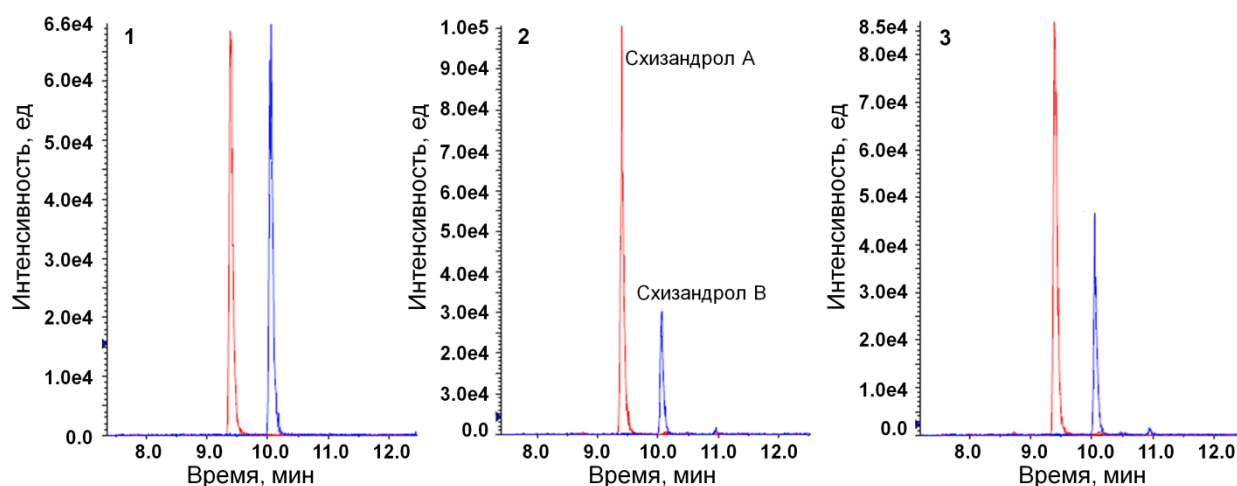


Рисунок 3.8 – Масс-хроматограммы стандартного раствора с содержанием схизандролов А и В 0.9 и 0.5 мкг/мл, соответственно — 1; сконцентрированной водной вытяжки — 2 и спиртового экстракта из измельченных семян *S. chinensis* — 3, полученные в режиме МЗР: m/z 433 $\rightarrow$ 415 для схизандрола А и m/z 417 $\rightarrow$ 399 для схизандрола В.

При этом, хроматограммы по полному ионному току и сигналу УФ детектора (рис. 3.9) демонстрируют высокую «заселенность» этого участка градиента. Аннотация пиков структурных аналогов схизандролов: тиглоилгомисина Н, англоилгомисина Н, гомисинов G, В, Е и N, а также схизандринов А, В и С была осуществлена на основании совпадения m/z сигналов $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ ионов в масс-спектрах этих пиков с рассчитанными номинальными массами этих ионов для данных соединений.

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

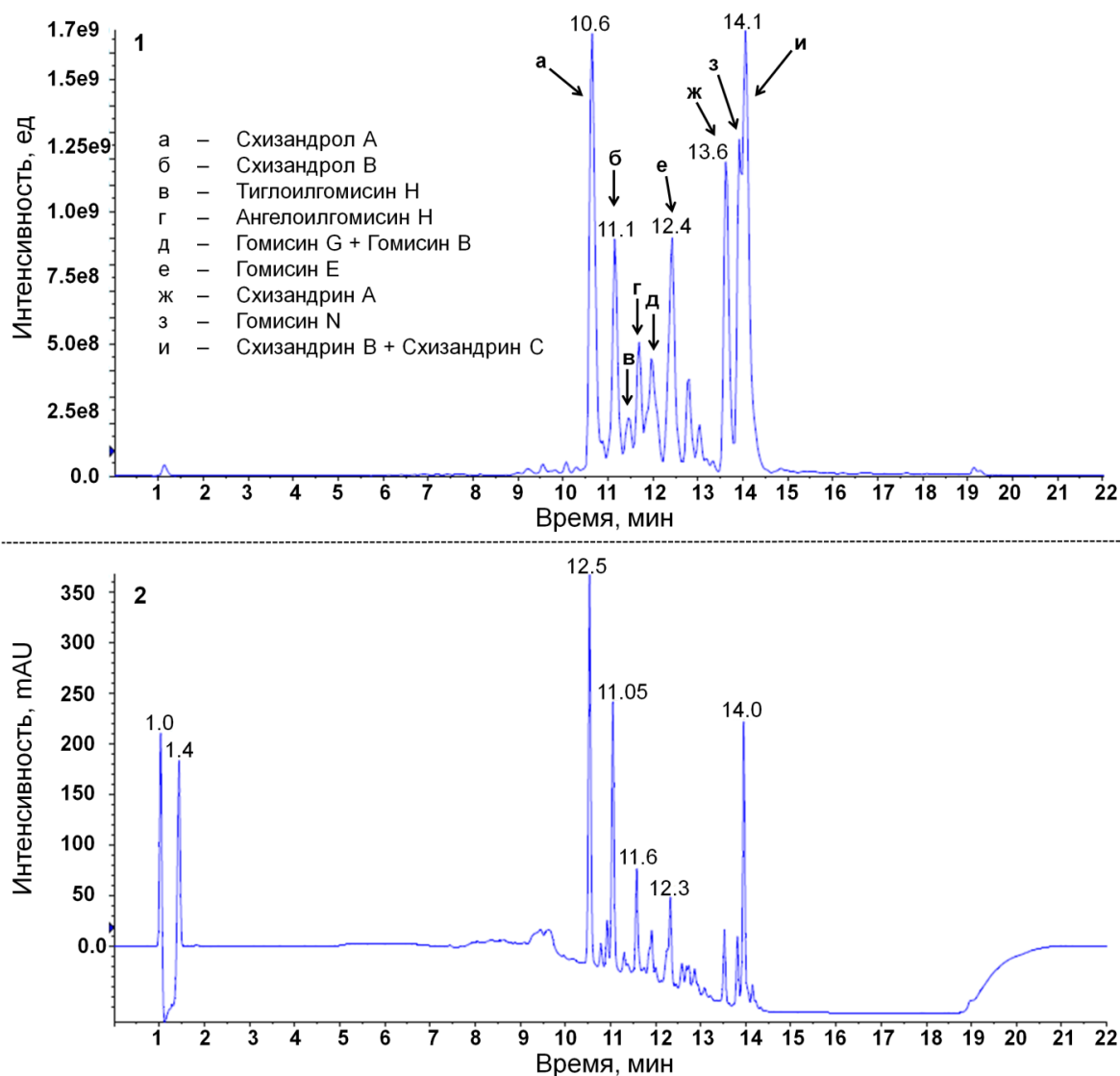


Рисунок 3.9 – Хроматограммы экстракта из измельченных семян *Schisandra chinensis*, полученные в режимах сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 100-1700 Да — 1 и УФ детектирования при длине волны поглощения 241 нм — 2.

нецелевых компонентов. Так, на рисунке 3.10 пики с временами удерживания 6.19 и 6.43. относятся к гликозидам вогонина, однако не мешают его определению, поскольку сам вогонин удерживается сильнее (8.62 мин) ввиду отсутствия влияния полярных сахаридных заместителей.

В большинстве случаев, используя выбранные стандартизированные условия градиентного элюирования (см. п. 2.2.1), удавалось добиться удовлетворительного ($R_s > 1$) разделения определяемых маркеров с другими компонентами на хроматограмме. Индивидуальные параметры разделения были использованы только в некоторых отдельных случаях: для разделения псевдогинсенозидов F_{11} и RT_5 (рис. 3.11), а также в случае изомеров, например, розавина и розарина (рис. 3.12).

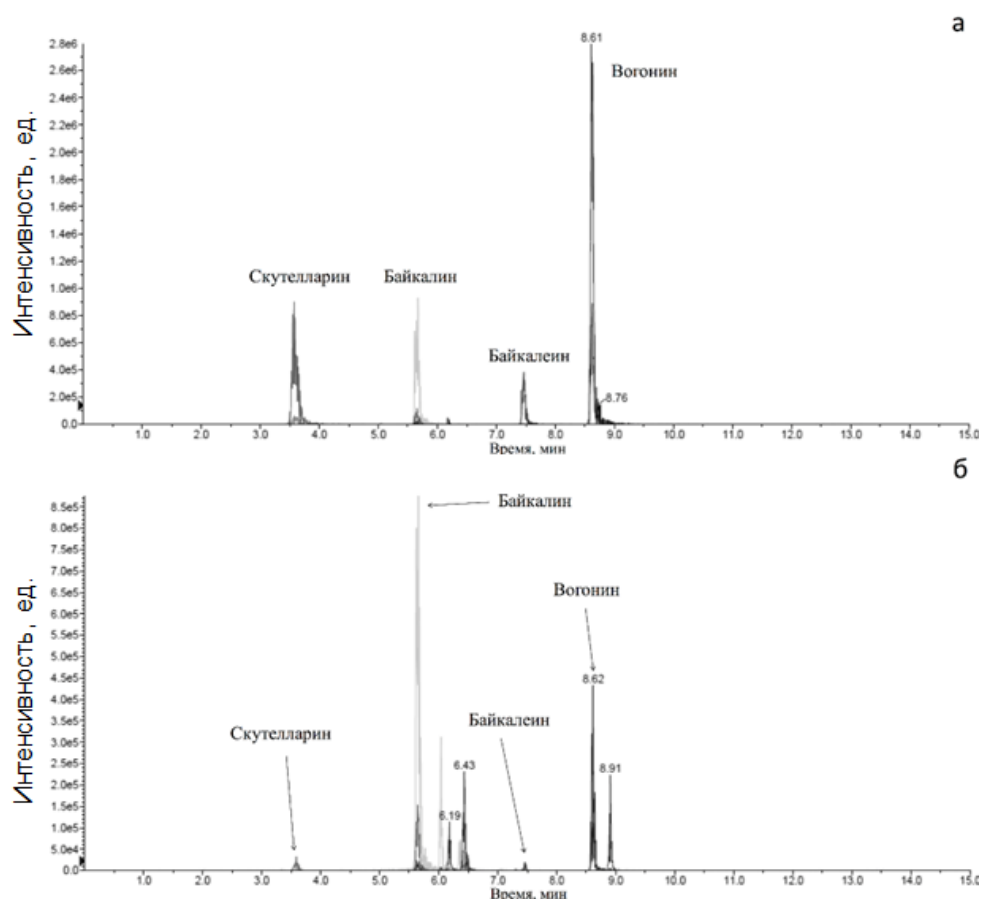


Рисунок 3.10 – Хроматограмма стандартного водного раствора, содержащего смесь 10 мкг/мл вогонина, скутелларина, байкалина, байкаленина (а); хроматограммы спиртового экстракта из корневищ шлемника байкальского (б).

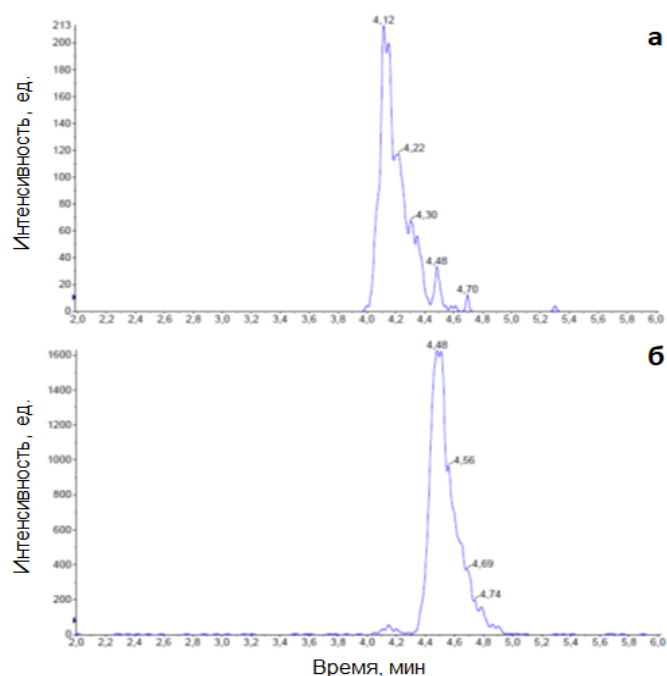


Рисунок 3.11 – Масс-хроматограммы стандартных р-ров псевдогинсенозидов F₁₁ (а) и RT₅ (б) (200 и 300 нг/мл), полученные в режиме изократического элюирования (32 : 67.5 : 0.5 ацетонитрил : вода : муравьиная кислота) на колонке Acclaim RSLC 120 C18 в режиме МЗР: m/z 801→143 для F₁₁ и m/z 655→143 для RT₅.

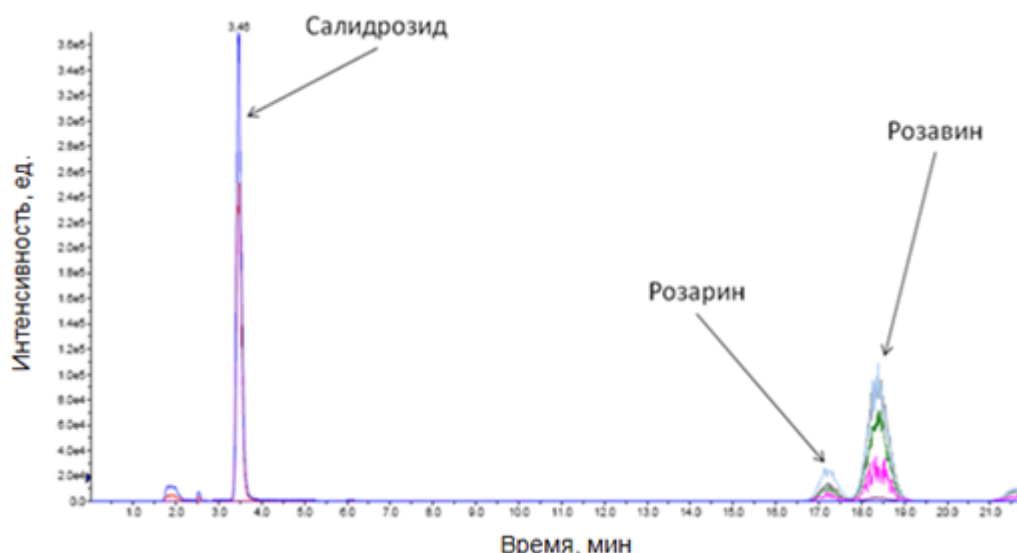


Рисунок 3.12 – Масс-хроматограмма разделения экстракта из корня родиолы в режиме изократического элюирования (15 : 84.5 : 0.5 ацетонитрил : вода : уксусная кислота) на колонке Zorbax SB-C18 в режиме МЗР: m/z 427 $\rightarrow$ 293/149 для розавина и розарина и m/z 299 $\rightarrow$ 199/89 для салидрозида.

3.1.3 Оценка метрологических характеристик при определении маркеров на тройном квадрупольном масс-анализаторе 3200 QTRAP

Такие показатели, как воспроизводимость, чувствительность, диапазон линейности, зависят от конструкции используемого масс-спектрометрического детектора. Отличаются как источники ионизации, так и внутренняя ионная оптика приборов. Для оценки аналитических характеристик разработанных способов определения компонентов растительного сырья был использован средний по чувствительности (в сравнении аналогичными приборами) тройной квадрупольный масс-спектрометр 3200 QTRAP с источником ЭРИ (Turbo Spraytm) фирмы AB Sciex (Канада). Кроме того, интенсивность регистрируемых сигналов может меняться в случае загрязнения камеры ионизации или незначительного изменения состава подвижной фазы (например, наличия примесей). По этим причинам в целевом ВЭЖХ-МС анализе, даже при использовании изотопно-меченных внутренних стандартов, свежеприготовленные градуировочные растворы хроматографируют с каждой серией образцов. 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. Также нет возможности получить экстракт исследуемого растения, свободный от определяемых в нем соединений, поскольку их удаление приведёт и к потере потенциальных мешающих соединений, а использование экстракта другого растения в качестве матрицы не имеет смысла и

может, наоборот, привести к искажению результатов. Таким образом, приходится использовать метод внешнего стандарта в самом простом варианте – готовить градуировочные растворы определяемых соединений в подвижной фазе. При этом критичным является наличие или отсутствие матричного эффекта, величина которого зависит как от исследуемого экстракта и степени его разбавления, так и, вновь, от параметров работы и конструкции конкретного используемого масс-спектрометра. По этой причине в настоящей работе не ставилась задача проверки матричных эффектов для всех исследованных экстрактов, поскольку ее всегда необходимо заново выполнять при адаптации методики в каждой конкретной лаборатории. Матричные эффекты, оцененные методом «введено-найденно» для гинсенозидов женьшеня, маркеров родиолы, элеутерозидов элеутерококка и стероидных гликозидов из разных частей якорцев стелющихся, оцененные нами в ходе экспериментов, не превышали 15-20%, и более того, в большинстве измерений, не превышали и 10%. Согласно литературным данным, такие величины матричных эффектов типичны для разбавленных экстрактов из растений [157,312,313].

В таблице 3.2 приведены установленные значения пределов обнаружения, диапазона линейности и повторяемости.

Таблица 3.2 – Значения диапазонов линейности, коэффициентов детерминации, C_{min} , C_{lim} и s_r (%) при ВЭЖХ-МС/МС определении соединений-маркеров

Биомаркер	Линейный диапазон, нг/мл	r^2	C_{min} , нг/мл	C_{lim} , нг/мл	Повторяемость, s_r , % (n = 4)
Экдистерон	5 – 5000	0.9985	2	5	2.4
Салидрозид	130 – 13000	0.9903	43	130	3.5
Розавин	130 – 13000	0.9901	43	130	2.6
Розарин	130 – 13000	0.9893	43	130	5.1
Элеутерозид В	40 – 4000	0.9954	13	40	6.3
Элеутерозид Е	40 – 4000	0.9995	13	40	5.4
Гинкголовая кислота $C_{13}:0$	1 – 1000	0.9997	0.3	1	3.2
Гинкголовая кислота $C_{15}:1$	1 – 1000	1.000	0.3	1	4.5
Гинкголовая кислота $C_{17}:1$	1 – 1000	1.000	0.3	1	6.1
Вогонин	20 – 500	0.9997	7	20	3.1
Скутелларин	20 – 2000	0.9990	7	20	3.4
Байкалин	20 – 500	0.9996	7	20	4.6
Байкалеин	20 – 500	0.9989	7	20	5.8
Глицирризин	6 – 1000	0.9990	2	6	6.9
Мангиферин	50 – 5000	0.9987	17	50	5.5
Силибин	50 – 2000	0.9922	17	50	4.3
Гинсенозид Rg_1	80 – 1500	0.9999	27	80	6.8

Продолжение таблицы 3.2

Гинсенозид Rb ₁	80 – 1500	0.9996	27	80	4.9
Псевдогинсенозид F ₁₁	20 – 2000	1.000	7	20	6.3
Псевдогинсенозид RT ₅	30 – 3000	0.9997	10	30	7.4
Схизандрол А	20 – 2000	0.9991	7	20	5.1
Схизандрол В	10 – 2000	0.9982	3	10	6.2
Аскорбиновая кислота	110 – 11000	0.9895	37	110	6.3
Кверцетин	1 – 1000	0.9997	0.3	1	7.7
Гиперозид	1 – 1000	1.000	0.3	1	4.2
Кемпферол	1 – 1000	1.000	0.3	1	6.7
Витексин	20 – 10000	0.9995	7	20	7.0
Хлорогеновая кислота	130 – 13000	0.9985	40	130	6.1
Лютеолин	15 – 1500	0.9894	5	15	5.2
Лютеолин-7-глюкозид	0.9 – 1000	0.9999	0.3	0.9	4.4
Лютеолин-7-о-глюкоронид	2 – 500	0.9991	0.7	2	6.0
Рутин	110 – 10500	0.9921	37	110	5.7
Кофеин	100 – 10000	0.9958	33	100	3.6
Кверцетин-3-клюкоронид	1 – 1000	0.9998	0.3	1	5.1
Кверцетин-3-рутинозид-7-глюкозид	50 – 5000	0.9999	17	50	6.8
Кверцетин-7-рамозид	0.5 – 5000	0.9989	0.2	0.5	7.1
Кверцетин-7-глюкозид	0.5 – 5000	0.9963	0.2	0.5	3.6
Кверцетин-3-глюкозид	0.5 – 5000	0.9997	0.2	0.5	6.6
Апигенин-7-глюкозид	1 – 1000	0.9974	0.3	1	4.0
β-ситостерол	50 – 10000	0.9995	17	50	3.7
Дельфинидин-3-о-глюкозид	50 – 5000	0.9988	17	50	6.1
Кумарин	1.5 – 1500	0.9999	0.5	1.5	6.9
Изорамнетин	5 – 2000	0.9999	2	5	7.1
Изорамнетин -3-рутинозид	9 – 2500	0.9999	3	9	3.8
Апигенин	3.8 – 1500	0.9999	1	3.8	2.9
Диосметин	5 – 1100	0.9977	2	5	5.5
Хризоеириол	3 – 3000	0.9984	1	3	4.7
Акацетин	4 – 4000	0.9924	1	4	3.0
Гиперицин	7 – 7000	0.9952	2	7	8.5
Хризин	0.6 – 6000	0.9989	0.2	0.6	7.4
Катехин	5 – 500	0.9997	2	5	6.6
Эпикатехин	5 – 500	0.9998	2	5	2.0

Калибровочные зависимости были получены методом линейной регрессии для каждого аналита, используя площади пиков на разных концентрациях. Коэффициенты детерминации (≥ 0.99) показывали, что в установленных диапазонах можно использовать линейную взаимосвязь между площадями пиков и концентраций соединений. 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.

3.1.4 Тестирование разработанных способов ВЭЖХ-МС/МС определения соединений-маркеров при анализе растительных экстрактов

В рамках тестирования разработанных методик были проанализированы образцы водных и водно-спиртовых экстрактов из различных растительных материалов (таблица 3.3). Повторяемость (s_r , %) не превышала 19.5%, с учетом процедуры экстракции, 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.

Таблица 3.3 – Концентрации соединений-маркеров в исследованных экстрактах

Растение	Биомаркер	Условия экстракции	Концентрация, мг/мл	Повторяемость s_r , % ($n = 3$)
<i>Leuzea carthamoides</i>	Экдистерон	H ₂ O	1.1	3.1
		MeOH	0.8	6.4
		40 % EtOH	0.9	2.2
<i>Rhodiola rosea</i>	Салидрозид	70 % EtOH	5.8	2.4
		40 % EtOH	2.3	3.1
	Розавин	70 % EtOH	7.6	0.9
		40 % EtOH	3.1	4.6
	Розарин	70 % EtOH	3.3	2.2
		40 % EtOH	1.7	2.1
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Элеутерозид В	H ₂ O	1.6	4.6
		70 % EtOH	1.5	9.4
	Элеутерозид Е	H ₂ O	6.8	3.1
		70 % EtOH	8.4	1.0
<i>Ginkgo biloba</i>	Гинкголовая кислота C ₁₃ :0	70 % EtOH	0.2	19.0
		H ₂ O	0.03	18.9
	Гинкголовая кислота C ₁₅ :1	70 % EtOH	0.5	2.9
		H ₂ O	0.03	10.9
	Гинкголовая кислота C ₁₇ :1	70 % EtOH	1.0	18.4
		H ₂ O	0.04	10.0

Продолжение таблицы 3.3

<i>Scutellaria baicalensis</i>	Вогонин	70 % EtOH	1.1	18.2
		H ₂ O	0.7	17.9
	Скутелларин	70 % EtOH	1.1	18.2
		H ₂ O	0.6	16.7
	Байкалин	70 % EtOH	47.6	5.5
		H ₂ O	30.4	7.9
	Байкалеин	70 % EtOH	1.6	18.3
		H ₂ O	0.9	19.5
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Глицирризин	70 % EtOH	2.9	3.7
<i>Silybum marianum</i>	Силибин	70 % EtOH	4.6	10.9
<i>Panax ginseng</i>	Гинсенозид Rb ₁	H ₂ O	0.9	6.6
	Гинсенозид Rg ₁	H ₂ O	2.9	4.9
		70 % EtOH	12.2	4.1
<i>Panax quinquefolius</i>	Псевдогинсенозид F ₁₁	70 % EtOH	0.02	10.0
	Псевдогинсенозид RT ₅	70 % EtOH	< 0.0001	-
<i>Schisandra chinensis</i>	Схизандрол А	H ₂ O	0.5	10.4
		EtOH	0.6	7.3
	Схизандрол В	H ₂ O	0.08	6.7
		EtOH	0.1	4.0

Благодаря схожим свойствам многих характеристических биомаркеров растений и универсальности используемого ОФ ВЭЖХ-МС/МС метода можно унифицировать отдельные этапы проведения анализа, для того чтобы проводить быстрый скрининг растительных продуктов на наличие тех или иных биомаркеров, при необходимости расширяя список одновременно определяемых соединений. Так, например, экстракция 70% этанолом или метанолом в УЗВ не только является одним из самых быстрых и нетрудозатратных методов [97] извлечения биомаркеров из растительного сырья, но и имитирует один из наиболее популярных способов изготовления лекарственных настоек, позволяя одновременно с контролем качества сырья дополнительно оценить его лекарственный потенциал.

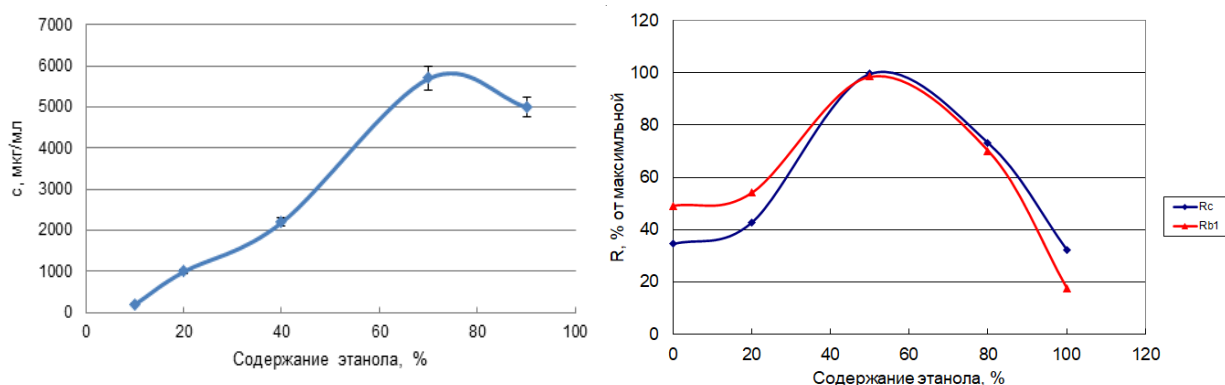


Рисунок 3.13 – Зависимость содержания салидрозида и гинсенозидов Rc и Rb₁ в экстракте от состава экстрагента (соотношения этанол : вода %).

В ходе ряда проводимых в разное время экспериментов, было установлено, что двукратная последовательная 30 минутная экстракция в ультразвуковой ванне (УЗВ) 70% этанолом или метанолом обычно обеспечивает достаточную эффективность (степень извлечения) на уровне выше 85% (рис. 3.13).

3.1.5 Возможности формализации предложенной стратегии целевого ВЭЖХ-МС/МС скрининга биомаркеров

Итак, выбранные биомаркеры можно разделить на две большие группы (таблица 3.1а,б): характеристические соединения-маркеры и распространенные соединения, являющиеся маркерами качества (quality markers). Если удастся найти уникальные характеристические соединения, содержащиеся в растениях, принадлежащих к одному виду или роду, тогда идентифицировать такие растения в составе сложных лекарственных препаратов или оценить качество растительного сырья можно путем определения таких биомаркеров. Хороший пример такого способа – идентификация псевдогинсенозида F₁₁, который является характеристичным маркером *P. quinquefolius* (американский женьшень), и отсутствует в азиатском женьшене (*P. ginseng*).

Для некоторых растений характеристические биомаркеры неизвестны или их стандартные образцы отсутствуют в свободной продаже, или же такие биомаркеры можно найти в их экстрактах только на низких уровнях концентрации. Идентификация таких растений может быть выполнена путем анализа различий в соотношении концентраций широко распространенных соединений, таких как флавоноиды, кумарины и др. В ходе работы концентрации таких маркеров качества были рассчитаны в нескольких экстрактах растений методом внешнего стандарта

(таблица 3.4). Данные маркеры (как и уникальные маркеры) детектировали с помощью режима МЗР.

Таблица 3.4 – Содержание маркеров качества в растительных материалах

Растение	Средняя концентрация маркеров качества, мкг/г (n = 3)			
	Хризоеериол	Акацетин	Изоакацетин	Диосметин
<i>Ocimum basilicum</i>	0.41	0.68	2.24	1.50
<i>Mentha arvensis</i>	<0.1	<0.1	20.7	5.9
<i>Origanum vulgare</i>	0.83	3.0	14.5	3.2
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2.04	16.7	161	3.3
<i>Hypericum perforatum</i>	0.65	<0.1	-	<0.2
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<0.1	23.2	-	3.4
	Хризин	Лютеолин-7- глюкоронид	Кверцетин-7- глюкозид	Кверцетин-3- глюкозид
<i>Geranium pratense</i>	124	2.5	113.8	135.3
<i>Matricaria chamomilla</i>	33	<0.07	75.7	38.5
<i>Eryngium campestre</i>	<0.02	0.87	51.3	198.5

Было обнаружено, что соотношение концентраций хризоеериола, диосметина, акацетина и изоакацетина в некоторых натуральных пищевых ароматизаторах, в виде образцов измельченных растительных материалов *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* и *Rosmarinus officinalis*, существенно различается и составляет 1:3.7:1.7:5.5; 1:3.9:3.6:17.5; 1:1.6:8.2:79 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. Примеры хроматограмм приведены на рисунке 3.14.

Таким образом, подлинность и качество образцов упомянутых растений можно проверить на основании разницы в соотношениях концентраций этих маркеров качества, однако такой подход не применим для контроля растительных смесей, а также не позволяет учитывать в полной мере разные матричные эффекты, уникальные для сигнала каждого компонента в каждом растительном экстракте,

поскольку они лишь частично сокращаются при расчёте соотношений концентраций компонентов.

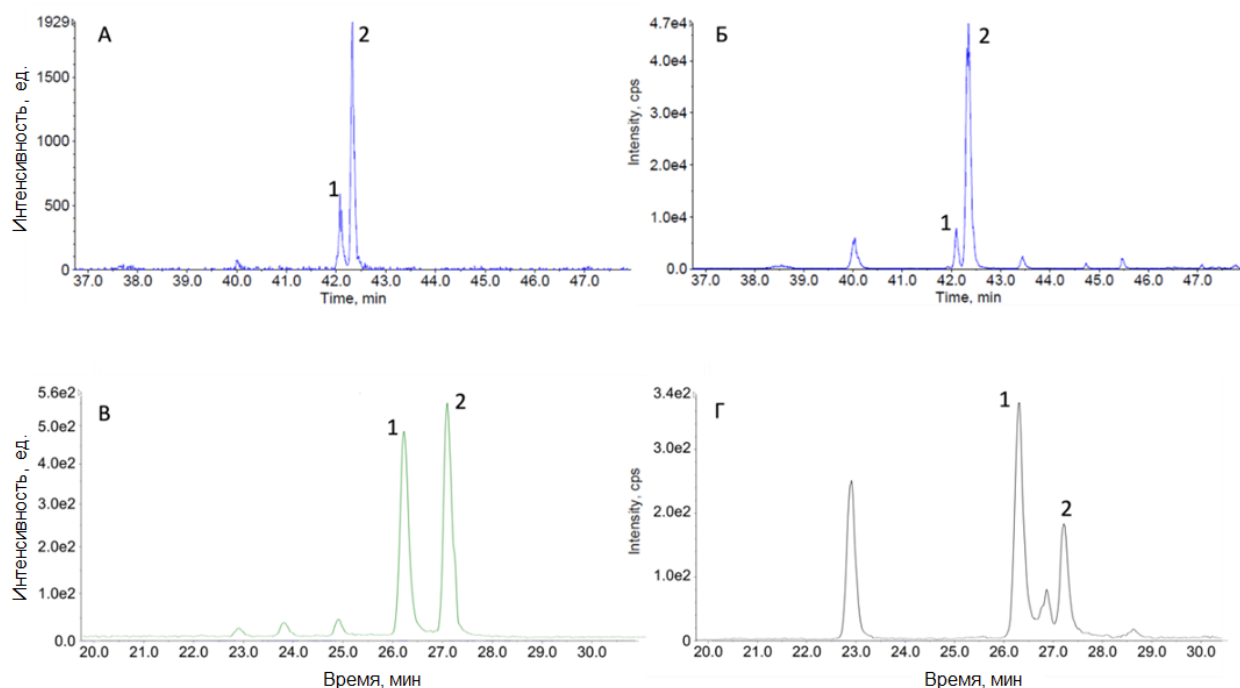


Рисунок 3.14 – Хроматограммы экстрактов различных растений, содержащих маркеры качества. А. Экстракт *Ocimum basilicum*. Пики: (1) акацетин, (2) изоакацетин. Б. Экстракт *Rosmarinus officinalis*. Пики: (1) акацетин, (2) изоакацетин. В. Экстракт *Geranium pratense*. Пики: (1) кверцетин-7-глюкозид, (2) кверцетин-3-глюкозид. Г. Экстракт *Matricaria chamomilla*. Пики: (1) кверцетин-7-глюкозид, (2) кверцетин-3-глюкозид.

В данной части работы соотношение этих маркеров не было изучено на наборе, состоящем из биологических повторностей каждого вида, и показана лишь потенциальная возможность использования такого подхода к идентификации экстрактов. Такую базу данных маркеров качества можно расширить, чтобы получить возможность всесторонней оценки растительных компонентов в растительных продуктах и пищевых добавках, но для этого необходимо также использовать более сложные подходы на основе хемометрических методов обработки данных анализа большой группы образцов.

3.2 Выводы к главе 3

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. Отдельно были рассмотрены характеристические и уникальные биомаркеры, обнаружение которых однозначно свидетельствует о

присутствии в составе образца растения определенного вида или рода, и маркеры качества – более распространенные компоненты, которые встречаются в разных видах растений. Показано, что соотношения содержаний маркеров качества могут сильно отличаться, что дает возможность контролировать качество сырья, в сравнении с эталонным составом. Выбранные условия ВЭЖХ-МС/МС определения 52 биомаркеров для 30 распространенных лекарственных растений удалось унифицировать для упрощения проведения скрининговых анализов. Метрологические характеристики разработанных методик соответствуют приемлемым значениям [314]. Однако, ограниченный линейный диапазон и необходимость проводить градуировку прибора непосредственно в день проведения измерений увеличивают трудоемкость анализа (необходимо также подбирать разбавление экстракта, так как разные компоненты сильно отличаются по уровню содержаний). 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 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 МАТЕРИАЛОВ⁵

Описание проблемы. Постановка задачи. Отдельной задачей при групповой идентификации и определении компонентов растительного сырья является их извлечение из твердой матрицы образца. Для этого применяют жидкость-жидкостную, твердофазную ультразвуковую и другие виды экстракции. 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 может быть рекомендовано использование различных видов экспериментального дизайна для оптимизации трудозатрат. Разработка таких способов извлечения должна проводиться с учетом группового состава извлекаемой фракции. Также возможна проверка таких способов с помощью метода «введено-найдено», однако следует учитывать, что этот метод не позволяет корректно оценивать степень извлечения определяемых соединений из твердых растительных материалов. Вместо этого для оценки суммарного содержания того или иного соединения используют длительную экстракцию в аппарате Сокслета (ЭС) или многократную последовательную жидкостную экстракцию выбранным растворителем в выбранных условиях. В рамках целевого подхода такую суммарную концентрацию можно определить с использованием индивидуальных стандартных образцов, и далее оценивать степень извлечения на всех стадиях выбора условий экстракции для достижения близкого к количественному извлечения целевых

⁵ При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi 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%; Sarvin B., Fedorova E., Shpigun O., Titova M., Nikitin M., Kochkin D., Rodin I., Stavrianidi 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%; Sarvin B.A., Seregin A.P., Shpigun O.A., Rodin I.A., Stavrianidi 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%; Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Zlobin I.E., Sarvin B.A., Stavrianidi 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%; Zlobin I.E., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Sarvin B.A., Stavrianidi 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%.

соединений. В рамках группового подхода можно использовать разные по своим свойствам (например, полярности) реперные соединения из одной группы для выбора общих условий для извлечения всей целевой группы соединений.

4.1 Извлечение стероидных сапонинов из якорцев стелющихся

Стероидные сапонины представляют собой многочисленный класс соединений, встречающийся в разных растениях. Обычно эти соединения делят на группы в зависимости от типа остова молекулы – агликона, например гликозиды диосгенина, гликозиды тигогенина и т.д. Кроме того, в зависимости от циклической или открытой формы боковой цепи их подразделяют на фуростаноловые и спироستانоловые гликозиды, по аналогии с их общими предшественниками – спиростаном и фуростаном.

Для разработки группового способа извлечения стероидных сапонинов было исследовано влияние различных факторов при жидкостной экстракции на примере двух, коммерчески доступных, реперных соединений – диосцина и протодиосцина (рис. 4.1).

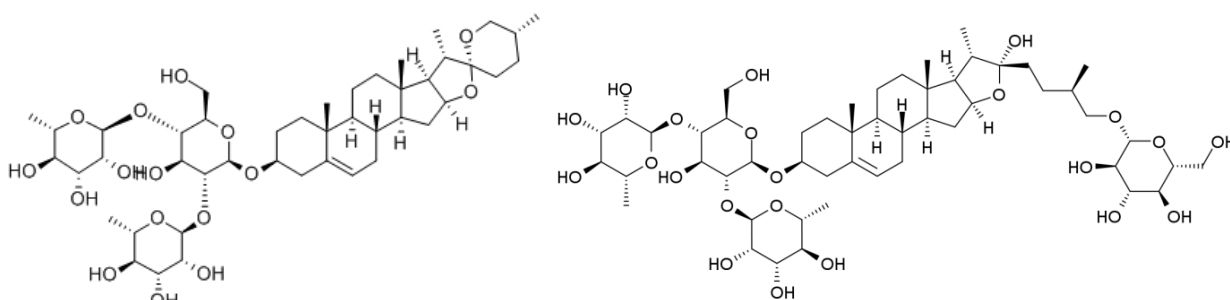


Рисунок 4.1 – Структуры диосцина (слева) и протодиосцина (справа).

Для оптимизации условий экстракции решено использовать два экспериментальных дизайна:

- Однофакторный эксперимент – фиксированы все параметры, кроме того, чье влияние изучается;
- Двухфакторный эксперимент – фиксированы все параметры, кроме двух, чье влияние изучается.

Было изучено влияние следующих параметров:

- Однофакторный эксперимент УЗЭ: состав экстрагирующего растворителя: метанол, этанол, изопропанол и ацетонитрил; соотношение фаз при экстракции (50-400 мл/г); содержание изопропанола и ацетонитрила (30-100%); длительность экстракции (15-120 мин);

- Однофакторный эксперимент ЭКР: состав экстрагирующего растворителя: изопропанол и ацетонитрил; соотношение фаз при экстракции (50-400 мл/г); содержание изопропанола (30-80%);
- Двухфакторный эксперимент ЭКР, ЭКРПД: длительность экстракции (30-240 мин), температура экстракции (35, 55 и 92 °С);
- Однофакторный эксперимент ЭС: длительность экстракции (4, 8, 12, 18, 24 ч).

4.1.1 Извлечение стероидных сапонинов в условиях ультразвуковой экстракции

Ультразвуковое излучение способствует более эффективному проникновению растворителя в растительную клетку и повышению скорости массопереноса. Также при интенсивной ультразвуковой обработке возможно разрушение клеточных мембран, что облегчает экстракцию содержимого клеток. Поэтому УЗЭ способствует более полному и эффективному извлечению определяемых веществ [109,315].

Выбор растворителя для экстракции. 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 [316,317].

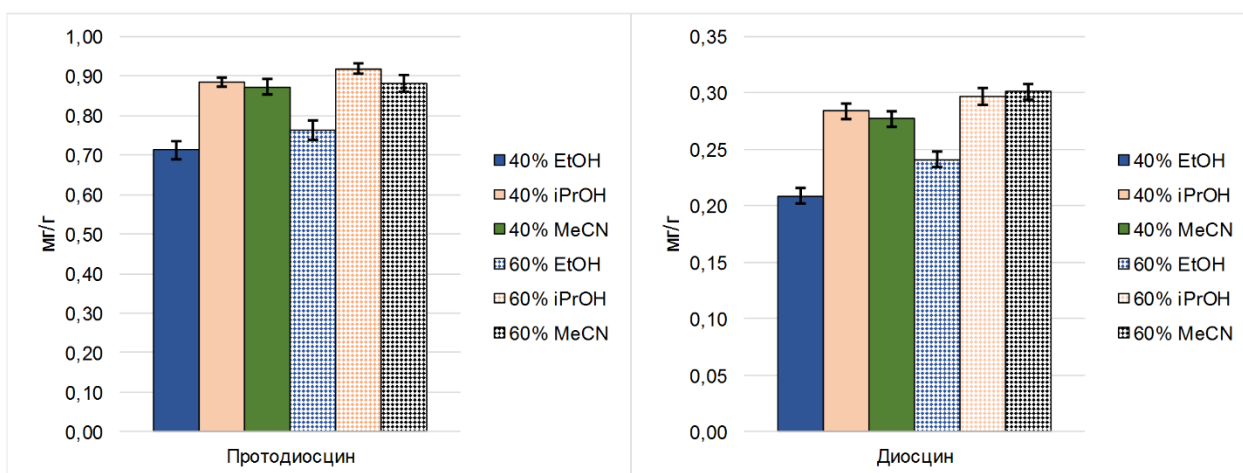


Рисунок 4.2 – Влияние органических растворителей (этанол, изопропанол, ацетонитрил) в составе экстрагента на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*.

Фиксированные параметры экстракции: концентрация растворителя - 40 и 60%; длительность экстракции - 60 мин; соотношение фаз - 100 мл/г; температура - 30°C.

Обычно для извлечения стероидных сапонинов из растений используют водный раствор этанола ввиду его низкой токсичности и экономической доступности. В ходе работы для изучения влияния типа органического растворителя в составе экстрагента на полноту извлечения стероидных сапонинов были выбраны

различные растворители (метанол, этанол, изопропанол и ацетонитрил), в то время как другие условия экстракции фиксировались: концентрация растворителя (40%, 60%), отношение фаз при экстракции, 100 мл/г, время ультразвукового воздействия, 60 минут и температура, 30°C. Как показано на рисунке 4.2, изопропанол и ацетонитрил обеспечивают максимальный выход протодиосцина и диосцина. Поэтому они выбраны в качестве основных компонентов органического растворителя для последующего исследования. Метанол не использовали для дальнейшей оптимизации условий экстракции, поскольку протодиосцин вступал в реакцию метилирования, и его определение было невозможным [316].

Выбор соотношения фаз при экстракции. Во многих работах отмечено [318], что большее количество растворителя по отношению к растительному материалу способствует более полному извлечению определяемых соединений.

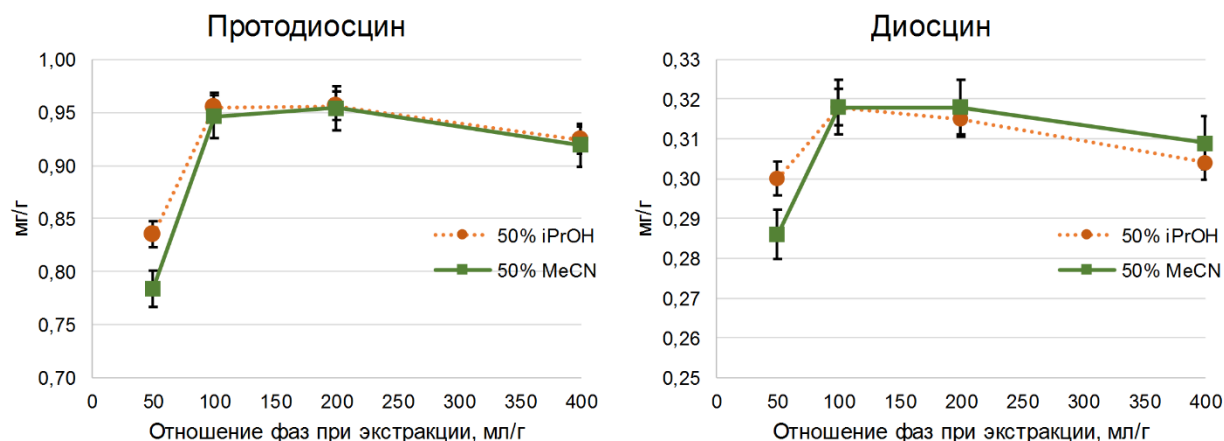


Рисунок 4.3 – Влияние отношения фаз на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиксированные параметры экстракции: концентрации изопропанола и ацетонитрила - 50%; длительность экстракции - 60 мин; температура - 30°C.

Влияние соотношения фаз при экстракции на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* исследовали при четырех отношениях в диапазоне от 50 мл/г до 400 мл/г (фиксированные параметры экстракции: концентрация органического растворителя, 50%, длительность экстракции, 60 мин, температура, 30 °C). Как показано на рисунке 4.3, степень извлечения протодиосцина и диосцина повышается с увеличением отношения фаз до 100 мл/г и затем практически не изменяется при более высоких соотношениях. Следовательно, оптимальное отношение фаз при экстракции - 100 мл/г, т.к. в таком случае необходимо использовать минимальное количество органических растворителей.

Выбор соотношения компонентов растворителя. Растворы изопропанола и ацетонитрила с концентрациями от 30% до 100% использованы для изучения влияния содержания органического растворителя в экстрагенте на эффективность экстракции, другие параметры экстракции зафиксированы: отношение фаз при экстракции, 100 мл/г; длительность экстракции, 60 мин и температура, 30°C. Как можно увидеть в таблице 4.1, 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 с 60%.

Таблица 4.1 – Влияние различных условий УЗЭ на степень извлечения протодиосцина и диосцина

Условия экстракции	Извлечение анализа, мг/г (n = 3, P = 0.95)			
	Орг.растворитель – изопропанол		Орг.растворитель – ацетонитрил	
Влияние концентрации (%), орг.р-ля, (вода, %)	Протодиосцин	Диосцин	Протодиосцин	Диосцин
30(70)	0.54 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.22 ± 0.01
40(60)	0.85 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.90 ± 0.02	0.28 ± 0.01
50(50)	0.93 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.93 ± 0.02	0.30 ± 0.01
60(40)	0.88 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.31 ± 0.01
80(20)	0.73 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.31 ± 0.01
100(0)	0.41 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Длительность экстракции, мин *				
15	0.52 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.23 ± 0.01
30	0.78 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.28 ± 0.01
45	0.96 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.88 ± 0.02	0.31 ± 0.01
60	0.94 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.95 ± 0.02	0.32 ± 0.01
90	0.76 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.31 ± 0.01
120	0.66 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.32 ± 0.01

* фиксированные параметры экстракции: постоянная концентрация органического растворителя изопропанола и ацетонитрила - 50%; отношение фаз при экстракции - 100 мл/г; температура - 30°C.

Данные результаты хорошо согласуются с принципом подобия, если полярность растворителя и растворенного вещества близки, вещество легко переходит в раствор из растительных клеток [317,318]. 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%; отношение фаз при экстракции, 100 мл/г и температура, 30°C. Как показано в таблице 4.1, степень извлечения значительно увеличивается за первые 60 мин УЗЭ. Время экстракции свыше 60 мин приводит к разложению протодиосцина, поэтому наблюдается уменьшение содержания его в экстракте. Разложения диосцина под действием ультразвука не происходит. Следовательно, оптимальная длительность экстракции для дальнейших экспериментов – 60 мин.

Последовательная УЗЭ. Для оценки полноты экстракции использовали способ последовательного экстрагирования. Суть этого способа заключалась в том, что после первого экстракционного акта экстрагент отфильтровывали от растительного материала, а к растительному материалу добавляли новую порцию чистого экстрагента и процедуру экстракции повторяли. Экстракцию проводили с параметрами, оптимизированными ранее: концентрация изопропанола (ацетонитрила), 50%; время воздействия ультразвука, 60 мин; температура, 30°C и отношение 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 ($1,20 \pm 0,04$ мг/г) и 67,0%, 18,6%, 9,0%, 3,8% и 0,7% от общего количества диосцина ($0,47 \pm 0,03$ 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 ($1,19 \pm 0,04$ мг/г) и 64,5%, 19,9%, 10,3%, 3,8% и 0,6% от общего количества диосцина ($0,49 \pm 0,02$ 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 общего содержания анализов, полученных в ходе 5 актов экстракции.

4.1.2 Экстракция стероидных сапонинов в кипящем растворителе при нормальном и пониженном давлении

По результатам, полученным в ходе оптимизации условий УЗЭ решено использовать изопропанол и ацетонитрил в качестве органических растворителей в составе экстрагента для ЭКР и ЭКРПД.

Влияние органического растворителя на эффективность ЭКР. Изучено влияние органических растворителей (изопропанола и ацетонитрила) в составе экстрагента на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Как показано на рисунке 4.4, изопропанол в составе экстрагента обеспечивает большую степень извлечения анализов, чем экстрагент на основе ацетонитрила. Поэтому в последующих экспериментах использовали изопропанол.

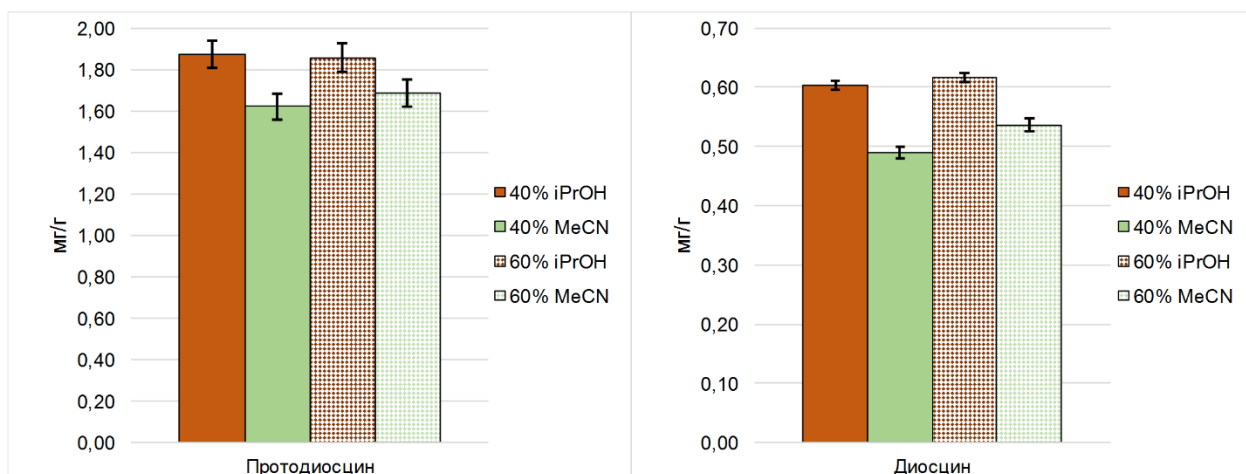


Рисунок 4.4 – Влияние органических растворителей (изопропанол, ацетонитрил) на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиксированные параметры экстракции: концентрация растворителя - 40 и 60%; длительность экстракции - 60 мин; отношение фаз - 200 мл/г; температура - 92°C для изопропанола и 86°C для ацетонитрила.

Влияние соотношения фаз при экстракции на эффективность ЭКР. При исследовании влияния отношения фаз при экстракции на полноту извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* варьировали соотношения (50, 100, 200, 400 мл/г). Другие условия экстракции фиксировали следующим образом: концентрация изопропанола - 50%; длительность экстракции - 60 мин; температура - 92°C. Как можно видеть из данных, представленных в таблице 4.2, отношение фаз, равное 200 мл/г, обеспечивает наибольшее извлечение протодиосцина и диосцина. Поэтому решено проводить дальнейшие исследования по оптимизации условий

экстракции методами ЭКР, ЭКРПД и ЭС с отношением фаз при экстракции – 200 мл/г.

Таблица 4.2 – Влияние различных условий ЭКР на степень извлечения протодиосцина и диосцина

Условия экстракции	Извлечение анализа, мг/г (n = 3, P = 0.95)	
	Протодиосцин	Диосцин
Соотношение фаз при экстракции, мл/г		
50	1.28 ± 0.05	0.41 ± 0.02
100	1.72 ± 0.05	0.54 ± 0.01
200	1.90 ± 0.06	0.62 ± 0.01
400	1.81 ± 0.05	0.59 ± 0.01
Содержание орг. р-ля в экстрагенте, %*	Протодиосцин	Диосцин
30	1.74 ± 0.06	0.45 ± 0.01
40	1.87 ± 0.05	0.60 ± 0.01
50	1.90 ± 0.05	0.61 ± 0.01
60	1.86 ± 0.05	0.62 ± 0.01
80	1.71 ± 0.06	0.59 ± 0.01

* другие параметры экстракции: отношение фаз при экстракции - 200 мл/ г; длительность экстракции - 60 мин; температура - 92°C.

Влияние концентрации изопропанола на эффективность ЭКР. Для исследования влияния содержания изопропанола в экстрагенте на эффективность экстракции стероидных сапонинов из *T. terrestris* варьировали концентрацию изопропанола от 30% до 80%, другие параметры экстракции фиксировали: отношение фаз при экстракции, 200 мл/г; длительность кипячения с обратным холодильником, 60 мин и температура, 92°C. Как видно из таблицы 4.2, извлечение протодиосцина меняется от 1.71 ± 0.06 до 1.90 ± 0.05 мг/г, при различной (30% - 80%) концентрации изопропанола. Максимальная степень извлечения протодиосцина наблюдается в 50% растворе изопропанола. Оптимальный диапазон содержания изопропанола в экстрагенте для извлечения диосцина составляет от 50% до 80%, при котором извлечение диосцина варьируется от 0.59 ± 0.01 мг/г до 0.62 ± 0.01 мг/г. 30% раствор позволяет выделить лишь 0.46 ± 0.01 мг/г диосцина. Это объясняется более слабой полярностью диосцина по сравнению с протодиосцином. В последующих экспериментах использовали 50% раствор изопропанола.

Влияние времени экстрагирования и температуры на эффективность ЭКР и ЭКРПД. Возможность разложения целевых соединений под действием высоких

температур является основным недостатком метода ЭКР. ЭКРПД позволяет экстрагировать вещество при 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.

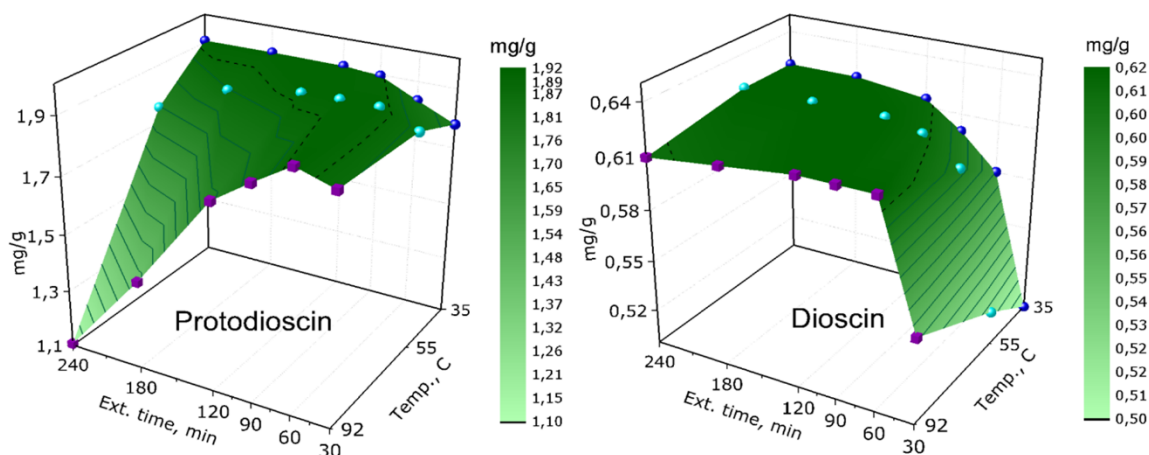


Рисунок 4.5 – Влияние длительности экстракции и температуры на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиолетовый маркер - метод ЭКР (температура экстракции: 92°C); Голубой маркер - метод ЭКРПД (температура экстракции - 55°C); Синий маркер - метод ЭКРПД (температура экстракции - 35°C). Фиксированные параметры экстракции: концентрация изопропанола - 50%; отношение фаз - 200 мл/г.

Как видно из рисунка 4.5, 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.

Последовательное экстрагирование в вариантах ЭКР и ЭКРПД. При последовательной экстракции использовали следующие условия:

- ЭКР: концентрация изопропанола в экстрагенте, 50%; длительность экстракции, 60 мин; температура 92°C; отношение фаз при экстракции, 200 мл/г;

- ЭКРПД: концентрация изопропанола, 50%; длительность экстракции, 90 мин; температура 55°C; отношение фаз при экстракции, 200 мл/г;
- ЭКПРД: концентрация изопропанола, 50%; длительность экстракции - 120 мин; температура 35°C; отношение фаз при экстракции, 200 мл/г.

Во всех трех случаях на 2 и 3 стадиях экстракции протодиосцин и диосцин не обнаружены, что говорит о полноте извлечения анализов, следовательно, для количественной оценки содержаний целевых соединений в растительном материале *T. terrestris* достаточно проведения однократной экстракции.

4.1.3 Экстракция стероидных сапонинов в аппарате Сокслета

Основным преимуществом экстракции в аппарате Сокслета является ее многократность, поскольку в емкость с образцом поступает сконденсированный чистый растворитель, перенося извлекаемые соединения в колбу, установленную ниже, каждый раз, когда объем растворителя доходит до определенного уровня. К недостаткам же можно отнести то, что извлекаемые компоненты постоянно находятся в кипящем растворителе, в то время как сама экстракция проходит при более низкой температуре, т.е. в отличие от ЭКР увеличение эффективности экстракции при повышенной температуре не компенсирует возможные потери от термического разложения извлекаемых веществ.

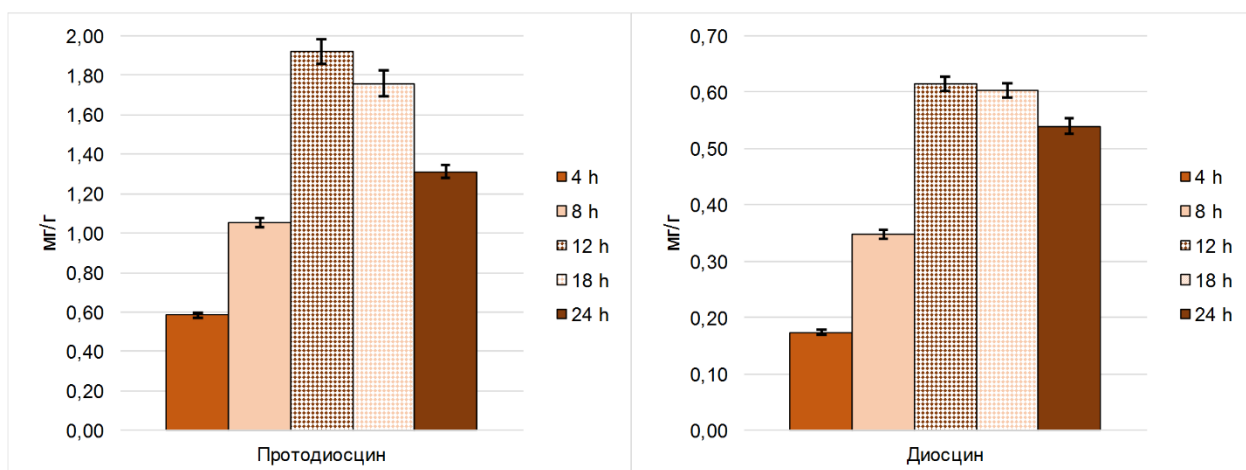


Рисунок 4.6 – Влияние длительности экстракции на степень извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Фиксированные параметры экстракции: концентрация изопропанола - 91%; отношение фаз - 200 мл/г; температура - 82°C.

Влияние времени экстрагирования на эффективность ЭС. Длительная экстракция приводит к разложению протодиосцина при кипячении с обратным холодильником. Для экстракции решено повысить количество органической фазы в

экстрагенте для понижения температуры кипения до 82°C. Условия экстракции: концентрация изопропанола 91% и температура 82°C, отношение фаз при экстракции, 200 мл/г.

Для изучения влияния длительности экстракции на извлечение стероидных сапонинов из *T. terrestris* варьировали продолжительность экстракции (4, 8, 12, 18 и 24 часа). Как показано на рисунке 4.6, оптимальное время экстракции составляет 12 часов. За этот период обеспечивается максимальное извлечение определяемого вещества (1.91 ± 0.08 мг/г для протодиосцина и 0.62 ± 0.01 мг/г для диосцина).

4.1.3 Сравнение различных техник для экстрагирования стероидных сапонинов

Проведено сравнение техник экстрагирования с оптимизированными параметрами. Для извлечения целевых соединений использовали методы УЗЭ, ЭКРПД, ЭКР, ЭС. Как видно из таблицы 4.3, воспроизводимость результатов, полученных методами УЗЭ и ЭКРПД оказывается выше, чем для ЭКР и ЭС, в связи с термической нестабильностью протодиосцина. Воспроизводимость результатов извлечения диосцина для всех четырех методов приблизительно одинакова.

Таблица 4.3 – Проверка правильности методом «введено-найдено» для экстракции протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* с использованием методов УЗЭ, ЭКР, ЭКРПД, ЭС

Условия\Метод	УЗЭ	ЭКРПД		ЭКР	ЭС
Растворитель изопропанол, %	50	50		50	91
Отношение фаз при экстракции, мл/г	100	200	200	200	200
Длительность экстракции, мин	60	120	90	60	720
Экстракционная температура, °C	30	35	55	92	82
Точность $\pm$ воспроизводимость, % ($n = 3$, $P = 0.95$)					
Протодиосцин	99 ± 2	99 ± 2	98 ± 2	97 ± 3	97 ± 4
Диосцин	98 ± 3	98 ± 2	99 ± 2	98 ± 2	99 ± 4

Как показано на рисунке 4.7, степень извлечения протодиосцина и диосцина методами ЭКР, ЭКРПД и ЭС была приблизительно в 2 раза выше, чем на первом акте УЗЭ и более чем в 1.2 раза выше, чем общее содержание анализов, полученных в ходе 5 актов УЗЭ. Кроме того, ЭКР может значительно сократить время экстракции (60 мин) по сравнению с методом Сокслета (12 ч) при одинаковом извлечении

целевых соединений, и этот способ не требует наличия вакуумного оборудования, в отличие от ЭКРПД.

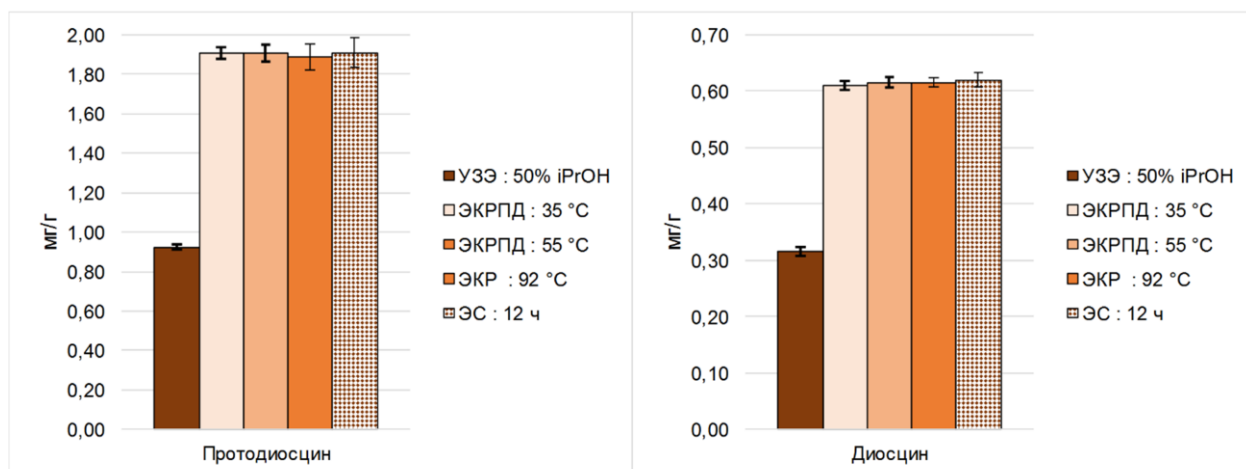


Рисунок 4.7 – Сравнение методов УЗЭ, ЭКР, ЭКРПД и ЭС по степени извлечения протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*. Условия УЗЭ: соотношение фаз - 100 мл/г; длительность экстракции - 60 мин; температура - 30°C. Условия ЭКР: соотношение фаз - 200 мл/г; длительность экстракции - 60 мин; температура - 92°C. Условия ЭКРПД: концентрация изопропанола - 50%; соотношение фаз - 200 мл/г; длительность экстракции - 120 мин (35°C) и 90 мин (55°C). Условия ЭС: соотношение фаз - 200 мл/г; длительность экстракции - 12 ч; температура - 82°C.

Таким образом, ЭКР является наиболее эффективным методом для количественной экстракции протодиосцина и диосцина из *T. terrestris*.

В лекарственных целях часто, но не исключительно, используют плоды растения *T. terrestris*, однако другие надземные части этого растения также богаты стероидными сапонинами [319]. 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 (таблица 4.4).

*Таблица 4.4 – Проверка применимости разработанного подхода для экстракции протодиосцина и диосцина из *T. terrestris* с использованием метода ЭКР (n=5, P=0.95)*

Тип материала	Протодиосцин, мг/г (экстракция 1–3)	Диосцин, мг/г (экстракция 1–3)
Листья	1.90 ± 0.05 ; < ПО; < ПО	0.62 ± 0.02 ; < ПО; < ПО
Стебли	0.60 ± 0.04 ; < ПО; < ПО	0.44 ± 0.01 ; < ПО; < ПО
Плоды	0.84 ± 0.08 ; < ПО; < ПО	0.32 ± 0.02 ; < ПО; < ПО

На втором и третьем акте экстракции протодиосцин и диосцин не были обнаружены, что указывало на полноту извлечения на первом акте экстракции. Таким образом, разработанный способ ЭКР в выбранных оптимальных условиях может быть далее использован для последующего определения стероидных сапонинов в различных образцах растительных материалов *T. terrestris*.

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

Как было показано в предыдущем разделе, УЗЭ не подходит для экстрагирования стероидных сапонинов из растения *T. terrestris*. Предположено, что это может быть связано с наличием механических тканей в растении и решено провести сравнительный эксперимент на другом растении с клеточной культурой, полученной из данного растения и не обладающей механическими тканями. В данной работе был использован статистический экспериментальный дизайн Тагучи на основе латинского квадрата для оптимизации метода УЗЭ, для проверки использованы такие приемы как последовательное экстрагирование и метод ЭКР.

4.2.1 Оптимизация параметров экстрагирования стероидных сапонинов в условиях ультразвуковой экстракции

В качестве количественной характеристики эффективности экстрагирования использовался параметр D_n , для двух соединений – протодиосцина и диосцина, рассчитанный по формуле (4.1).

$$D_n = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n d_i} \quad (4.1)$$

где D_n общее-относительное содержание экстрагируемых аналитов, d относительное количество в % от максимального для каждого аналита, измеренного в ходе всех экспериментов по оптимизации в рамках данного статистического экспериментального дизайна, n количество аналитов. Данный параметр позволяет провести оптимизацию, одинаково учитывая степень извлечения для каждого аналита независимо от количественного содержания его в пробе.

Выбор оптимального растворителя в составе экстрагента. На первом этапе оптимизации метода УЗЭ произведен выбор оптимального органического растворителя в составе экстрагента. Во избежание грубой ошибки решено провести двухфакторный эксперимент на следующих уровнях концентраций: 25, 50 и 75%,

следующих органических растворителей в составе экстрагента: этанол, изопропанол и ацетонитрил.

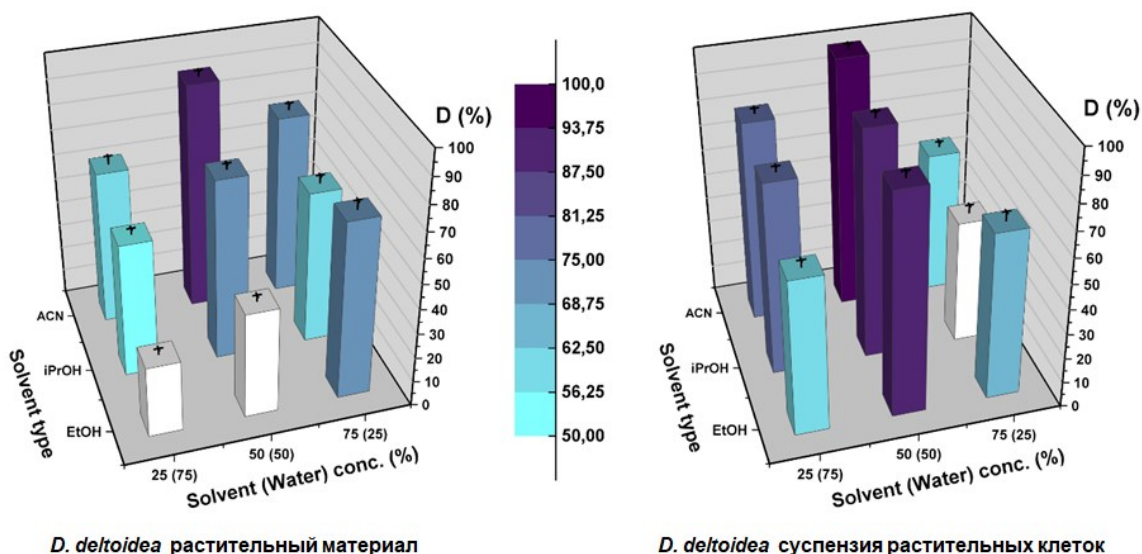


Рисунок 4.8 – Выбор оптимального растворителя для УЗЭ для извлечения стероидных сапонинов из растения и клеточной культуры *D. deltoidea*. Растворители: этанол, изопропанол, ацетонитрил. Уровни концентраций: 25, 50, 75%.

Как можно видеть из рисунка 4.8, оптимальным растворителем является ацетонитрил, как для клеточной культуры, так и для интактного растения *D. deltoidea*. В данном эксперименте следующие параметры были фиксированы: длительность экстрагирования - 60 мин, отношение фаз - 100 мл/г.

4.2.2 Оптимизация параметров экстрагирования с применением статистического экспериментального дизайна

На данном этапе работы произведена оптимизация следующих параметров экстрагирования: продолжительность экстрагирования, концентрация ацетонитрила в экстрагенте и соотношение фаз при экстрагировании. Для оптимизации был использован статистический экспериментальный дизайн Тагучи L_{16} (4^3) на основе латинского квадрата латинского квадрата 4×4 . В таблице 4.5 представлен план эксперимента. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 4.6. Из полученных данных следует, что оптимальные параметры экстрагирования для клеточной культуры и интактного растения различны. Так, установлены следующие оптимальные значения:

- для суспензионной клеточной культуры *D. deltoidea*: продолжительность экстрагирования – 60 мин, концентрация ацетонитрила – 50%, отношение фаз при экстрагировании – 400 мл/г;

- для растительного материала *D. deltoidea*: продолжительность экстрагирования – 90 мин, концентрация ацетонитрила – 50%, отношение фаз при экстрагировании – 400 мл/г.

Таблица 4.5 – Факторы и уровни для статистического экспериментального дизайна Тагучи $L_{16}(4^3)$ для оптимизации метода УЗЭ извлечения стероидных сапонинов

Уровень	Фактор		
	(А) длительность экстрагирования, мин	(В) концентрация ацетонитрила в экстрагенте, %	(С) отношение фаз при экстрагировании, мл/г
1	30	30	50
2	60	50	100
3	90	70	200
4	120	90	400

Таблица 4.6 – Результаты оптимизации параметров экстрагирования с использованием статистического экспериментального дизайна Тагучи $L_{16}(4^3)$ для оптимизации метода УЗЭ извлечения стероидных сапонинов

№	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

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 D_2 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. Для полученных данных был проведен дисперсионный анализ, его результаты приведены в таблице 4.7.

Таблица 4.7. – Дисперсионный анализ оптимизации параметров экстрагирования с использованием статистического экспериментального дизайна Тагучи $L_{16} (4^3)$ для оптимизации метода УЗЭ извлечения стероидных сапонинов

Фактор	Растительный материал <i>D. deltoidea</i>					Клеточная культура <i>D. deltoidea</i>				
	SS	df	σ	F	p^*	SS	df	σ	F	p
(А)	4166.4	3	1388.8	35.1	0.0003	195.9	3	65.3	3.7	0.0801
(В)	805.5	3	268.5	6.8	0.0234	111.9	3	37.3	2.1	0.1982
(С)	1890.4	3	630.1	15.9	0.0029	2729.4	3	909.8	51.9	0.0001
Ошиб.	237.1	6	39.5			105.3	6	17.5		
Общ.	7099.4	15	473.3			3142.5	15	209.5		

* жирным отмечены значимые р-значения

Как можно видеть из представленных расчетов важными для оптимизации параметрами экстрагирования при извлечении стероидных сапонинов методом УЗЭ из интактного растения являются все факторы, для которых проводилась оптимизация, об этом можно судить по высокому значению параметра F , в то время как параметр p говорит о достоверности полученных данных. Однако стоит отметить, что для извлечения стероидных сапонинов из клеточной культуры единственный важный фактор экстрагирования – это соотношение фаз при экстрагировании, а столь большое значение F количественно показывает высокую важность данного фактора в процессе оптимизации.

4.2.3 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 (рис. 4.9).

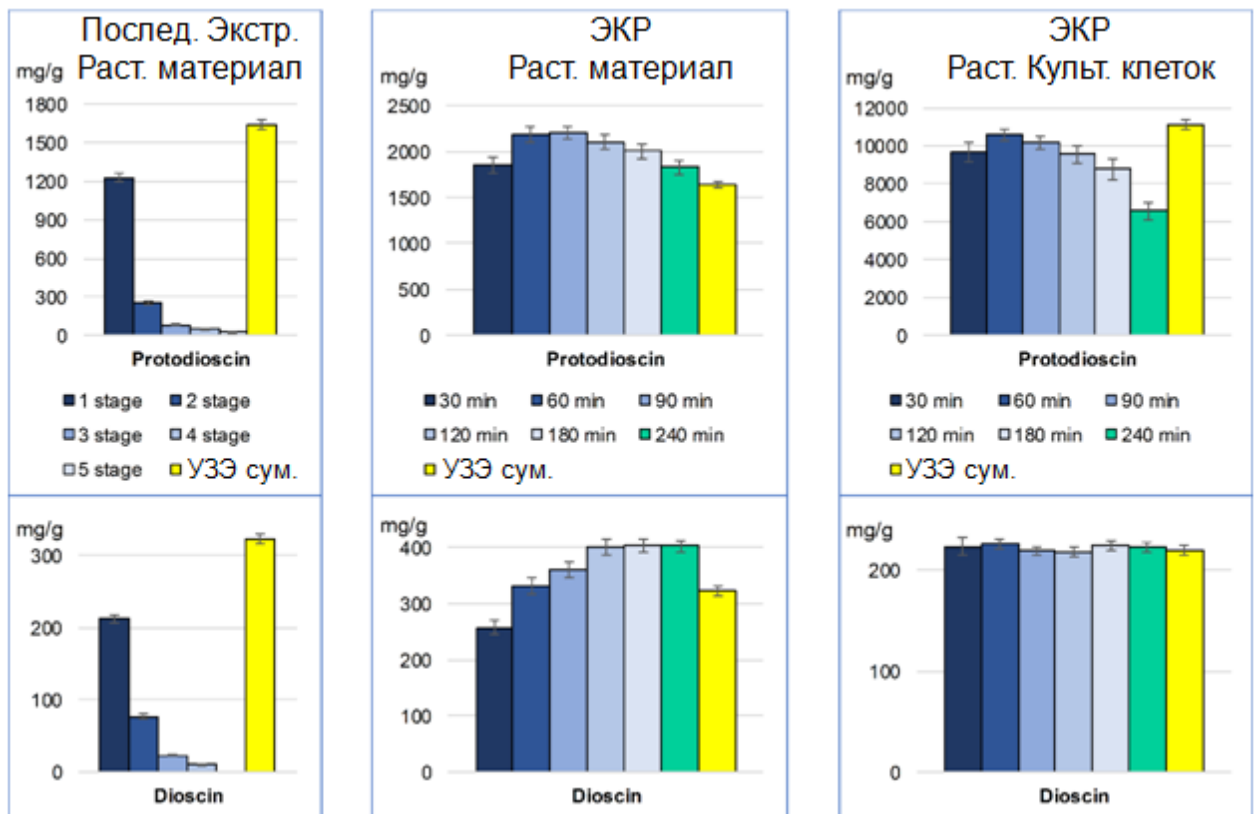


Рисунок 4.9 – Результаты последовательного экстрагирования и ЭКР (в сравнении с УЗЭ) для извлечения стероидных сапонинов из растения и клеточной культуры *D. deltoidea*.

В ходе данного эксперимента были использованы параметры экстрагирования, полученные ранее. 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 предположение, сделанное ранее о том, что метод УЗЭ не позволяет добиться полного извлечения аналитов из растительного материала. Предположение о том, что причиной тому может быть наличие механических тканей в растительном материале также подтверждается, 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 ПО аналитического метода, диосцин же полностью извлекается на первом экстракционном акте (общее содержание – 220 ± 25 мкг/г). Данные результаты показывают, что использование статистического экспериментального дизайна на основе латинского квадрата оправдано для решения задачи оптимизации параметров экстрагирования метода УЗЭ жидкостного экстрагирования из твердых матриц.

Ранее было показано, что метод ЭКР позволяет добиться полного извлечения стероидных сапонинов даже из растительного материала, поэтому решено использовать данный метод как референтный. В ходе данного эксперимента фиксировались следующие параметры экстрагирования: концентрация ацетонитрила в экстрагенте – 50%, отношение фаз при экстрагировании – 400 мл/г, температура экстрагирования – 90 °С. Длительность экстрагирования варьировалась от 30 до 240 мин.

Результаты данного эксперимента приведены на рисунке 4.9. Как и ранее можно отметить термическое разложение протодиосцина при длительном экстрагировании. Также нельзя не 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 «подтверждающих» 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.

4.3 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 сильно полярные органические растворители. Хроматографическое разделение сахаров и сахароспиртов удобно проводить в условиях гидрофильной хроматографии, что позволяет эффективно сочетать эти стадии с последующим МС детектированием с ЭРИ в спрее с высоким содержанием ацетонитрила.

4.3.1 Выбор условий ВЭЖХ-МС определения сахаров и сахароспиртов

Метод ЭРИ-МС идеально подходит для определения высокополярных аналитов, таких как сахара и сахароспирты. Оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования были выбраны путем прямого введения индивидуальных стандартных растворов аналитов (5 мг/мл в 50%-ом ацетонитриле). Депротонирование гидроксильных групп сахаров и сахароспиртов в условиях ЭРИ протекает гораздо легче, чем протонирование. Таким образом, их

депротонированные молекулы $[M-H]^-$ использовали в качестве ионов-предшественников в режиме МЗР. Установленные параметры обнаружения для каждого анализа перечислены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Параметры МС детектирования сахаров и сахароспиртов

Соединение	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	ПД, В	ВП, В	ЭС, В
эритритол	121	59	-30	-8	-30
		89			-30
ксилитол, рибитол, арабитол	151	59	-30	-8	-25
		71			-25
рамноза	163	59	-30	-8	-30
		71			-30
инозитол	179	87	-40	-8	-10
		59			-25
сорбитол, маннитол, дульцитол	181	59	-40	-8	-30
		71			-30
пинитол, секвоитол	193	59	-40	-8	-30
		161			-12
мальтитол	343	89	-30	-10	-50
		179			-10
фруктоза	179	89	-30	-8	-20
		59			-25
глюкоза	179	119	-30	-8	-10
		89			-20
сахароза, мальтоза, трегалоза	341	59	-40	-10	-55
		179			-18
раффиноза	503	59	-40	-10	-35
		179			-30

В выбранных условиях ионизации молекул арабинозы и ксилозы не происходит, что делает их определение невозможным. Это может быть связано с более низкой кислотностью ОН-группы в 5-м положении, вызванной наличием меньшего количества электроноакцепторных групп, расположенных рядом с ней, что приводит к более низкой стабильности депротонированных молекул этих сахаров.

Работа Эвана Хетрика (Evan Hetrick) [320] стала отправной точкой для выбора условий хроматографического разделения сахаров и сахароспиртов. Хроматографические колонки с цвиттер-ионной и амино-фазой обладают наилучшими возможностями для разделения этих соединений. В случае

использования amino-колонок подходящим элюентом является смесь ацетонитрила и воды, однако в серии экспериментов не удалось достичь полного разделения аналитов в режиме изократического элюирования. Однако было отмечено, что удовлетворительное разделение сахаров (рамноза, фруктоза и глюкоза) и сахароспиртов (эритритол, ксилитол, рибитол, арабитол, пинитол и секвоитол) достигается при концентрации ацетонитрила 94% в подвижной фазе. Дальнейшее увеличение концентрации ацетонитрила привело к значительному снижению чувствительности детектирования. Наилучшее разделение пиков для всех аналитов было достигнуто с использованием режима градиентного элюирования (рис. 4.10).

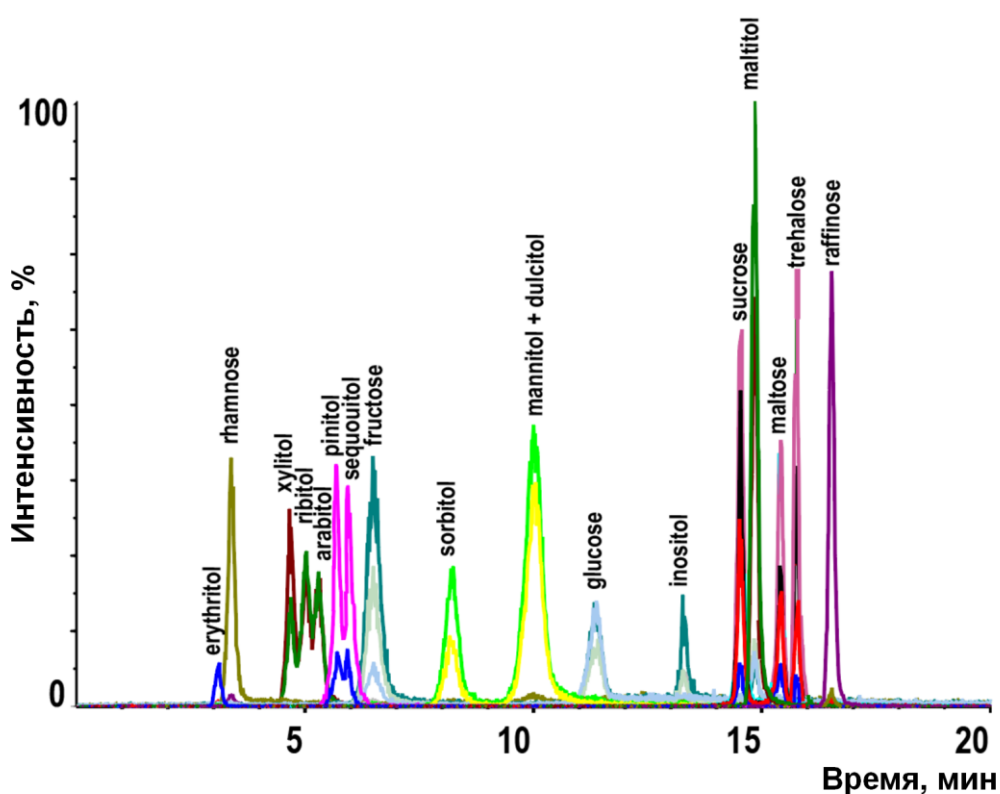


Рисунок 4.10 – Масс-хроматограмма смеси сахаров и сахароспиртов в режиме МЗР.

Уменьшение концентрации ацетонитрила в подвижной фазе привело к увеличению давления в хроматографической системе. Таким образом, было решено увеличить концентрацию воды в подвижной фазе до 60% после разделения аналитов при одновременном снижении скорости потока с 0.5 до 0.3 мл/мин, поскольку максимально допустимое давление для используемой хроматографической колонки составляло 100 Бар. Температура колонки 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 значительному улучшению разделения критических пар пиков.

Удерживание моносахаридов на гидрофильных неподвижных фазах связано с количеством гидроксильных групп. Вначале элюировались пентозы и дезоксигексозы, а затем гексозы. Порядок элюирования соответствует литературным данным [320–322] и соответствует типичному поведению сахаров в режиме гидрофильной хроматографии [323]. Точное время удерживания каждого соединения определяли путем хроматографирования индивидуальных стандартных растворов. Таким образом, было определено, что пики ксилитола, рибитола и арабитола, а также пики пинитола и секвоитола не были разделены до базовой линии, в тоже время маннитол и дульцитол имели одинаковое время удерживания. Использование модификаторов для изменения pH подвижной фазы (муравьиная и уксусная кислоты, аммиак и различные комбинации буферных растворов) не приводило к усилению ионизации, а только к ухудшению разрешения хроматографических пиков.

4.3.2 Оптимизация параметров экстрагирования с применением статистического экспериментального дизайна Тагучи L_9 (3^4)

Одной из основных задач количественного анализа была оптимизация параметров ультразвуковой экстракции, пригодных для выделения сахаров и сахароспиртов из листвы хвойных пород. Для лучшего понимания влияния каждого параметра экстракции была проведена оптимизация с помощью экспериментального дизайна ортогональных массивов Тагучи L_9 (3^4) для оптимизации следующих параметров (таблица 4.9): концентрация MeOH в экстрагирующем растворе, время экстракции, тип образца растения и температура экстракции.

Поскольку оптимизацию параметров экстракции необходимо проводить для всей группы соединений, а их количественное соотношение для каждого вида растений может сильно различаться, это изменение следует учитывать. Таким образом, необходимо воспользоваться разработанным подходом, рассчитав (4.1), групповой выход (D_n), который следует рассматривать как репрезентативную оценку эффективности процесса экстракции. Этот параметр позволяет оптимизировать любой параметр экстракции для всех веществ, используя

относительные содержания, чтобы получить эквивалентный вклад от каждого вещества в конечный результат.

Таблица 4.9 – Условия УЗЭ; Тагучи L_9 (3^4) ортогональный экспериментальный дизайн

№	Фактор			
	МеОН конц., % (Вода конц., %)	Длительность, мин	Тип образца	Температура, °С
1	0 (100)	15	I	30
2	0 (100)	30	II	60
3	0 (100)	45	III	90
4	30 (70)	15	II	30
5	30 (70)	30	III	60
6	30 (70)	45	I	90
7	60 (40)	15	III	30
8	60 (40)	30	I	60
9	60 (40)	45	II	90

Образец *Pinus sibirica* (№ 9 в таблице 2.2, п. 2.1) был использован для оптимизации параметров экстракции. Сахара и сахарные спирты являются полярными соединениями, поэтому полярный органический растворитель (МеОН) был выбран в качестве органического растворителя. Оптимизация проводилась для четырех параметров экстракции и трех свободных уровней (таблица 4.9). Для расчетов параметра D_9 использовали площади пиков эритритола, пинитола, фруктозы, сорбитола, глюкозы, инозитола, сахарозы, мальтозы и раффинозы. Результаты измерений, проведенных в соответствии с планом экспериментального дизайна ортогональных массивов Тагучи L_9 (3^4), показаны на рисунке 4.11 и резюмированы в таблице 4.9.

Полученные оптимальные условия УЗЭ: концентрация МеОН - 30% (вода - 70%), время экстракции - 30 мин, тип образца растений - II. Как видно из таблицы 4.10, температура при экстракции не является значимым параметром в этом диапазоне оптимизации. Экстракция дисахаридов была более эффективной при повышении температуры экстракции, тогда как эффективность экстракции раффинозы значительно снижалась при температуре 90°C, но выход сахарозы значительно увеличивался в тех же условиях, по-видимому, из-за разложения раффинозы.

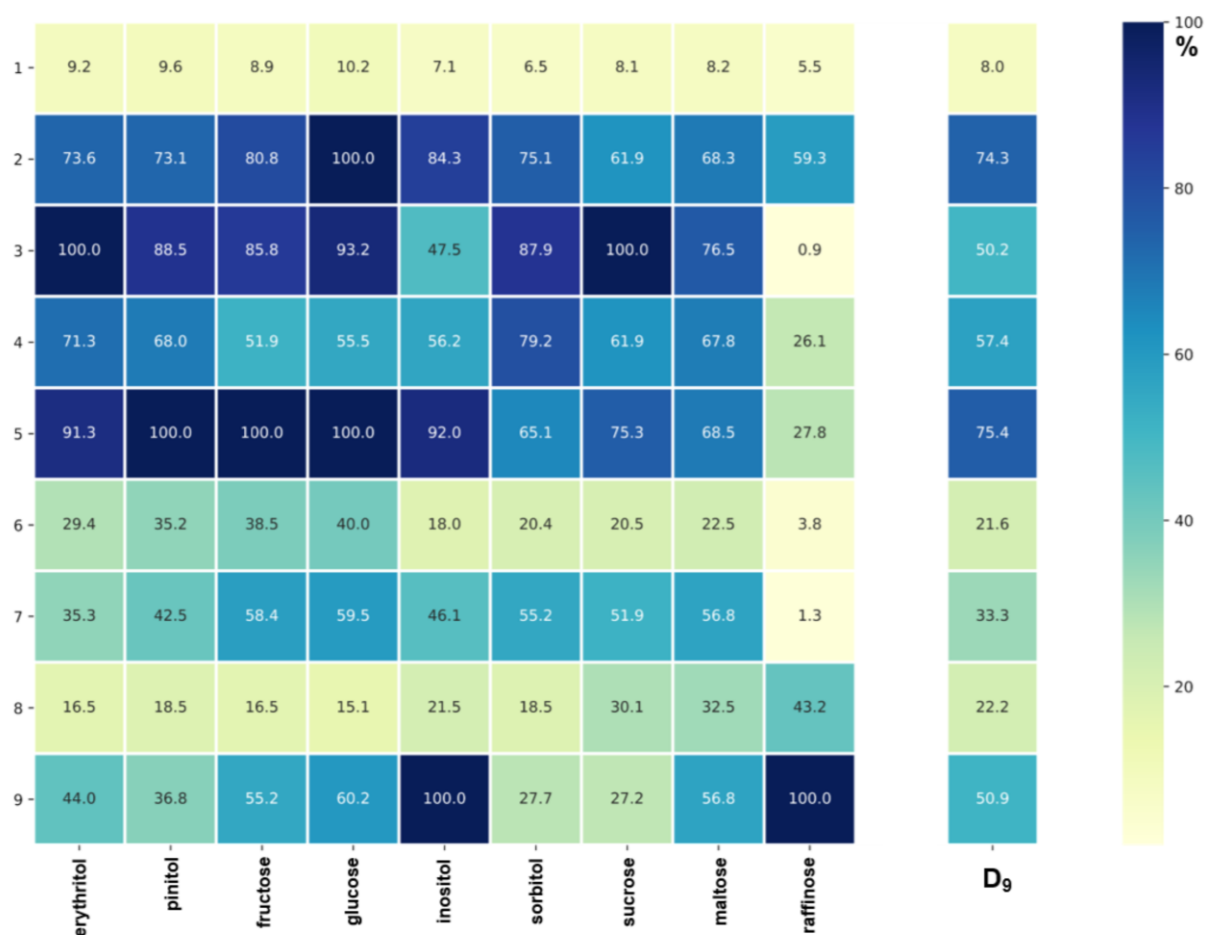


Рисунок 4.11 – Результаты экспериментов (1 — 9 из таблицы 4.9) по извлечению сахаров и сахароспиртов из образца хвои.

Таблица 4.10 – Значения откликов и ранжирование факторов по степени влияния на эффективность при 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

Поэтому значение температуры было выбрано на уровне 60°C, чтобы избежать краевых эффектов. Лучшее извлечение низкомолекулярных сахаров и сахароспиртов зависит от большей полярности растворителя. Тип образца растения имел большое влияние на выход экстракции, поэтому типы II и III были значительно лучше, чем тип I. Ухудшение экстракции аналитов было связано с методом

измельчения растительного материала при переходе от типа II к типу III, по-видимому, из-за наличия смолы в образцах растений. В результате этого эксперимента по оптимизации показатель D_9 на первом акте экстракции составил $96 \pm 3\%$.

4.3.3 Проверка полученных результатов способом последовательного экстрагирования

Для подтверждения эффективности УЗЭ с оптимизированными параметрами был проведен дополнительный эксперимент способом последовательного экстрагирования. По результатам эксперимента на втором акте экстракции групповой выход D_9 составил менее 5%. Эти результаты показывают, что более 90% общего выхода каждого аналита было получено на первой стадии экстракции. На третьей стадии экстракции сахара и сахароспирты не были обнаружены. Таким образом, однократную экстракцию в выбранных условиях можно использовать для количественной оценки сахаров и сахарных спиртов в растениях.

Таблица 4.11 – Аналитические характеристики предложенного подхода к извлечению и определению сахаров и сахароспиртов методом ВЭЖХ-МС/МС

Соединение	$C_{\min}$, нг/мл	$C_{\lim}$, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	r^2	ОСКО, %* (n = 5) 1 день (3 дня)	Точность $\pm$ воспроизводимость, %
эритритол	10	30	400-4000	0.996	3.8 (4.8)	97 ± 8
рамноза	10	50	400-4000	0.998	3.2 (5.0)	102 ± 6
ксилитол	1	20	100-2000	0.996	5.6 (7.8)	96 ± 10
рибитол	1	20	100-2000	0.995	5.2 (9.4)	98 ± 8
арабитол	1	20	100-2000	0.996	6.1 (8.6)	100 ± 6
пинитол	1	10	200-2000	0.996	5.8 (7.5)	102 ± 8
секвоитол	1	10	200-2000	0.996	6.2 (7.2)	100 ± 10
фруктоза	0.1	1	400-4000	1.000	3.5 (6.5)	96 ± 5
сорбитол	0.5	5	400-4000	0.998	3.4 (6.5)	92 ± 4
маннитол	0.1	1	200-2000	1.000	2.8 (4.5)	100 ± 5
дульцитол	0.1	1	200-2000	0.998	3.2 (4.8)	101 ± 6
глюкоза	0.8	5	400-6000	1.000	2.6 (5.9)	96 ± 6
инозитол	20	60	200-2000	1.000	3.0 (4.2)	92 ± 10
сахароза	1	5	100-2000	0.999	2.9 (3.0)	102 ± 4
мальтитол	1	5	100-2000	0.999	2.6 (4.2)	99 ± 5
мальтоза	10	60	200-2000	0.998	3.8 (5.4)	98 ± 8
трегалоза	10	50	200-2000	1.000	3.1 (4.2)	95 ± 6
раффиноза	1	10	100-2000	0.998	3.8 (3.8)	96 ± 4

*Относительное стандартное отклонение при измерении $C = 1000$ нг/мл;

Для проверки полноты экстракции методом «введено-найдено» использовали тот же образец *Pinus sibirica* №9. Анализ навесок хвои с добавлением известных количеств 17 целевых соединений проводили после проведения УЗЭ в выбранных условиях. Также в таблице 4.11 приведены установленные значения других валидационных параметров: диапазоны линейности, коэффициенты детерминации, пределы обнаружения (C_{min}) и определения (C_{lim}).

Полученные значения показывают, что разработанный способ УЗЭ пригоден для экстракции аналитов из образцов хвои. Коэффициенты детерминации для полученных калибровочных кривых находились в диапазоне от 0.995 до 1.000, что показывает, что предложенная методика является надежной для количественного анализа в заданных диапазонах. Относительное стандартное отклонение для повторяемости было менее 9.4%, в то время как для промежуточной прецизионности ОСКО не превышало 6.2%. Более высокие значения повторяемости и промежуточной прецизионности для ксилитола, рибитола, арабитола, пинитола, секвоитола можно объяснить неполным хроматографическим разделением этой группы аналитов (рис. 4.10). Результаты, приведенные в таблице 4.11, показывают, что точность и прецизионность предложенного метода достаточны для определения сахаров и сахароспиртов методом ВЭЖХ-МС/МС.

4.3.4 Аппробация предложенного подхода на образцах различных видов хвойных растений

Чтобы проверить универсальность разработанного способа УЗЭ и последующего ВЭЖХ-МС/МС определения сахаров и сахароспиртов, было решено провести измерения с помощью техники последовательного экстрагирования для десяти образцов хвои растений из пяти родов (таблица 2.2). Содержание сахаров и сахароспиртов сильно варьируется в зависимости от вида растений (таблица 4.12).

Самыми распространенными сахарами для изученных хвойных растений являются глюкоза, фруктоза и сахароза. Для *Juniperus communis* (№ 3 и № 4 в таблице 2.2) и *Larix gmelinii* (№ 5 и № 6 в таблице 2.2) рафиноза также является одним из наиболее распространенных сахаров в сахаридном профиле. Основные обнаруженные сахарные спирты - пинитол и инозитол; секвоитол для *Juniperus communis*. Содержание этих соединений достигает 1% от сухой массы; это 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 сахарных спиртов между видами растений оправдывают введение параметра D_n для оптимизации условий УЗЭ и последующего селективного ВЭЖХ-МС/МС определения этих соединений в подобных объектах.

Таблица 4.12 – Содержание сахаров и сахароспиртов (%) в исследованных образцах хвои

Соединение	<i>Abies sibirica</i>		<i>Juniperus communis</i>		<i>Larix gmelinii</i>		<i>Picea abies</i>		<i>Pinus sibirica</i>	
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10
эритритол	0.023	0.013	0.003	0.002	0.002	0.001	<0.0003	<0.0003	0.019	0.019
рамноза	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	0.005	0.008	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006
ксилитол	0.001	0.004	0.003	0.004	<0.0002	<0.0002	0.001	<0.0002	0.001	0.006
рибитол	0.003	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.001	0.003
арабитол	0.004	0.007	0.003	<0.0002	<0.0002	0.001	<0.0002	0.001	0.002	0.004
пинитол	0.779	0.769	0.0052	0.130	0.229	0.320	0.169	0.144	0.234	0.218
секвоитол	<0.0001	<0.0001	0.143	0.153	0.035	0.040	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
фруктоза	0.812	0.662	0.442	0.510	0.495	0.477	0.331	0.235	0.616	0.440
сорбитол	0.205	0.039	<0.0001	0.002	0.003	0.005	0.001	0.002	0.015	0.003
маннитол + дульцитол	0.001	0.006	0.008	0.002	0.002	0.002	0.004	0.013	0.001	0.031
глюкоза	0.696	0.398	0.429	0.225	0.392	0.227	0.257	0.174	0.384	0.210
инозитол	0.226	0.257	0.052	0.066	0.052	0.041	0.009	0.012	0.039	0.012
сахароза	0.231	0.197	0.586	0.294	0.412	0.334	0.250	0.074	0.327	0.002
мальтитол	0.011	0.018	0.022	0.024	0.028	0.031	<0.0001	<0.0001	0.008	0.005
мальтоза	0.003	0.003	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	0.010	0.053
трегалоza	0.003	0.003	<0.0005	<0.0005	0.008	0.006	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
раффиноза	0.050	0.015	0.254	0.220	0.170	0.317	0.019	0.038	0.115	0.066

*Нумерация образцов согласно таблице 2.2 (п. 2.1).

Дополнительная апробация разработанного подхода была произведена при исследовании выращенных в условиях водного дефицита саженцев сосны и ели. Для определения фотохимических показателей количество биологических повторов составляло от 13 до 16. Содержание сахаров, сахароспиртов и крахмала определяли в 3–4 образцах. Удалось установить, что рафиноза, мальтоза и трегалоza составляли от 1.5% (в корнях ели) до 5.7% (в корнях сосны) от общего пула растворимых сахаров. Содержание сахарозы в органах сосны и ели было наибольшим среди всех сахаров и сахароспиртов, достигая более 35 мг/г сухой массы. Водный дефицит

вызвал значительное увеличение концентрации сахарозы в надземных частях сосны более чем в 1.5 раза при обоих уровнях водного дефицита. Содержание сахарных спиртов у обоих видов было относительно небольшим и не превышало 2.5 мг/г сухой массы. Общее содержание сахароспиртов было достаточно стабильным как в корнях, так и в хвое сосны, а у ели дозозависимо снижалось в обоих органах при водном дефиците. Основной сахароспирт у обоих видов – мио-инозитол – уменьшался при водном дефиците у обоих видов. Среди других полиолов небольшое достоверное увеличение концентраций пинитола отмечено только в корнях сосны и особенно в хвое при водном стрессе. Из-за относительно низкого содержания сахаров и сахарных спиртов в органах проростков их ожидаемый вклад в изменение осмотического потенциала был достаточно низким.

4.4 Выводы к главе 4

На примере протодиосцина и диосцина проведено сравнение четырех методов извлечения из твердого растительного сырья *T. terrestris* – УЗЭ, ЭКР, ЭКРПД и экстракции в аппарате Сокслета. Показано, что УЗЭ не позволяет в ходе однократной экстракции добиться сопоставимых с другими методами степеней извлечения. Таким образом, УЗЭ необходимо проводить как минимум дважды, а в некоторых случаях использовать более трудозатратные методы. ЭКРПД позволяет уменьшить температуру при экстракции, что важно при извлечении термолабильных соединений. Для извлечения стероидных сапонинов может быть рекомендован способ ЭКР 50%-ым изопропанолом или ацетонитрилом (в соотношении 200 мл/г) в течение 60 мин при 92 °С.

Продемонстрирована возможность и преимущества применения статистического экспериментального дизайна Тагучи $L_{16}(4^3)$ на основе латинского квадрата с использованием в качестве выходного параметра группового выхода (D_n) для оптимизации условий жидкостного экстрагирования. Подтверждена гипотеза о невозможности использования метода УЗЭ для полного извлечения стероидных сапонинов из растительного материала. Получены оптимальные параметры экстрагирования методом УЗЭ для извлечения стероидных сапонинов из суспензионной клеточной культуры *D. deltoidea* (50%-ый ацетонитрил, соотношение 400 мл/г, длительность 60 мин при 30°C).

Условия группового извлечения методом УЗЭ в виде 4-х параметров на 3-х уровнях были оптимизированы с помощью метода Тагучи $L_9 (3^4)$. Использование этого метода позволяет добиться высокой степени извлечения сахаров и сахароспиртов из листвы хвойных пород. Высокая степень извлечения была подтверждена способом последовательного экстрагирования. На основе метода ГФ ВЭЖХ-МС/МС был разработан способ определения 17 сахаров и сахароспиртов. Было показано, что реализация масс-спектрометрического обнаружения и разделения методом ГФ ВЭЖХ с колонкой на основе амино-фазы позволяет достичь пределов обнаружения в диапазоне от 0.1 до 20 нг/мл и удовлетворительных аналитических характеристик без применения дериватизации. Выбранные условия УЗЭ и ГФ ВЭЖХ-МС/МС определения были протестированы на десяти образцах растений *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* (Pinaceae) и *Juniperus* (Cupressaceae), охватывающих все роды бореальных хвойных лесов Евразии. Аналогичная эффективность экстракции была достигнута для серии образцов способом последовательного экстрагирования. Результаты показывают, что разработанный подход с оптимизированными параметрами применим для определения содержания сахаров и сахарных спиртов в хвое.

ГЛАВА 5. ГРУППОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ⁶

Описание проблемы. Постановка задачи. Задачу идентификации компонентов сложной смеси можно разделить на три части [324]: идентификация известных компонентов, заведомо присутствующих в ее составе “known knowns”, их близких структурных аналогов, предположительно сопутствующих этим компонентам “known unknowns”, и, наконец, абсолютно новых или неожиданных соединений не заданной структуры “unknown unknowns”. Разумеется, провести полную идентификацию всех соединений в исследуемом образце очень сложно, и на это потребуется много времени и материальных затрат. Поэтому на первой стадии можно провести промежуточную, предварительную идентификацию основных и минорных компонентов. Так, при поиске новых кандидатов в действующие вещества лекарственных средств среди НП, чтобы высвободить ресурсы исследователей на работу с неизвестными веществами, зачастую проводят процедуру дерепликации, т.е. быстрой идентификации уже известных, и, как правило, исследованных соединений. При этом, при наличии, используют стандартные образцы для некоторых основных компонентов (для них можно говорить об однозначной идентификации), чтобы получить информацию о хроматографическом и масс-спектрометрическом поведении и использовать ее для

⁶ При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Stavrianidi 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%; Stekolshchikova E., Turova P., Shpigun O., Rodin I., Stavrianidi 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%; Turova P., Rodin I., Shpigun O., Stavrianidi 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%; Stavrianidi 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%; Stavrianidi 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%; Ставрианиди А.Н., Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А., Беризовская Е.И. Одновременное определение гинсенозидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2013. Т.10. № 2. С. 129–135. ИФ (РИНЦ) – 0,351. 50%; Ставрианиди А.Н., Стеколыщикова 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%; Ставрианиди А.Н., Стеколыщикова 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%.

индуктивного описания закономерностей, позволяющих обнаружить и предварительно идентифицировать их структурные аналоги. Таким образом, применение групповых подходов к идентификации соединений, относящихся к известным (“known knowns”) и их структурным аналогам (“known unknowns”) позволяет несколько расширить понятие дерепликация до предварительного определения структуры не только известных компонентов растительного экстракта, но и других компонентов из той же фитохимической группы. Что же касается неизвестных соединений (“unknown unknowns”), они также могут быть объединены в группы, например, с использованием метода молекулярных сетей (molecular networking [172]), после чего могут быть использованы те же групповые подходы к идентификации, которые будут рассмотрены в данной главе.

Очевидно, что в отсутствие индивидуального стандартного образца, на основе только ВЭЖХ-МС данных и информации из литературы структура неизвестного соединения достоверно установлена быть не может, то есть отдельным компонентам образца, относящимся к известным соединениям (“known knowns”), может быть поставлена в соответствие (и то с некоторой вероятностью ошибки) структура, детально описанная в предшествующих исследованиях с применением методов ЯМР и др., а их структурным аналогам (“known unknowns”) может быть поставлена в соответствие только молекулярная формула, что также возможно и для неизвестных соединений, или, в лучшем случае, детализированная фрагментарная формула⁷. При этом степень детализации такой фрагментарной формулы [325,326] и вероятность ее ошибочности зависят от количества и качества информации, извлекаемой из данных удерживания, разделения, а также МС¹ и МС² спектров и др. особенностей масс-спектрометрического поведения. Следовательно, целью групповой идентификации является получение фрагментарных формул для основных и минорных компонентов, принадлежащих к одной группе соединений.

5.1 Идентификация неизвестных тритерпеновых гликозидов в составе женьшеневого чая

Тритерпеновые гликозиды, содержащиеся в растительном сырье, являются важным классом физиологически активных веществ, влияние которых на организм

⁷ фрагментарная формула — набор структурных единиц (дескрипторов), полностью согласованных по элементному составу с молекулярной формулой соединения.

человека изучено недостаточно. Эти соединения состоят из основания – агликона (или сапогенина) и сахаридных боковых цепей из одного или нескольких моносахаридных остатков. Такая структура позволяет естественным образом разделить тритерпеновые гликозиды на группы в соответствии с типом агликона. Многообразие агликонов и их специфичность столь велики, что некоторые из них известны и названы по имени одного вида, для которого соответствующие гликозиды были впервые обнаружены, например, абрусогенин (рис. 5.1) из абруса молитвенного (*Abrus precatorius* L.). Обладающие этим агликоном гликозиды – абрусозиды были описаны в работах Д. Кингорна (D. Kinghorn) с соавторами в 1989-1996 гг. [327–329], и некоторые новые представители этой группы обнаружены нами в составе женьшеневого чая (улуна). Масс-спектр одного из них представлен на рисунке 5.2.

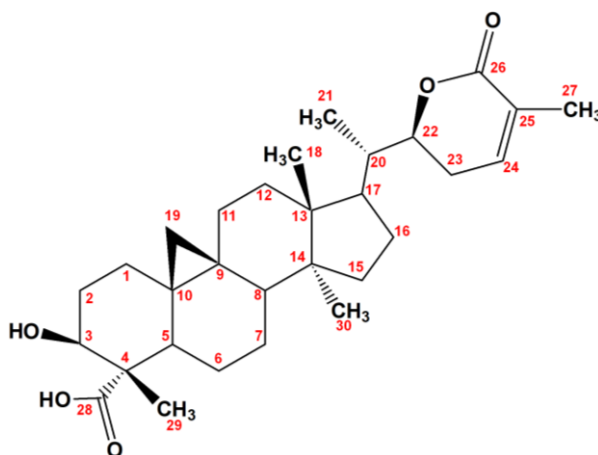


Рисунок 5.1 – Структура абрусогенина.

В масс-спектре можно выделить сигналы протонированной молекулы $[M+H]^+$, аддуктных ионов с Na и K ($[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$), а также сигналы фрагментных ионов, образующихся в результате последовательного отщепления моносахаридных заместителей и молекул воды H_2O и CO от остова молекулы. Сигналы в области 400-500 m/z , относящиеся к агликону, образуют его паттерн фрагментации, который является отличительным признаком для соединений, принадлежащих к данной группе. Образование таких фрагментных ионов связано с процессами распада ионов внутри источника ионизации и на входе в масс-анализатор при соударении с молекулами азота, используемого в качестве газа-завесы (curtain gas), поток которого направлен навстречу потоку ионов, устремляющихся к пластине скимера под действием потенциала декластеризации, и препятствует попаданию незаряженные молекул растворителя в зону высокого вакуума.

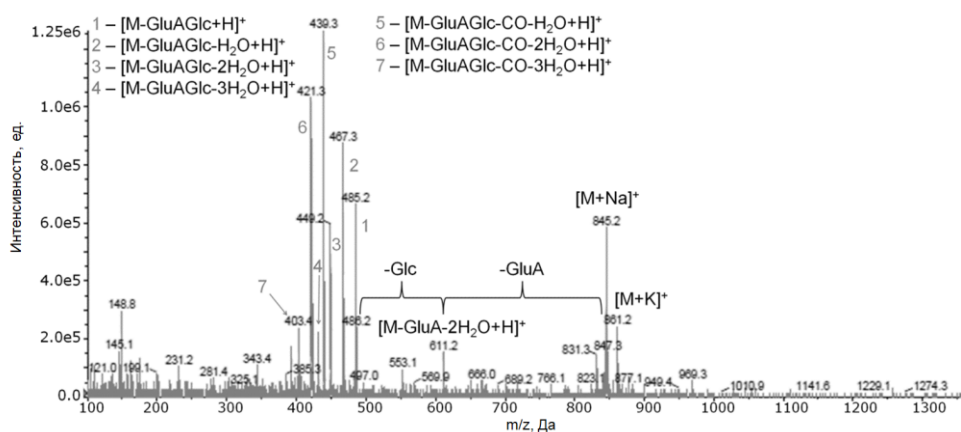


Рисунок 5.2 – Масс-спектр одного из обнаруженных гликозидов женьшеневого улуна.

Итак, задача получения фрагментарных формул для присутствующих в экстракте из женьшеневого чая тритерпеновых гликозидов состояла в 1) поиске пиков, масс-спектры которых содержали характеристичный паттерн фрагментации; 2) установления молекулярных формул для обнаруженных соединений методом МСВР; 3) интерпретации сигналов фрагментных ионов с целью установления сахаридной последовательности в боковой цепи и других заместителей; 4) выделения в результате гидролиза агликона, общего для этой группы соединений, и подтверждение его структуры методом ЯМР.

5.1.1 Охарактеризовывание структур гликозидов абруса на основе данных ВЭЖХ-МСВР

Хроматограмма водно-спиртового экстракта женьшеневого чая, построенная по сигналам ионов в диапазоне 800-950 m/z , представлена на рисунке 5.3А. Характеристичные сигналы из паттерна фрагментации абрусогенина были обнаружены для 9 пиков, 2 из которых, относящиеся к известным изомерным соединениям абрусозидам Е и D, не были разделены. Молекулярные массы еще двух пар соединений 4 и 5, 7 и 8 совпадают, как и сигналы их фрагментных ионов (таблица 5.1), поэтому 4 и 7, были обозначены как минорные изомеры соединений 5 и 8, соответственно. Соединение 3 было предварительно идентифицировано как абрусозид С [328]. Для установления молекулярных формул использовали сигналы $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$ ионов, полученные в режимах положительной и отрицательной ЭРИ, соответственно. Для всех ионов наблюдалось удовлетворительное совпадение с теоретическими значениями m/z , рассчитанными для выбранных молекулярных формул ($\Delta < 5.0$ м.д.). Для установления присутствующих в структуре гликозида заместителей и их порядка присоединения использовали принципы, описанные на

примере аналогичных масс-спектров гинсенозидов женьшеня в работе [330]. 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 положительной ЭРИ, например, $[M-GluA+H]^+$ и $[M-GluA-Ac+H]^+$ (таблица 5.1). Кроме того, установлена точная масса уходящей группы, равная 27.9949 (CO, $\Delta = -0.52$ м.д.), что соответствует что соответствует фрагментации остова молекулы с отщеплением CO (m/z 467.3157 $\rightarrow$ m/z 439.3208).

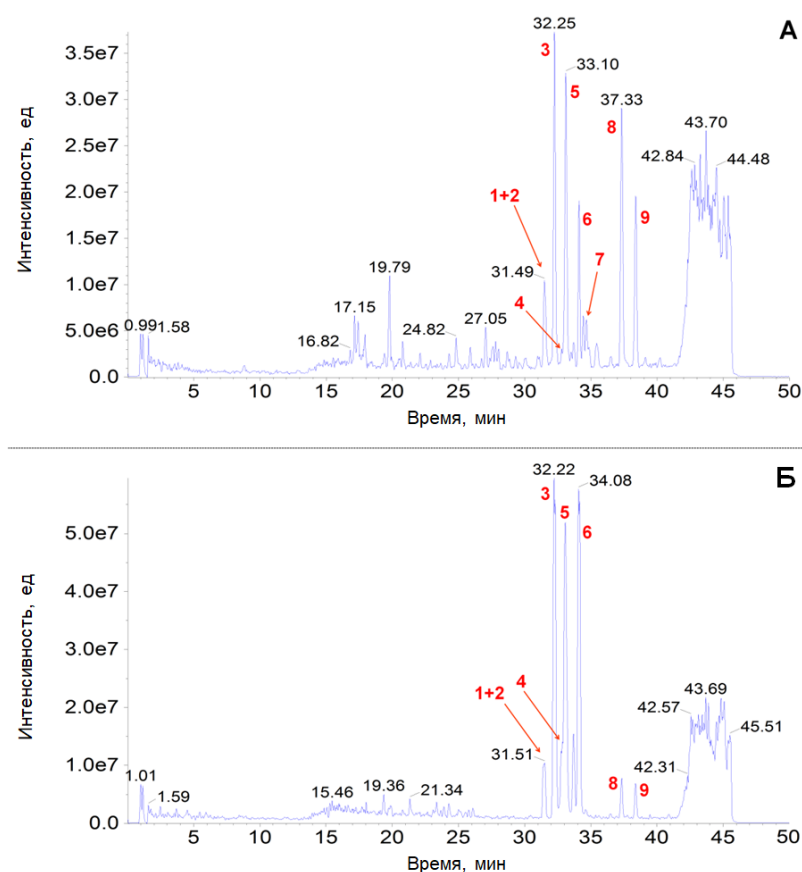


Рисунок 5.3 – Хроматограмма метанольного экстракта из женьшеневого чая (А), листьев *Abrus precatorius* L. (Б) в режиме регистрации суммарного ионного тока: m/z 800 – 950.

Те же компоненты были обнаружены и в экстракте из листа растения *Abrus precatorius* L. (рис. 5.3Б), что подтвердило правильность отнесения этих соединений к известной группе абрусозидов. Стоит отметить, что в экстракте из чайных гранул, прошедших процедуру ферментации, значительно выше содержание ацетил-производных известных абрусозидов Е и С (пики 8 и 9).

Таблица 5.1 – Сигналы молекулярных и фрагментных ионов из MS1 и MS2 масс-спектров, зарегистрированных в режимах положительной и отрицательной ЭРИ (разрешение 35 000 при 400 m/z)

Соединение (t _r , мин)	Ион m/z C _n H _m O _k (Δ, м.д.)	Фрагментные ионы (положительный режим ЭРИ)	Фрагментные ионы (отрицательный режим ЭРИ)
А-3-GlcGluA* + А-3-GluAGlc (1,2) Абрусозиды Е и D (31.5)	[M+H] ⁺ C ₄₂ H ₆₃ O ₁₆ 823.4116 (0.61)	661.3583 ([M-Glc+H], C ₃₆ H ₅₃ O ₁₁ , Δ=0.15 м.д.), 643.3489 ([M-Glc-H ₂ O +H], C ₃₆ H ₅₁ O ₁₀ , Δ=2.06 м.д.), 647.3793 ([M-GluA+H], C ₃₆ H ₅₅ O ₁₀ , Δ=0.46 м.д.), 629.3688 ([M-GluA-H ₂ O+H], C ₃₆ H ₅₃ O ₉ , Δ=0.68 м.д.), 611.3569 ([M-GluA-2H ₂ O+H], C ₃₆ H ₅₁ O ₈ , Δ=-1.50 м.д.), 485.3262 ([M-GluA-Glc+H], C ₃₀ H ₄₅ O ₅ , Δ=0.16 м.д.), 467.3157 ([M-GluA-Glc-H ₂ O +H], C ₃₀ H ₄₃ O ₄ , Δ=0.24 м.д.), 449.3049 ([M-GluA-Glc-2H ₂ O+H], C ₃₀ H ₄₁ O ₃ , Δ=-0.27 м.д.), 439.3207 ([M-GluA-Glc-CO-H ₂ O+H], C ₂₉ H ₄₃ O ₃ , Δ=0.16 м.д.), 421.3099 ([M-GluA-Glc-CO-2H ₂ O+H], C ₂₉ H ₄₁ O ₂ , Δ=-0.33 м.д.), 403.2993 ([M-GluA-Glc-CO-3H ₂ O+H], C ₂₉ H ₃₉ O, Δ=-0.48 м.д.)	803.3884 ([M-H ₂ O-H], C ₄₂ H ₅₉ O ₁₅ , Δ=4.46 м.д.), 645.3662 ([M-GluA-H], C ₃₆ H ₅₃ O ₁₀ , Δ=4.47 м.д.), 627.3569 ([M-GluA-H ₂ O-H], C ₃₆ H ₅₁ O ₉ , Δ=6.65 м.д.), 193.0349 ([GluA+H ₂ O-H], C ₆ H ₉ O ₇ , Δ=3.11 м.д.), 175.0241 ([GluA -H], C ₆ H ₇ O ₆ , Δ=2.26 м.д.), 179.0554 ([Glc+H ₂ O-H], C ₆ H ₁₁ O ₆ , Δ=2.10 м.д.), 161.0447 ([Glc-H], C ₆ H ₉ O ₅ , Δ=1.24 м.д.), 355.0889 ([GluA+Glc+H ₂ O-H], C ₁₂ H ₁₉ O ₁₂ , Δ=5.15 м.д.), 337.0785 ([GluA+Glc-H], C ₁₂ H ₁₇ O ₁₁ , Δ=5.70 м.д.), 131.0339 ([Glc-CH ₂ O-H], C ₅ H ₇ O ₄ , Δ=-0.12 м.д.), 119.0338 ([Glc-C ₂ H ₂ O-H], C ₄ H ₇ O ₄ , Δ=-0.88 м.д.), 483.3126 ([M-GluA-Glc-H], C ₃₀ H ₄₃ O ₅ , Δ=4.32 м.д.), 465.3020 ([M-GluA-Glc-H ₂ O-H], C ₃₀ H ₄₁ O ₄ , Δ=4.44 м.д.)
	[M-H] ⁻ C ₄₂ H ₆₁ O ₁₆ 821.3975 (2.57)		
А-3-GlcGlc (3) Абрусозид С (32.2)	[M+H] ⁺ C ₄₂ H ₆₅ O ₁₅ 809.4329 (1.46)	647.3790 ([M-Glc+H], C ₃₆ H ₅₅ O ₁₀ , Δ=0.09 м.д.), 629.3665 ([M-Glc-H ₂ O+H], C ₃₆ H ₅₃ O ₉ , Δ=-3.00 м.д.), 611.3585 ([M-Glc-2H ₂ O+H], C ₃₆ H ₅₁ O ₈ , Δ=1.01 м.д.), 485.3261 ([M-Glc-Glc+H], C ₃₀ H ₄₅ O ₅ , Δ=-0.08 м.д.), 467.3156 ([M-Glc-Glc-H ₂ O+H], C ₃₀ H ₄₃ O ₄ , Δ=-0.08 м.д.), 449.3050 ([M-Glc-Glc-2H ₂ O+H], C ₃₀ H ₄₁ O ₃ , Δ=-0.004 м.д.), 431.2945 ([M-Glc-Glc-CO-2H ₂ O+H], C ₃₀ H ₃₉ O ₂ , Δ=-0.08 м.д.), 449.3050 ([M-Glc-Glc-2H ₂ O+H], C ₃₀ H ₄₁ O ₃ , Δ=-0.004 м.д.), 421.3099 ([M-Glc-Glc-CO-2H ₂ O+H], C ₂₉ H ₄₁ O ₂ , Δ=-0.85 м.д.), 403.2997 ([M-Glc-Glc-CO-3H ₂ O+H], C ₂₉ H ₃₉ O, Δ=0.49 м.д.), 393.3147 ([M-Glc-Glc-2CO-2H ₂ O+H], C ₂₈ H ₄₁ O, Δ=1.19 м.д.)	645.3662 ([M-Glc-H], C ₃₆ H ₅₃ O ₁₀ , Δ=4.38 м.д.), 627.3544 ([M-Glc-H ₂ O-H], C ₃₆ H ₅₁ O ₉ , Δ=2.66 м.д.), 341.1093 ([Glc+Glc+H ₂ O-H], C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ , Δ=4.32 м.д.), 179.0555 ([Glc+H ₂ O-H], C ₆ H ₁₁ O ₆ , Δ=2.54 м.д.), 161.0447 ([Glc-H], C ₆ H ₉ O ₅ , Δ=1.68 м.д.), 143.0341 ([Glc-H ₂ O-H], C ₆ H ₇ O ₄ , Δ=-2.61 м.д.), 483.3129 ([M-Glc-Glc-H], C ₃₀ H ₄₃ O ₅ , Δ=5.03 м.д.)
	[M-H] ⁻ C ₄₂ H ₆₃ O ₁₅ 807.4179 (0.90)		
А-3-Glc(Mal)GluA (4) Малонил- абрусозид Е (изомер) (32.8)	[M+H] ⁺ C ₄₅ H ₆₅ O ₁₉ 909.4151 (3.94)	733.3809 ([M-GluA+H], C ₃₉ H ₅₇ O ₁₃ , Δ=2.12 м.д.), 715.3709 ([M-GluA-H ₂ O +H], C ₃₉ H ₅₅ O ₁₂ , Δ=2.93 м.д.), 697.3601 ([M-GluA-2H ₂ O+H], C ₃₉ H ₅₃ O ₁₁ , Δ=2.57 м.д.), 485.3276 ([M-GluA-Glc-Mal+H], C ₃₀ H ₄₅ O ₅ , Δ=3.05 м.д.), 467.3170 ([M-GluA-Glc—H ₂ O-Mal+H], C ₃₀ H ₄₃ O ₄ , Δ=2.98 м.д.), 449.3063 ([M-GluA-Glc-Mal-2H ₂ O+H], C ₃₀ H ₄₁ O ₃ , Δ=2.85 м.д.), 439.3222 ([M-GluA-Glc—Mal-CO-H ₂ O+H], C ₂₉ H ₄₃ O ₃ , Δ=3.48 м.д.), 421.3108 ([M-GluA-Glc—Mal-CO-2H ₂ O+H], Δ=1.57 м.д.), 403.3001 ([M-GluA-Glc-Mal-CO-3H ₂ O+H], C ₂₉ H ₃₉ O, Δ=1.26 м.д.)	863.4023 ([M-CO ₂ -H], C ₄₄ H ₆₃ O ₁₇ , Δ=-5.55 м.д.), 845.3908 ([M-CO ₂ -H ₂ O-H], C ₄₄ H ₆₁ O ₁₆ , Δ=-6.81 м.д.), 821.3915 ([M-Mal-H], C ₄₂ H ₆₁ O ₁₆ , Δ=-6.05 м.д.), 803.3808 ([M-Mal-H ₂ O-H], C ₄₂ H ₅₉ O ₁₅ , Δ=-6.40 м.д.), 687.3715 ([M-GluA-CO ₂ -H], C ₃₈ H ₅₅ O ₁₁ , Δ=-5.04 м.д.), 645.3628 ([M-GluA-Mal-H], C ₃₆ H ₅₃ O ₁₀ , Δ=-2.43 м.д.), 175.0226 ([GluA -H], C ₆ H ₇ O ₆ , Δ=-12.58 м.д.), 193.0333 ([GluA+H ₂ O-H], C ₆ H ₉ O ₇ , Δ=-11.01 м.д.), 161.0434 ([Glc-H], C ₆ H ₉ O ₅ , Δ=-13.14 м.д.), 337.0759 ([GluA+Glc-H], C ₁₂ H ₁₇ O ₁₁ , Δ=-5.24 м.д.)
	[M-H] ⁻ C ₄₅ H ₆₃ O ₁₉ 907.3923 (-5.11)		

Продолжение таблицы 5.1

A-3-Glc(Mal)GluA (5) Малонил- абрусозид E (33.1)	$[M+H]^+$ $C_{45}H_{65}O_{19}$ 909.4121 (0.72)	891.4008 ([M-H ₂ O+H], $C_{45}H_{63}O_{18}$, $\Delta=-0.08$ м.д.), 873.3899 ([M-2H ₂ O+H], $C_{45}H_{63}O_{18}$, $\Delta=-0.43$ м.д.), 733.3791 ([M-GluA+H], $C_{39}H_{57}O_{13}$, $\Delta=-0.38$ м.д.), 715.3689 ([M-GluA-H ₂ O +H], $C_{39}H_{55}O_{12}$, $\Delta=-0.14$ м.д.), 697.3671 ([M-GluA-2H ₂ O+H], $C_{39}H_{53}O_{11}$, $\Delta=11.96$ м.д.), 647.3786 ([M-GluA-Mal+H], $C_{36}H_{55}O_{10}$, $\Delta=-1.43$ м.д.), 485.3262 ([M-GluA-Glc-Mal+H], $C_{30}H_{45}O_5$, $\Delta=0.10$ м.д.), 467.3156 ([M-GluA-Glc-H ₂ O-Mal+H], $C_{30}H_{43}O_4$, $\Delta=0.05$ м.д.), 449.3049 ([M-GluA-Glc-Mal-2H ₂ O+H], $C_{30}H_{41}O_3$, $\Delta=-0.21$ м.д.), 439.3207 ([M-GluA-Glc-Mal-CO-H ₂ O+H], $C_{29}H_{43}O_3$, $\Delta=0.43$ м.д.), 421.3099 ([M-GluA-Glc-Mal-CO-2H ₂ O+H], $\Delta=-0.47$ м.д.), 403.2997 ([M-GluA-Glc-Mal-CO-3H ₂ O+H], $C_{29}H_{39}O$, $\Delta=-0.42$ м.д.)	863.4093 ([M-CO ₂ -H], $C_{44}H_{63}O_{17}$, $\Delta=3.84$ м.д.), 845.4001 ([M-CO ₂ -H ₂ O-H], $C_{44}H_{61}O_{16}$, $\Delta=5.44$ м.д.), 821.3989 ([M-Mal-H], $C_{42}H_{61}O_{16}$, $\Delta=4.27$ м.д.), 803.3881 ([M-Mal-H ₂ O-H], $C_{42}H_{59}O_{15}$, $\Delta=3.97$ м.д.), 687.3771 ([M-GluA-CO ₂ -H], $C_{38}H_{55}O_{11}$, $\Delta=4.61$ м.д.), 645.3664 ([M-GluA-Mal-H], $C_{36}H_{53}O_{10}$, $\Delta=3.92$ м.д.), 627.3559 ([M-GluA-Mal-H ₂ O-H], $C_{36}H_{51}O_9$, $\Delta=5.01$ м.д.), 175.0241 ([GluA -H], $C_6H_7O_6$, $\Delta=2.26$ м.д.), 193.0350 ([GluA+H ₂ O-H], $C_6H_9O_7$, $\Delta=0.79$ м.д.), 179.0554 ([Glc+H ₂ O-H], $C_6H_{11}O_6$, $\Delta=-0.52$ м.д.), 161.0448 ([Glc-H], $C_6H_9O_5$, $\Delta=-1.48$ м.д.), 355.0889 ([GluA+Glc+H ₂ O-H], $C_{12}H_{19}O_{12}$, $\Delta=5.97$ м.д.), 337.0785 ([GluA+Glc-H], $C_{12}H_{17}O_{11}$, $\Delta=4.05$ м.д.), 319.0679 ([GluA+Glc-H ₂ O -H], $C_{12}H_{15}O_{10}$, $\Delta=4.48$ м.д.), 483.3128 ([M-GluA-Glc-Mal-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=4.78$ м.д.), 465.3014 ([M-GluA-Glc-Mal-H ₂ O-H], $C_{30}H_{41}O_4$, $\Delta=3.19$ м.д.)
	$[M-H]^-$ $C_{45}H_{63}O_{19}$ 907.3979 (2.36)		
A-3-Glc(Mal)Glc (6) Малонил- абрусозид C (34.1)	$[M+H]^+$ $C_{45}H_{67}O_{18}$ 895.4329 (0.81)	877.4183 ([M-H ₂ O+H], $C_{45}H_{65}O_{17}$, $\Delta=-3.76$ м.д.), 733.3795 ([M-Glc+H], $C_{39}H_{57}O_{13}$, $\Delta=-0.62$ м.д.), 715.3667 ([M-Glc-H ₂ O +H], $C_{39}H_{55}O_{12}$, $\Delta=-3.71$ м.д.), 697.3559 ([M-Glc-2H ₂ O +H], $C_{39}H_{53}O_{11}$, $\Delta=-4.05$ м.д.), 647.3785 ([M-Glc-Mal+H], $C_{36}H_{55}O_{10}$, $\Delta=-1.52$ м.д.), 485.3263 ([M-Glc-Glc-Mal+H], $C_{30}H_{45}O_5$, $\Delta=0.23$ м.д.), 467.3158 ([M-Glc-Glc—H ₂ O-Mal+H], $C_{30}H_{43}O_4$, $\Delta=0.39$ м.д.), 449.3052 ([M-Glc-Glc-Mal-2H ₂ O+H], $C_{30}H_{41}O_3$, $\Delta=-0.29$ м.д.), 439.3208 ([M-Glc-Glc-Mal-CO-H ₂ O+H], $C_{29}H_{43}O_3$, $\Delta=0.36$ м.д.), 421.3101 ([M-Glc-Glc—Mal-CO-2H ₂ O+H], $\Delta=-0.11$ м.д.), 403.3003 ([M-Glc-Glc-Mal-CO-3H ₂ O+H], $C_{29}H_{39}O$, $\Delta=-1.93$ м.д.)	849.4295 ([M-CO ₂ -H], $C_{44}H_{65}O_{16}$, $\Delta=2.61$ м.д.), 807.4203 ([M-Mal-H], $C_{42}H_{63}O_{15}$, $\Delta=4.49$ м.д.), 645.3658 ([M-Glc-Mal-H], $C_{36}H_{53}O_{10}$, $\Delta=4.49$ м.д.), 323.0992 ([Glc+Glc-H], $C_{12}H_{19}O_{10}$, $\Delta=4.17$ м.д.), 305.0883 ([Glc+Glc-H ₂ O-H], $C_{12}H_{17}O_9$, $\Delta=3.55$ м.д.), 179.0554 ([Glc+H ₂ O-H], $C_6H_{11}O_6$, $\Delta=-1.02$ м.д.), 161.0447 ([Glc-H], $C_6H_9O_5$, $\Delta=-1.85$ м.д.), 143.0341 ([Glc-H ₂ O-H], $C_6H_7O_4$, $\Delta=-2.61$ м.д.), 483.3124 ([M-Glc-Glc-Mal-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=4.01$ м.д.)
	$[M-H]^-$ $C_{45}H_{65}O_{18}$ 893.4186 (2.35)		
A-3-Glc(Ac)GluA (7) Ацетил- абрусозид E (изомер) (34.6)	$[M+H]^+$ $C_{44}H_{65}O_{17}$ 865.4228 (1.21)	823.4103 ([M-Ac+H], $C_{42}H_{63}O_{16}$, $\Delta=-1.54$ м.д.), 661.3589 ([M-Glc-Ac +H], $C_{36}H_{53}O_{11}$, $\Delta=0.25$ м.д.), 485.3264 ([M-GluA-Glc-Ac+H], $C_{30}H_{45}O_5$, $\Delta=0.49$ м.д.), 467.3158 ([M-GluA-Glc-H ₂ O-Ac+H], $C_{30}H_{43}O_4$, $\Delta=0.46$ м.д.), 449.3060 ([M-GluA-Glc-Ac-2H ₂ O+H], $C_{30}H_{41}O_3$, $\Delta=2.18$ м.д.), 439.3209 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-H ₂ O+H], $C_{29}H_{43}O_3$, $\Delta=0.50$ м.д.), 421.3103 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-2H ₂ O+H], $\Delta=0.53$ м.д.), 403.3006 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-3H ₂ O+H], $C_{29}H_{39}O$, $\Delta=2.62$ м.д.)	807.4179 ([M-CO ₂ -H], $C_{43}H_{63}O_{15}$, $\Delta=0.32$ м.д.), 687.3765 ([M-GluA-H], $C_{38}H_{55}O_{11}$, $\Delta=3.01$ м.д.), 645.3658 ([M-GluA-Ac-H], $C_{36}H_{53}O_{10}$, $\Delta=2.97$ м.д.), 627.3588 ([M-GluA-Ac-H ₂ O-H], $C_{36}H_{51}O_9$, $\Delta=8.83$ м.д.), 397.0993 ([GluA+Glc+Ac+H ₂ O-H], $C_{14}H_{21}O_{13}$, $\Delta=2.78$ м.д.), 379.0889 ([GluA+Glc+Ac-H], $C_{14}H_{19}O_{12}$, $\Delta=3.24$ м.д.), 175.0241 ([GluA -H], $C_6H_7O_6$, $\Delta=-1.11$ м.д.), 193.0350 ([GluA+H ₂ O-H], $C_6H_9O_7$, $\Delta=0.84$ м.д.), 161.0447 ([Glc-H], $C_6H_9O_5$, $\Delta=-1.67$ м.д.), 143.0341 ([Glc-H ₂ O-H], $C_6H_7O_4$, $\Delta=-2.68$ м.д.), 483.3128 ([M-GluA-Glc-Ac-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=4.69$ м.д.), 465.3014 ([M-GluA-Glc-Ac-H ₂ O-H], $C_{30}H_{41}O_4$, $\Delta=3.12$ м.д.)
	$[M-H]^-$ $C_{44}H_{63}O_{17}$ 863.4083 (2.65)		

Продолжение таблицы 5.1

А-3-Glc(Ac)GluA (8) Ацетил-абрусозид Е (37.3)	$[M+H]^+$ $C_{44}H_{65}O_{17}$ 865.4221 (0.43)	689.3892 ([M-GluA+H], $C_{38}H_{57}O_{11}$, $\Delta=-1.26$ м.д.), 671.3778 ([M-GluA-H ₂ O+H], $C_{38}H_{55}O_{10}$, $\Delta=-2.55$ м.д.), 653.3654 ([M-GluA-2H ₂ O+H], $C_{38}H_{53}O_9$, $\Delta=-5.42$ м.д.), 647.3789 ([M-GluA-Ac+H], $C_{36}H_{55}O_{10}$, $\Delta=-0.95$ м.д.), 485.3262 ([M-GluA-Glc-Ac+H], $C_{30}H_{45}O_5$, $\Delta=0.04$ м.д.), 467.3157 ([M-GluA-Glc-H ₂ O-Ac+H], $C_{30}H_{43}O_4$, $\Delta=0.24$ м.д.), 449.3045 ([M-GluA-Glc-Ac-2H ₂ O+H], $C_{30}H_{41}O_3$, $\Delta=-1.23$ м.д.), 439.3208 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-H ₂ O+H], $C_{29}H_{43}O_3$, $\Delta=0.29$ м.д.), 421.3102 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-2H ₂ O+H], $\Delta=0.32$ м.д.), 403.2998 ([M-GluA-Glc-Ac-CO-3H ₂ O+H], $C_{29}H_{39}O$, $\Delta=0.64$ м.д.)	845.3983 ([M-H ₂ O-H], $C_{44}H_{61}O_{16}$, $\Delta=2.77$ м.д.), 687.3769 ([M-GluA-H], $C_{38}H_{55}O_{11}$, $\Delta=3.57$ м.д.), 645.3666 ([M-GluA-Ac-H], $C_{36}H_{53}O_{10}$, $\Delta=4.27$ м.д.), 397.0995 ([GluA+Glc+Ac+H ₂ O-H], $C_{14}H_{21}O_{13}$, $\Delta=3.31$ м.д.), 379.0891 ([GluA+Glc+Ac-H], $C_{14}H_{19}O_{12}$, $\Delta=3.91$ м.д.), 175.0241 ([GluA-H], $C_6H_7O_6$, $\Delta=-0.99$ м.д.), 193.0349 ([GluA+H ₂ O-H], $C_6H_9O_7$, $\Delta=0.43$ м.д.), 161.0447 ([Glc-H], $C_6H_9O_5$, $\Delta=-1.79$ м.д.), 143.0341 ([Glc-H ₂ O-H], $C_6H_7O_4$, $\Delta=-2.54$ м.д.), 483.3126 ([M-GluA-Glc-Ac-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=3.11$ м.д.), 465.3014 ([M-GluA-Glc-Ac-H ₂ O-H], $C_{30}H_{41}O_4$, $\Delta=2.98$ м.д.).
	$[M-H]^-$ $C_{44}H_{63}O_{17}$ 863.4082 (2.58)		
А-3-Glc(Ac)Glc (9) Ацетил-абрусозид С (38.4)	$[M+H]^+$ $C_{44}H_{67}O_{16}$ 851.4432 (0.96)	689.3897 ([M-Glc+H], $C_{38}H_{57}O_{11}$, $\Delta=-0.63$ м.д.), 671.3782 ([M-Glc-H ₂ O+H], $C_{38}H_{55}O_{10}$, $\Delta=-2.02$ м.д.), 653.3687 ([M-Glc-2H ₂ O+H], $C_{38}H_{53}O_9$, $\Delta=-0.38$ м.д.), 647.3804 ([M-Glc-Ac+H], $C_{36}H_{55}O_{10}$, $\Delta=1.41$ м.д.), 629.3652 ([M-Glc-Ac-H ₂ O +H], $C_{36}H_{53}O_9$, $\Delta=-5.92$ м.д.), 611.3580 ([M-Glc-Ac-2H ₂ O +H], $C_{36}H_{51}O_8$, $\Delta=-0.69$ м.д.), 485.3264 ([M-Glc-Glc-Ac+H], $C_{30}H_{45}O_5$, $\Delta=0.41$ м.д.), 467.3159 ([M-Glc-Glc-H ₂ O-Ac+H], $C_{30}H_{43}O_4$, $\Delta=0.65$ м.д.), 449.3053 ([M-Glc-Glc-Ac-2H ₂ O+H], $C_{30}H_{41}O_3$, $\Delta=0.55$ м.д.), 439.3209 ([M-Glc-Glc-Ac-CO-H ₂ O+H], $C_{29}H_{43}O_3$, $\Delta=0.49$ м.д.), 421.3103 ([M-Glc-Glc-Ac-CO-2H ₂ O+H], $\Delta=0.39$ м.д.), 403.3009 ([M-Glc-Glc-Ac-CO-3H ₂ O+H], $C_{29}H_{39}O$, $\Delta=3.29$ м.д.)	807.4179 ([M-Ac-H], $C_{42}H_{63}O_{15}$, $\Delta=1.51$ м.д.), 687.3764 ([M-Glc-H], $C_{38}H_{55}O_{11}$, $\Delta=2.83$ м.д.), 645.3658 ([M-Glc-Ac-H], $C_{36}H_{53}O_{10}$, $\Delta=3.06$ м.д.), 627.3554 ([M-Glc-Ac-H ₂ O-H], $C_{36}H_{51}O_9$, $\Delta=3.34$ м.д.), 221.0665 ([Glc+H ₂ O+Ac-H], $C_8H_{13}O_7$, $\Delta=-1.69$ м.д.), 203.0557 ([Glc+Ac-H], $C_8H_{11}O_6$, $\Delta=0.72$ м.д.), 179.0555 ([Glc+H ₂ O-H], $C_6H_{11}O_6$, $\Delta=-0.46$ м.д.), 161.0447 ([Glc-H], $C_6H_9O_5$, $\Delta=-1.67$ м.д.), 143.0341 ([Glc-H ₂ O-H], $C_6H_7O_4$, $\Delta=-2.75$ м.д.), 483.3127 ([M-Glc-Glc-Ac-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=4.57$ м.д.), 465.3020 ([M-Glc-Glc-Ac-H ₂ O-H], $C_{30}H_{43}O_5$, $\Delta=4.51$ м.д.)
	$[M-H]^-$ $C_{44}H_{65}O_{16}$ 849.4291 (2.79)		

*А – абрусогенин

5.1.2 Гидролиз и выделение гликозидов женьшеневого чая

Для подтверждения структур обнаруженных абрусозидов было решено провести препаративное выделение одного из новых соединений, а также путем предварительного гидролиза с последующей очисткой получить общий для этих соединений агликон, и далее провести анализ выделенных веществ методом ЯМР.

Предварительная очистка образца позволяет значительно сократить нагрузку на привитые группы сорбента, а также облегчить выделение компонентов из исследуемой группы гликозидов. Образцы чая подвергали процедуре ультразвукового экстрагирования в водно-метанольной среде, после чего проводили последовательное экстрагирование диэтиловым эфиром (эфирный слой отбрасывали) и н – бутиловым спиртом (см. п. 2.2.4). Полученные хроматограммы экстрактов из образца до и после очистки приведены на рисунке 5.4.

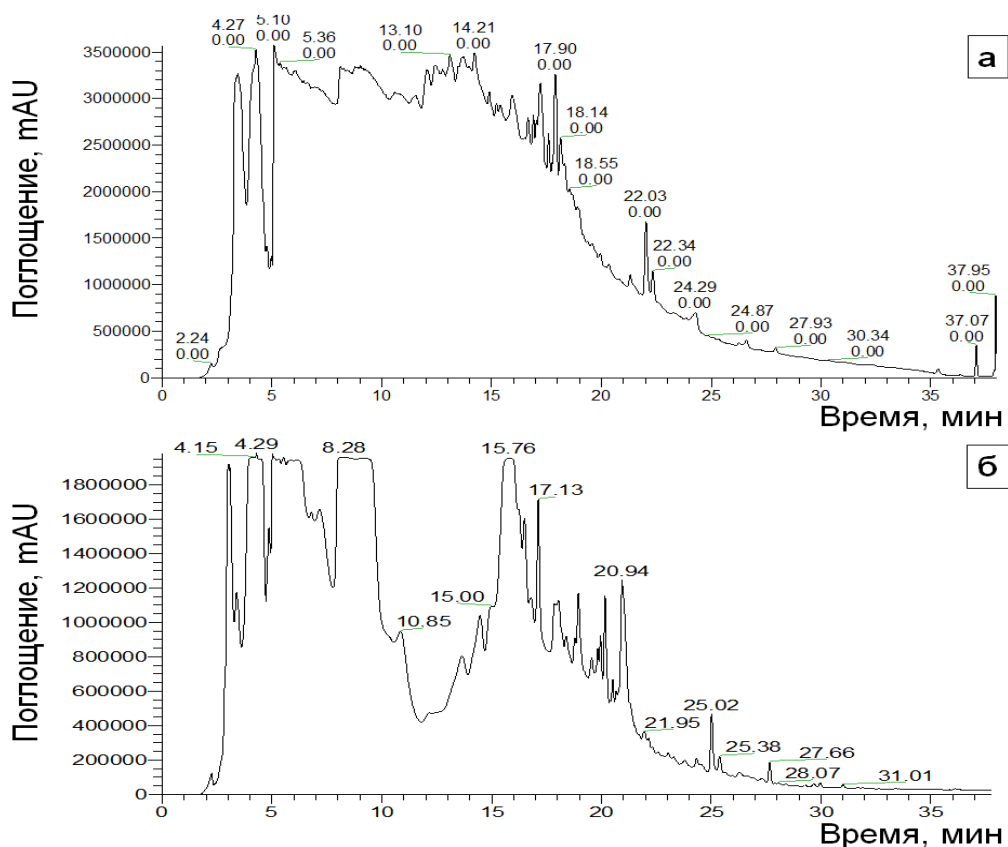


Рисунок 5.4 – Хроматограммы экстрактов женьшеневого улуна до (а) и после (б) проведения жидкость – жидкостной экстракции. УФ-детектирование: 203 нм.

Из литературных данных известно несколько основных вариантов возможного отщепления сахаридных цепочек, а именно использование щелочного и кислотного гидролиза [271-275]. Недостатком гидролиза в среде соляной кислоты является возможность протекания побочных реакций, таких как эпимеризация,

гидроксилирование и циклизация боковой цепи образующихся продуктов реакции, а проведение при повышенной температуре может вызвать термическую деструкцию молекул. В то же время щелочной гидролиз не всегда оказывается достаточно эффективным. Поэтому было решено опробовать три способа проведения гидролиза: 1) с использованием 1 М раствора соляной кислоты в смеси метанол:деионизованная вода (50:50) при температуре 80°C в течение 3 часов [271]; 2) с использованием 2 М раствора ТФУК в деионизованной воде при 120°C в течение 3 часов [272]; с добавлением сухого NaOH к очищенному экстракту из женьшеневого чая и выдерживании при 80°C в течение 6 часов [273-275].

В результате проведения щелочного гидролиза в жёстких условиях (90°C, 24 часа) наблюдалось не только отщепление сахаридных заместителей, но и изменение структуры агликона и образование нескольких продуктов. Пики агликона и исходных сапонинов отсутствовали на масс-хроматограмме по выделенным ионам, а в масс-спектрах обнаруженных пиков отсутствовал паттерн фрагментации, характерный для исследуемой группы соединений. Проведение щелочного гидролиза в более мягких условиях приводит к образованию ряда моногликозилированных промежуточных продуктов реакции.

При проведении реакции гидролиза в кислой среде с 1 М раствором соляной кислоты и 2 М трифторуксусной кислотой были получены схожие результаты. На масс-хроматограммах по выделенным ионам были обнаружены пики с временем удерживания 31.75 и 32.28 минут, которые относились к двум изомерным формам выделяемого агликона (рис. 5.5Б), их масс – спектры приведены на рисунке 5.6. Присутствующий в масс-спектрах сигнал иона с m/z 507 относится к аддукту молекулы агликона с натрием $[M+Na]^+$.

Однако в случае проведения кислотного гидролиза с 1 М HCl обнаруживалась значительно меньшая доля изомера. Экстракт упаривали досуха и перерастворяли в 5%-ном растворе метилового спирта (рис. 5.7). Выделение агликона осуществляли путём сорбционного концентрирования на сорбенте Discovery DSC-18 с использованием последовательного элюирования равными объемами смеси метанол – вода с различным процентным соотношением.

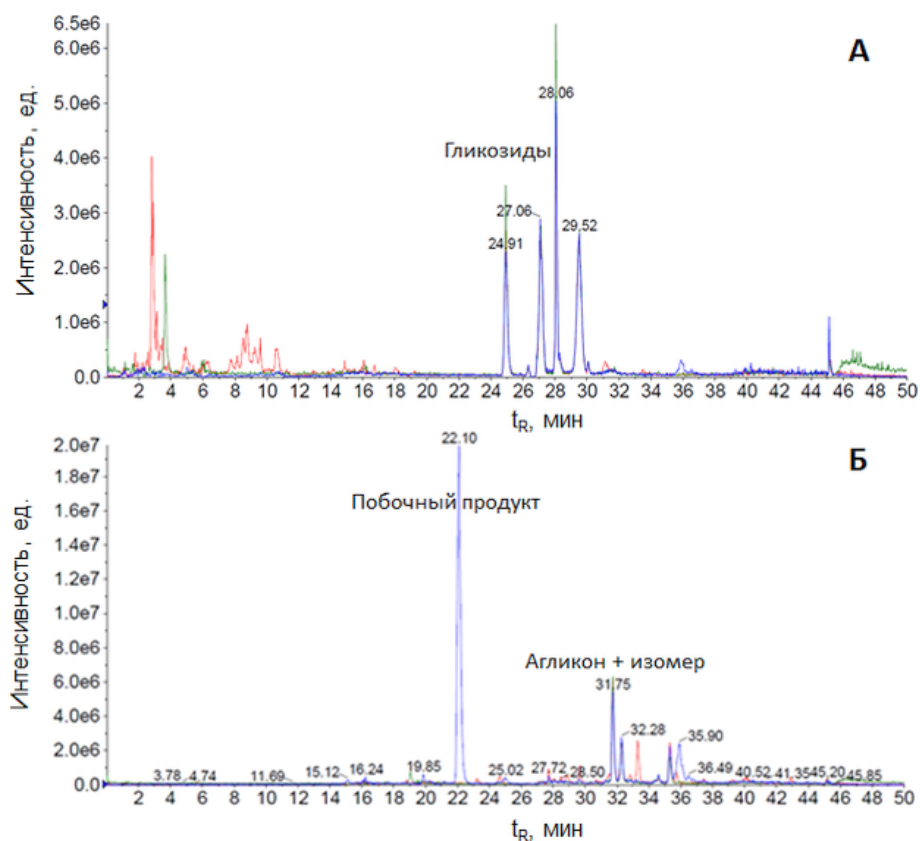


Рисунок 5.5 – Масс-хроматограммы очищенного экстракта женьшеневого улуна до проведения гидролиза (А), после кислотного гидролиза раствором 2 М трифторуксусной кислоты (Б) в режиме СИМ: m/z 421, 439, 467.

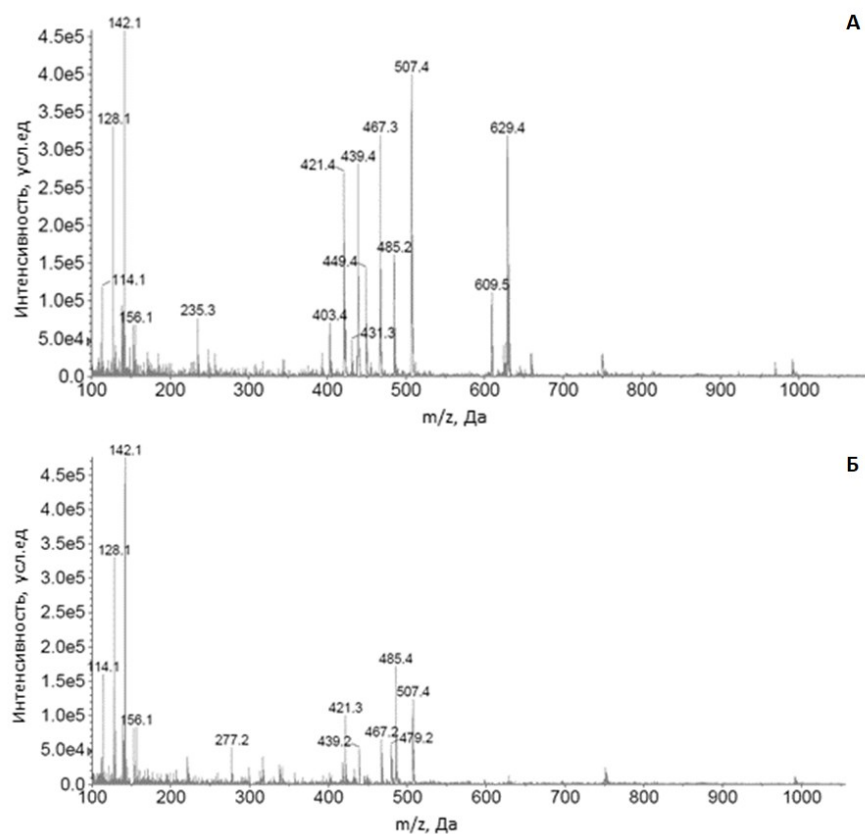


Рисунок 5.6 – Масс-спектры ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов соединений с временем удерживания 31.75 минут (А) и 32.28 минут (Б).

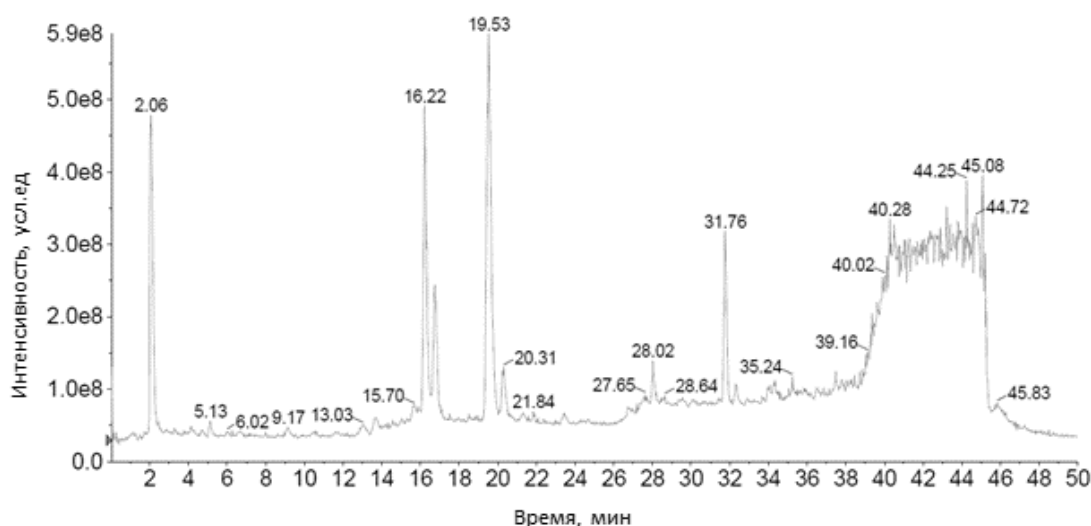


Рисунок 5.7 – Масс-хроматограмма очищенного экстракта женьшеневого улуна после проведения гидролиза 1 М раствором соляной кислоты в режиме регистрации полного ионного тока.

Для отделения основного примесного соединения с m/z 315 (19.53 мин) и других более полярных примесей, а также предотвращения совместного выделения более неполярного компонента гидролизата (m/z 637, время удерживания 37.53 мин), подобраны подходящие составы элюента. Наилучшее извлечение целевого компонента наблюдалось при использовании 71%-ного раствора метилового спирта в воде (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Степень извлечения сапогенина и его предполагаемого изомера из картриджа для сорбционного концентрирования Discovery DSC-18 смесями метанол – вода

Доля метанола	Примесное соединение с m/z 315	Агликон	Изомер	Примесное соединение с m/z 637
Пропускание	6	11	4	5
20 %	3	2	1	0
55 %	86	4	3	1
71 %	4	83*	91	4
90 %	1	1	1	89

* за 100 % принята сумма площадей пиков на хроматограмме всех элюатов

Для полного отделения мешающей примеси (m/z 315) требовался значительный объем элюента, используемого для предварительной промывки сорбента: 60 мл 55%-ного раствора метанол – вода на 5 мл экстракта. Помимо затрат времени и растворителя, такая процедура неэффективна, поскольку последующее длительное упаривание растворителя сопряжено с возможными потерями целевого соединения. Для сокращения объема растворителя для удаления примесей и

выделения агликона следует повышать его элюирующую силу. В варианте обращенно-фазового сорбента в роли такого растворителя может выступать изопропанол. Действительно, для полного элюирования сорбированного сапогенина оказалось достаточным использование 10 мл 40%-ного раствора изопропанола в воде. Кроме того, предварительное десятикратное разбавление экстракта позволило снизить потери целевого вещества при пропускании и промывке за счет сокращения нагрузки на сорбент из-за сорбции матричных компонентов (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Степень извлечения сапогенина и его предполагаемого изомера из картриджа для сорбционного концентрирования *Discovery DSC-18* смесью изопропанол – вода

Доля изопропанола	Примесное соединение с m/z 315	Агликон	Изомер	Примесное соединение с m/z 637
Пропускание	3	1	1	0
20 %	2	0	0	0
40 %	79	93*	94	37
60 %	10	5	4	62
80 %	7	0	0	1

* за 100 % принята сумма площадей пиков на хроматограмме всех элюатов

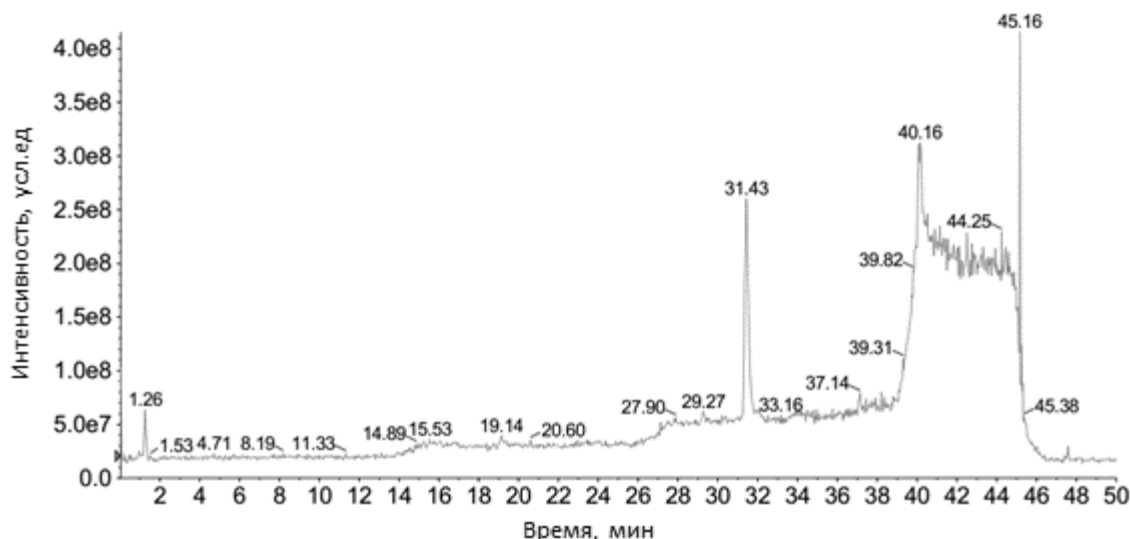


Рисунок 5.8 – Масс-хроматограмма очищенного экстракта женьшеневого улуна после кислотного гидролиза раствором 1 М соляной кислоты и извлечения с картриджа 37.5%-ным раствором изопропанола в воде в режиме регистрации полного ионного тока.

В итоге предложенная схема выделения сапогенина женьшеневого улуна после гидролиза включала пропускание, 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 %. Хроматограмма по полному ионному току выделенной фракции приведена рисунке 5.8.

Предложенный подход двухстадийной жидкость-жидкостной очистки с последующим сорбционным концентрированием использовали для выделения 10.4 мг агликона. Навеску (около 1 мг) полученного агликона перерастворяли в дейтерированном пиридине-D5 для определения его структуры методом спектроскопии ЯМР.

5.1.3 Микропрепаративное хроматографическое выделение гликозида женьшеневого улуна

Для подтверждения правильности сделанных на основании ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МСВР данных выводов о структурах гликозидов в составе женьшеневого улуна, а также установления положения заместителей, выделяли достаточное для ЯМР анализа количество одного из обнаруженных веществ (пик 9, рис. 5.3) после проведения очистки исходного экстракта из женьшеневого улуна (см. п. 2.2.4).

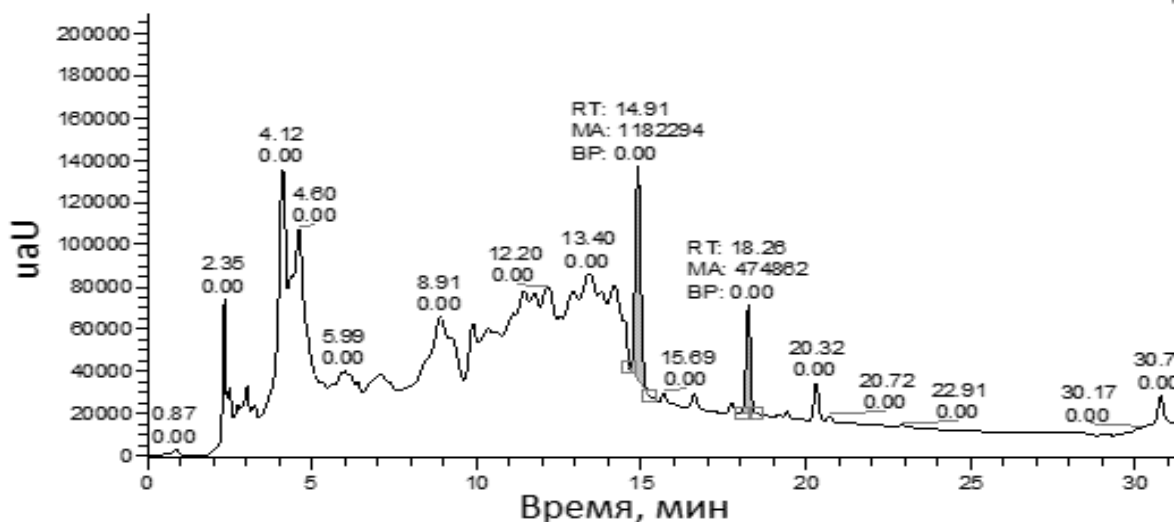


Рисунок 5.9 – Хроматограмма экстракта женьшеневого улуна после проведения жидкость-жидкостной экстракции и твердофазной очистки. УФ-детектирование: 203 нм.

Для выделения пика с временем выхода 18.3 минуты (рис. 5.9) использовали программу градиентного элюирования (см. п. 2.2.4) на микропрепаративной системе с используемой хроматографической колонкой SUPELCOSIL LC18. Время отбора целевого компонента контролировали по сигналу УФ-детектора на длине волны 203 нм. Чистота выделенной фракции, оцененная методом ВЭЖХ-МС, превышала

95%. Для эффективного удаления растворителя после хроматографического разделения образец лиофилизировали (см. п. 2.2.4). Полученные таким образом 3.1 мг индивидуального компонента A-Glc(Ac)Glc разделили на несколько навесок, одну из которых (около 1 мг) перерастворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде для определения его структуры методом спектроскопии ЯМР.

5.1.4 Определение структур выделенных соединений методом спектроскопии ЯМР

Определение структуры выделенного агликона. Для выделенного агликона регистрировали спектры ^1H и ^{13}C (таблица П1, рис. П1 – П2) в дейтерированном пиридине- d_5 . Углеродные спектры ^{13}C , зарегистрированные в режиме JMOD (рис. П2), содержали сигналы 5 метильных сигналов атомов углерода, 4 третичных и 3 четвертичных, в то время как в структуре гинсенозидов содержится 8 третичных атомов углерода и 4 четвертичных. Присутствие системы циклопропильного кольца проявляется в виде двух дублетов на 0.64 and 0.34 единиц хим. сдвига в спектре протонного магнитного резонанса (ПМР) (рис. П1), а также в виде сигналов 29.75 (т, C – 19), 32.02 (C – 10) и 26.37 (C – 9) в углеродном спектре ^{13}C [328]. Наличие ненасыщенного лактонного кольца, присоединенного к C – 17 атому боковой цепи продукта гидролиза, установлено по наличию сигнала δ 166.3 в спектре ^{13}C и характеристичных β – СН олефиновых протонов. Предположение также подтверждается наличием дальнедействующих HMBC – корреляций (рис. П3) H – 26/C – 25, H – 26/C – 27, H – 26/C – 24, H – 24/C – 22 и H – 21/C – 22. Наблюдаемые H – 18/C – 17 и H – 21/C – 17 корреляции способствовали установлению положения третичной метильной группы C – 13. S-стереоконфигурация атома C – 22 установлена на основании наличия сигнала в ПМР спектре для H – 22 (д. д., δ 4.49). Совокупность данных фактов позволила отнести неизвестный сапогенин к ранее описанному соединению — абрусогенину, выделенному из листьев растения *Abrus precatorius* [328].

Определение структуры выделенного гликозида. Установление структуры сахаридных заместителей проводили на примере соединения 9 (таблица 5.1), для которого, исходя из полученных ЯМР данных о структуре остова и ВЭЖХ-МС данных, предположено строение A-3-Glc(Ac)Glc, где A — абрусогенин. Установление структуры проводили методами одно – и двумерного ЯМР, а также с

помощью ВЭЖХ-МСВР. Согласно данным ВЭЖХ-МСВР, брутто-формула соединения отвечает составу $C_{44}H_{67}O_{16}$ ($[M+H]^+$ m/z 851.4432, $[C_{44}H_{67}O_{16}]^+$ m/z 851.4429 (0.34 м.д.). Среди сигналов спектра ПМР (рис. П4) присутствовали отклики 6 третичных метильных групп, аксиального протона (H – 3) с δ 3.98, двух аномерных протонов с хим. сдвигом δ 4.35 (д, $J = 7.5$ Гц) и 4.32 (д, $J = 7.5$ Гц). Сигнал лактонного карбонила (C – 26) зарегистрирован со значением хим. сдвига δ 166.19 (рис. П5), его положение подтверждалось наличием НМВС – корреляции H – 27/C – 24, H – 27/C – 25, H – 27/C – 26 и H – 24/C – 26 (рис. П6). Характеристичные сигналы циклопропильного кольца наблюдались со значениями хим. сдвига 0.55 и 0.35 м.д. Стереоконфигурацию кислотного заместителя при атоме C-4 (рис. П7) устанавливали, согласно литературным данным, по значению хим. сдвига C – 4 (δ 53.38), лежащего в диапазоне δ 53 – 55 и соответствующего α – положению [328]. Количество наблюдаемых сигналов алкеновых, спиртовых и алкильных углеродов находилось в соответствии с предположенной структурой (таблица П2). Величины констант связывания аномерных протонов сахаридных заместителей позволили установить их β – конфигурацию. Конфигурацию гликозидных связей устанавливали по наличию НМВС – корреляций: H – 1' ($\delta = 4.32$) первого заместителя Glc и C – 3 ($\delta = 84.42$) агликона, а также между H – 1'' ($\delta = 4.35$) второго заместителя Glc и C – 2' ($\delta = 81.95$) первого заместителя Glc. Структура выделенного соединения соответствовала: 3 β -O-[β -D-глюко-пиранозил(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-6-ацетилглюкопиранозил)-(20S,22S)-3 β ,22-дигидрокси-9,19-циклоланост-24-ен-26,29-овой кислоте (рис. П7).

5.2 Разработка способа групповой идентификации тритерпеновых и стероидных гликозидов

Рассмотренная в предыдущем разделе задача идентификации гликозидов абруса, содержащихся в женьшеневом чае, будучи один раз решенной с помощью выделения целевых компонентов и подтверждения их структур методом ЯМР спектроскопии, открывает возможность далее проводить быструю групповую идентификацию/дерепликацию этих соединений в разных объектах. Так, используя построение масс-хроматограмм по выделенным ионам (в методе ГХ-МС их часто называют «масс-фрагментограммами»), относящимся к сигналам из паттерна

фрагментации абрусогенина, можно быстро и наглядно сравнивать групповые профили этих соединений в экстрактах из чая и листа абруса (рис. 5.10).

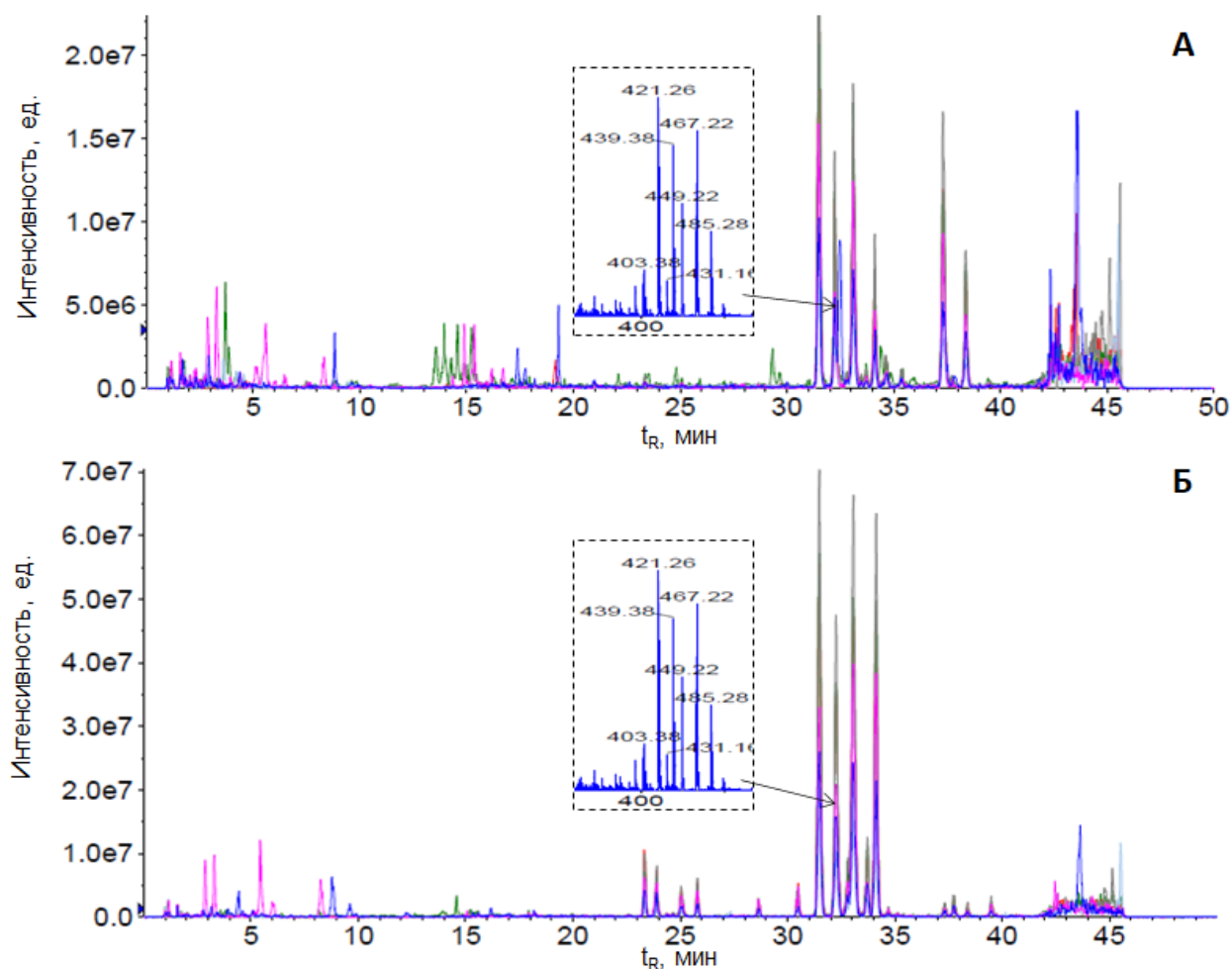


Рисунок 5.10 – Масс-хроматограммы экстрактов женьшеневого улуна (А) и листьев абруса молитвенного (Б) в режиме СИМ: красный - m/z 485.3, синий - m/z 467.3, зеленый - m/z 439.3, серый - m/z 421.3, фиолетовый - m/z 449.3, голубой - m/z 403.3.

Еще одним важным преимуществом такого подхода является возможность его использования в случае применения ВЭЖХ-МС систем низкого разрешения, включая моноквадрупольные приборы, поскольку фрагментация может происходить в источнике ионизации («In-Source Decay») и/или на входе в масс-анализатор при соударении с молекулами азота, используемого в качестве газа-завесы.

Таким образом, для выбора условий групповой идентификации тритерпеновых и стероидных гликозидов необходимо а) изучить особенности ионизации и фрагментации каждой исследуемой группы гликозидов; б) выделить паттерны фрагментации их основных агликонов; в) оценить возможности использования соотношений интенсивности сигналов в этих паттернах; г) соотнести

экспериментальные наблюдения с литературными данными и по возможности расширить списки детектируемых ионов и, соответственно, различных групп гликозидов; д) оценить ограничения предложенного подхода; е) в качестве апробации разработанного подхода, провести предварительную идентификацию и присвоить фрагментарные формулы обнаруженным гликозидам в содержащих их растительных материалах и продуктах, а также продемонстрировать возможность сопоставления групповых профилей гликозидов для оценки компонентного состава таких объектов.

5.2.1 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация гинсенозидов женьшеня

Поскольку известно, что гинсенозиды женьшеня обладают слабым УФ-поглощением в неселективной области 190-220 нм [331,332], перспективно использовать современные варианты МС детектирования для контроля качества растительных материалов и продуктов на основе женьшеня.

Вначале необходимо выбрать способ ионизации (ЭРИ или ХИАД) и условия МС детектирования. ЭРИ является приоритетным способом ионизации, так как гинсенозиды в своем составе имеют гидроксильные группы, которые способствуют процессу ионизации, и нет необходимости использовать ХИАД, которая, как правило, используется для трудноионизируемых, слабополярных соединений. Процедура выбора условий МС детектирования с использованием ЭРИ включает в себя выбор значения потенциала декластеризации (ПД) на входе в масс-анализатор, подбор величины входного потенциала (ВП) на нулевом квадруполе МС детектора, соответствующих максимальной интенсивности исследуемого иона-предшественника и фрагментных ионов в масс-спектре. Для выбора режима детектирования проводили хроматографическое разделение в режиме изократического элюирования. Получили хроматограммы стандартного раствора (15 мкг/мл) гинсенозида Rd, выбранного в качестве реперного соединения, в режиме сканирования по полному ионному току для положительных и отрицательных ионов (рис. 5.11).

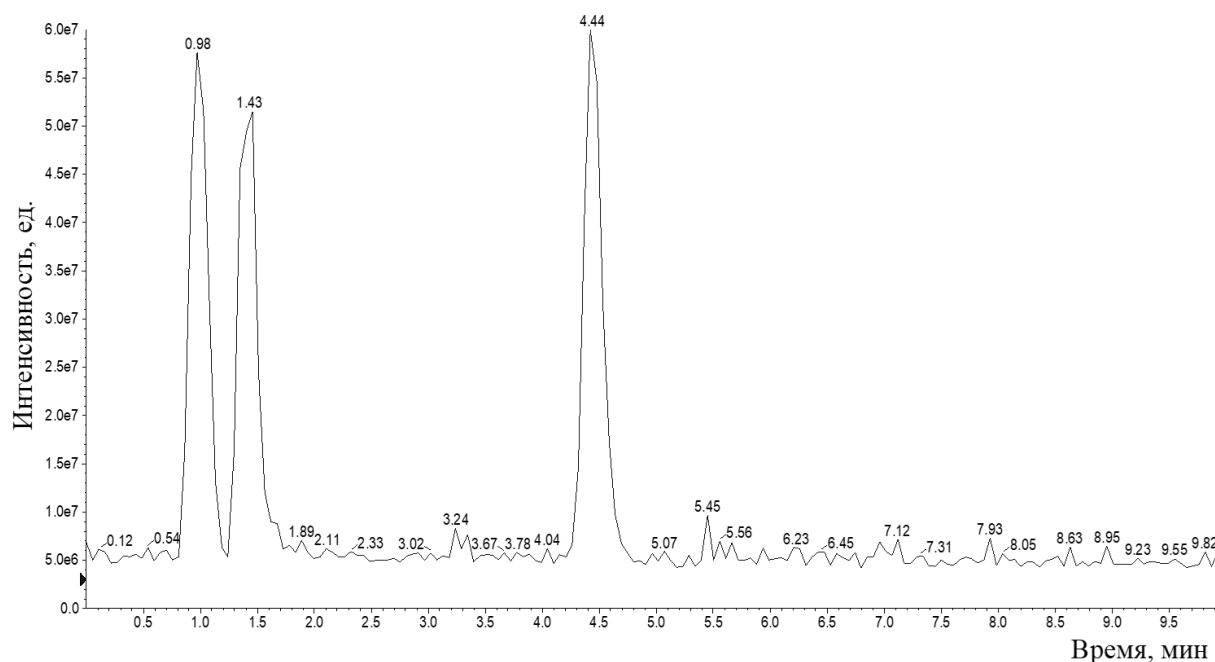


Рисунок 5.11 – Хроматограмма стандартного раствора гинсенозида Rd (15 мкг/мл) в режиме регистрации полного ионного тока.

В режиме сканирования для регистрации хроматограмм используется суммарный ионный ток в диапазоне m/z 100 – 1700 Да. При этом соотношение сигнал/шум (S/N) в режимах регистрации положительно и отрицательных ионов примерно одинаковое (рис. 5.12). В серии экспериментов было установлено, что для достижения максимальной интенсивности сигнала в режиме регистрации положительно заряженных ионов следует использовать следующие величины параметров: ВП – 10 В, ПД – 70 В и энергия соударений (ЭС) – 5 В.

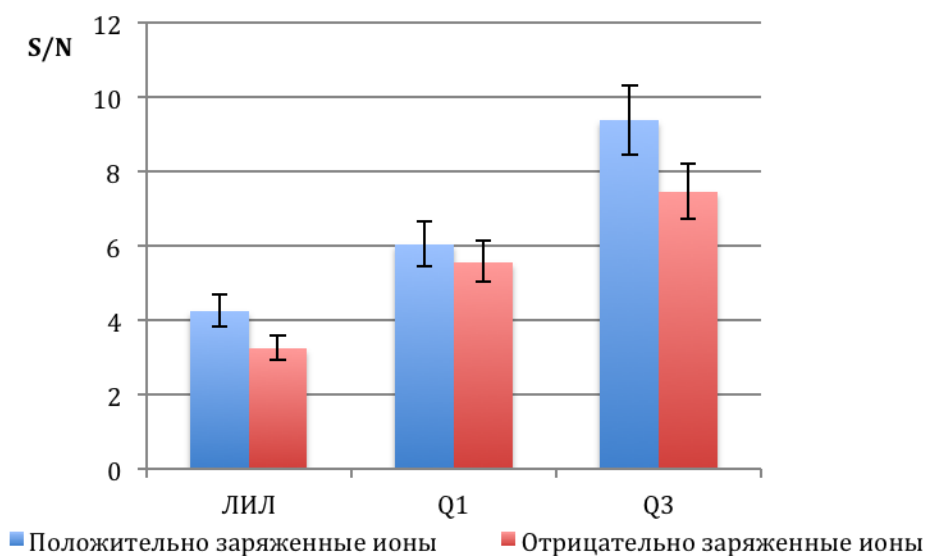


Рисунок 5.12 – Сравнение соотношения сигнал/шум (S/N) для положительно и отрицательных ионов в режиме сканирования, используя первый квадруполь (Q1), третий квадруполь (Q3) и линейную ионную ловушку (ЛИЛ). (n = 3, P = 0.95)

В масс-спектре, полученном в режиме регистрации положительных ионов, присутствуют характеристичные сигналы, образованные фрагментными ионами. Например, для гинсенозида Rd (рис. 5.13) наиболее интенсивными сигналами являются сигналы аддукта молекулы с ионом калия $[M+K]^+$ m/z 986.2, натрия $[M+Na]^+$ 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 $[M-GlcGlcGlc-3H_2O+H]^+$.

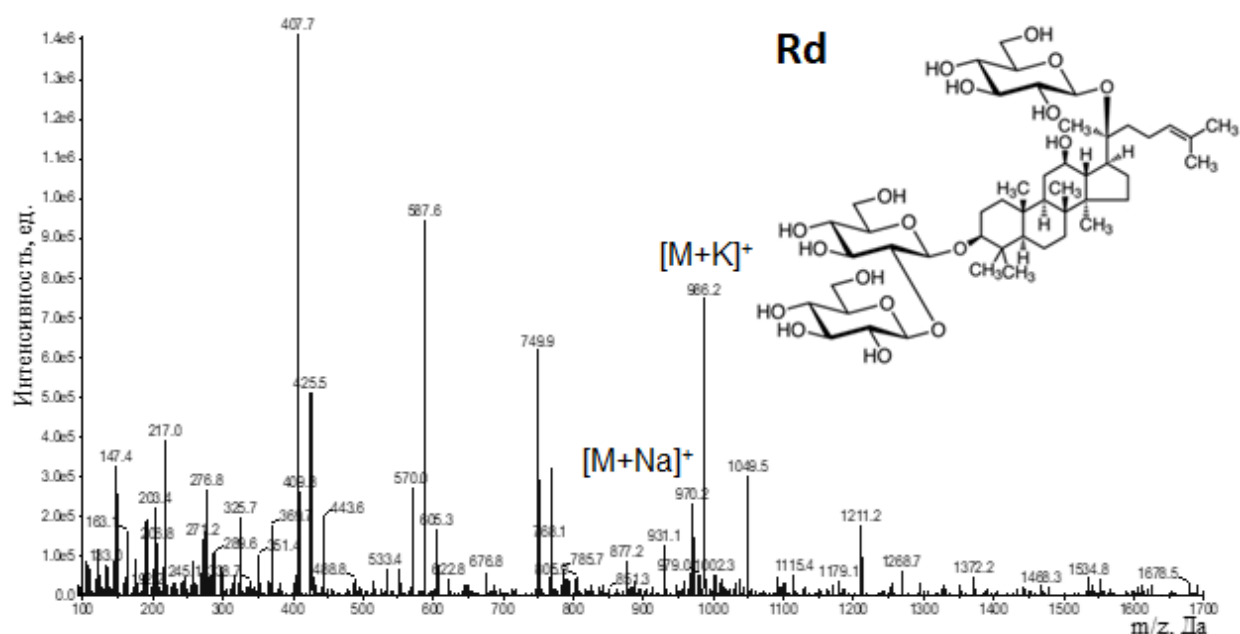


Рисунок 5.13 – Масс-спектр стандартного раствора Rd (15 мкг/мл) в режиме регистрации положительных ионов.

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 (рис. 5.14). 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, используя режим СИМ для регистрации положительных и отрицательных ионов добиться наибольшей чувствительности можно, если детектирование проводят по сигналам фрагментных ионов из паттерна фрагментации гинсенозида или сигналу депротонированной молекулы или аддукта с муравьиной кислотой, соответственно.

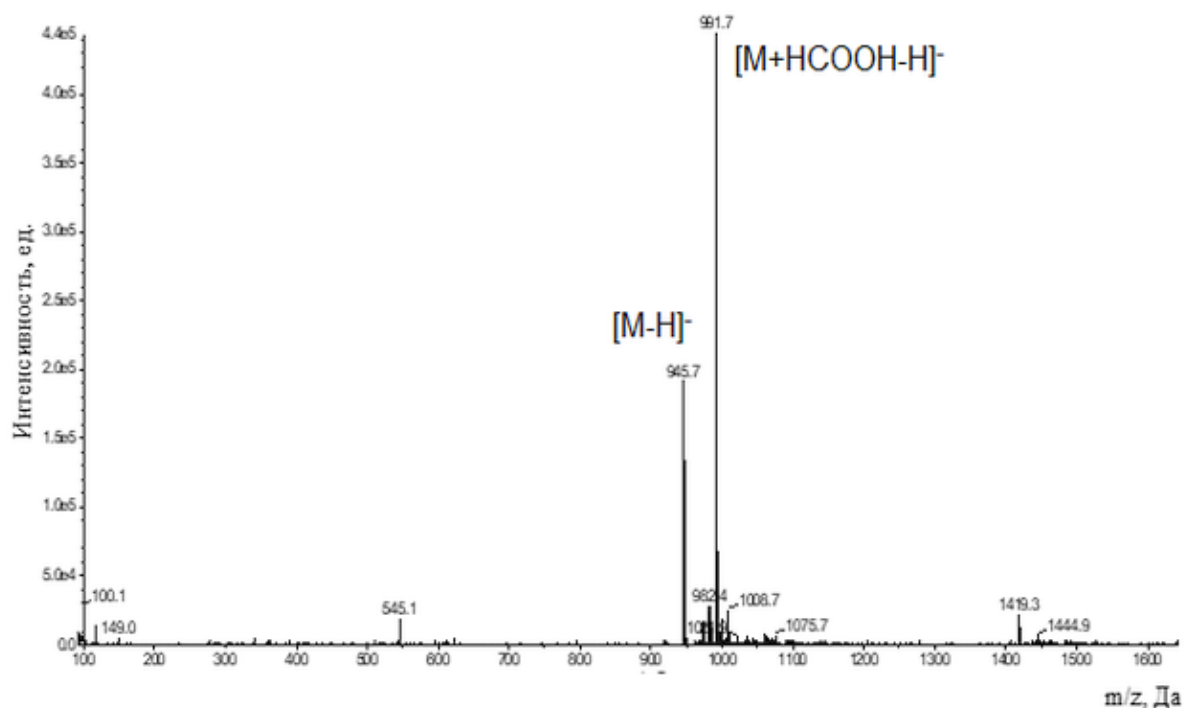


Рисунок 5.14 – Масс-спектр стандартного раствора Rd (15 мкг/мл) в режиме регистрации отрицательных ионов.

Выбор между различными режимами регистрации выбранных ионов с применением первого, третьего квадруполь и ЛИЛ обычно заключается в сравнении хроматограмм по интенсивности получаемых сигналов и соотношении сигнала к шуму. Сравнение хроматограмм раствора гинсенозида Rd по соотношению сигнал/шум в режимах СИМ для наиболее интенсивного фрагментного иона m/z 407.5 и сигнала депротонированной молекулы m/z 945.7 показало, что режим регистрации отрицательных ионов обладает потенциально большей чувствительностью при определении гинсенозидов (рис. 5.15).

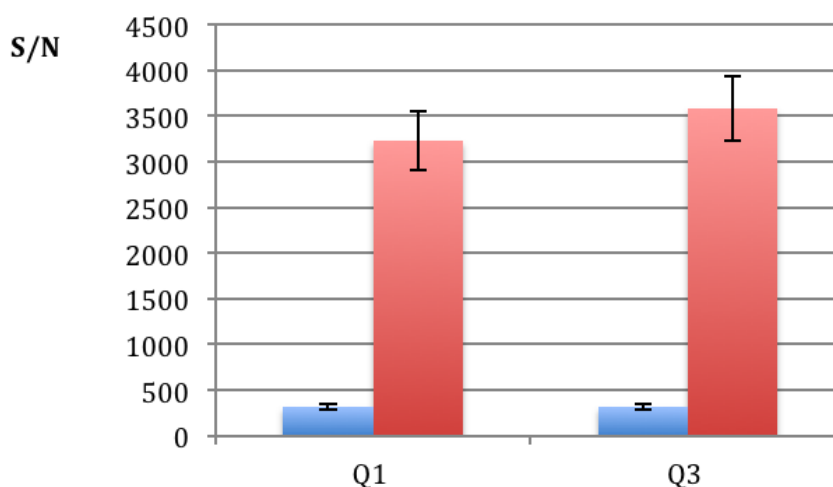


Рисунок 5.15 – Сравнение соотношения сигнал/шум (S/N) для положительных (синий) и отрицательных ионов (красный) в режиме СИМ, используя первый квадруполь (Q1), третий квадруполь (Q3). (n = 3, P = 0,95)

Интенсивность отдельных сигналов в режиме регистрации положительных ионов ниже, поскольку их больше (рис. 5.13), в том числе в этом режиме удастся получить групповые характеристичные сигналы, поскольку при последовательном отщеплении сахаридных фрагментов образуются фрагментные сигналы, отвечающие остову (агликону) молекулы гинсенозида. Такие сигналы присущи всем гинсенозидам группы, в рассматриваемом примере – ППД гинсенозидам, и являются одними из наиболее интенсивных в спектре (рис. 5.13), что может быть использовано для групповой идентификации и количественной оценки содержаний гинсенозидов.

Образование положительного заряда во время ЭРИ может происходить при протонировании свободных от заместителей гидроксильных групп с одновременным отщеплением одной или нескольких оставшихся гидроксильных групп в форме молекул воды. Причем гидроксильные группы, принадлежащие боковой цепи, намного легче отщепляются по сравнению с гидроксильными заместителями в циклической части молекулы. Это можно продемонстрировать на примере ППТ гинсенозида Rh₁, так, свободная гидроксильная группа при атоме углерода C20 легко отщепляется в виде молекулы H₂O с образованием двойной связи (рис. 5.16). Напротив, в молекуле гинсенозида F₁ глюкозный заместитель расположен при атоме углерода C20, поэтому данная гидроксильная группа, как и соседняя с ней, намного меньше склонны к отщеплению и появлению сигнала с m/z 621.2.

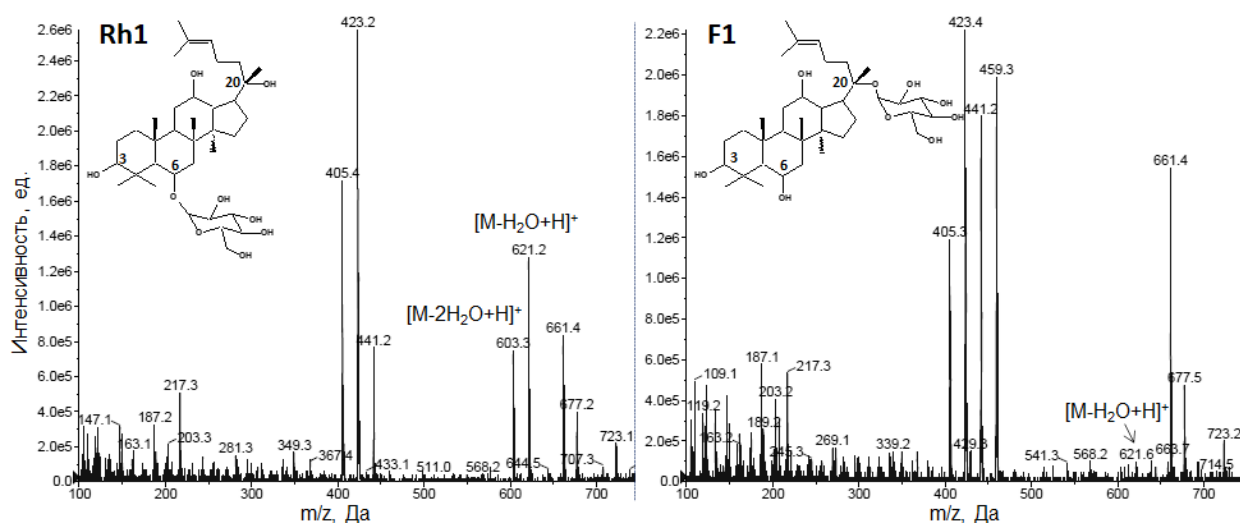
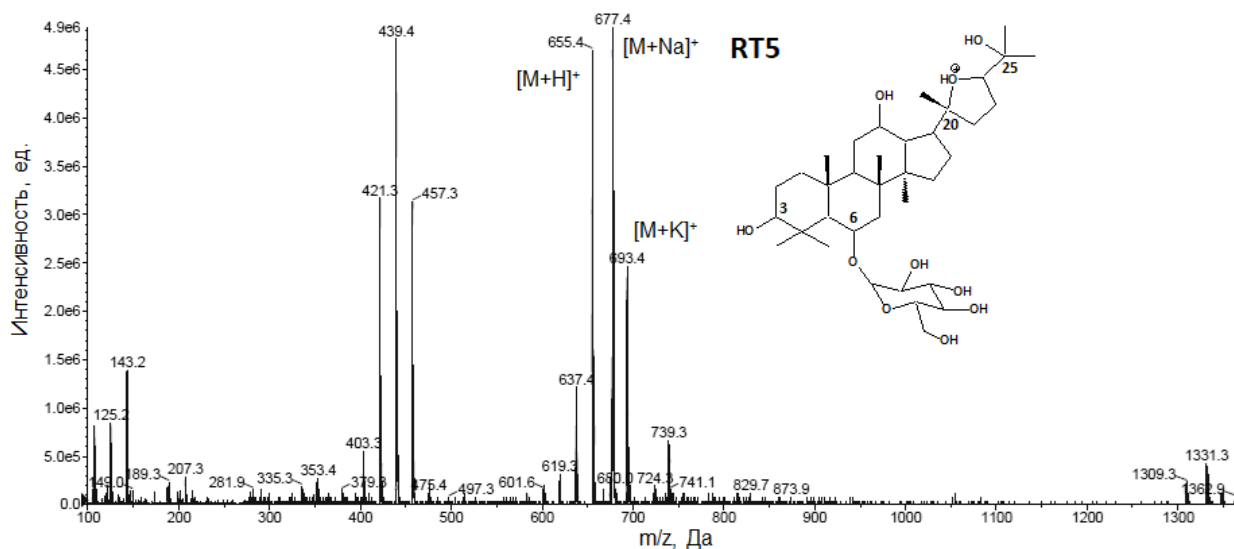


Рисунок 5.16 – Масс-спектры ЭРИ гинсенозидов Rh₁ и F₁ в режиме сканирования положительных ионов с использованием ЛИЛ.

В обоих случаях наиболее интенсивным фрагментом оказался ион с m/z 423.2. Наличие этого сигнала характерно и для других ППТ-гинсенозидов.

Еще один распространенный тип агликона – окотиллол (ОТ) намного реже встречается в структурах гинсенозидов. На рисунке 5.17. Представлен масс-спектр псевдогинсенозида RT_5 .



Наличие в структуре RT_5 дополнительной гидроксильной группы при атоме углерода C25, приводит к тому, что, в отличие от ППД и ППТ гинсенозидов, в его масс-спектре присутствует 5 характеристичных сигналов с m/z 475, 457, 439, 421 и 403 соответственно. Кроме вышеперечисленных, диагностическим ионом для определения псевдогинсенозидов может служить фрагментный-ион, отвечающий структуре циклического фрагмента в боковой цепи с m/z 143, однако его интенсивность значительно меньше. Кроме того, чем больше выбранный фрагмент структуры, тем селективнее детектирование данного иона на фоне сигналов минорных примесей других компонентов растения и шумовых сигналов. Однако, чем больше характеристичных сигналов из паттернов фрагментации (рис. П8-П12) включено в число диагностических ионов, тем легче отличить между собой изомерные молекулярные основания. Так, например, другая малочисленная группа гинсенозидов, обладающая пентациклическим агликоном олеаноловой кислоты (ОК), демонстрирует присутствие в масс-спектрах интенсивного сигнала фрагментного иона с m/z 439 (рис. 5.18).

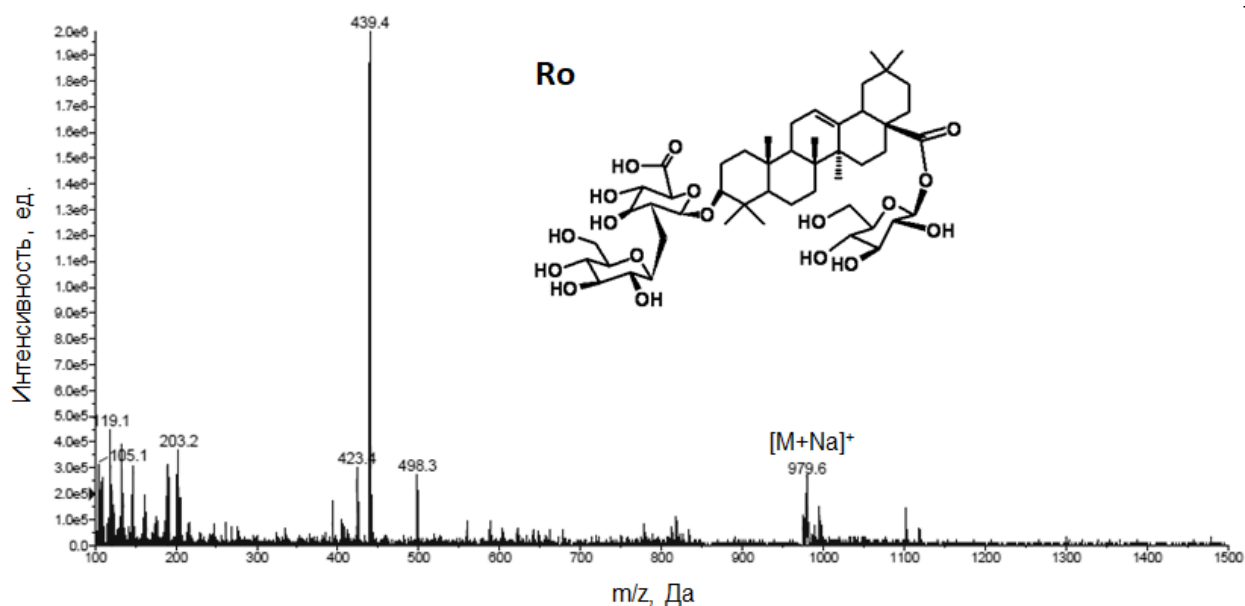


Рисунок 5.18 – Масс-спектр ЭРИ гинсенозида Ro в режиме сканирования положительных ионов с использованием ЛИЛ.

Таким образом, в случае использования одного (обычно наиболее интенсивного) диагностического иона для каждой группы анализов одинаковые ионы были бы выбраны для ОТ и ОК гинсенозидов. Поэтому целесообразно использовать наборы характеристичных сигналов.

Таким образом, при анализе индивидуальных стандартных образцов было установлено, что масс-спектры различных групп гинсенозидов содержат следующие характеристичные сигналы из паттернов фрагментации их агликонов – сапогенинов (таблица 5.4):

Таблица 5.4 – Значения m/z для диагностических ионов из 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

Как видно из приведенных в таблице 5.4 данных, для гинсенозидов с сапогенинам ППТ-типа характерно образование ионов с m/z 459, 441, 423 и 405, а в спектре гинсенозидов с ППД сапогенинами наблюдается наличие ионов с m/z 443, 425 и 407. Эти наборы ионов не только являются характеристичными для этих наиболее распространенных групп гинсенозидов, но и самыми интенсивными,

следовательно, целесообразно использовать эти сигналы для обнаружения гинсенозидов в экстрактах.

Однако отнесение неизвестного гликозида к группе содержащих заданный тип агликона следует проводить с осторожностью, поскольку многообразие агликонов велико и совпадение части или даже всех сигналов с заданным паттерном не гарантирует правильности определения групповой принадлежности [330]. Следует также принимать во внимание, что соотношение интенсивностей сигналов из паттерна фрагментации может быть непостоянным, например, из-за различной конструкции источников ионизации оно может отличаться при работе на приборах разных фирм-производителей.

При выработке критерия для групповой идентификации гликозидов следует учитывать всю доступную в литературе информацию о схожих агликонах при возможности их нахождения в одном объекте, как правило, это сходие по структуре соединения из родственных видов растений, но при анализе комплексных лекарственных препаратов и пищевых добавок мешающими могут оказаться другие компоненты и артефакты. Так при термической обработке корней женьшеня образуются дегидратированные производные ППТ и ППД гинсенозидов (сапогенины В7-а и В7-б [115]). При сопоставлении их масс-спектров с их нативными ППТ аналогами (рис. 5.19) можно отметить отсутствие сигнала с m/z 459, однако в одном случае, который является исключением, такой сигнал отсутствует и для ППТ гинсенозида Rh₁. Кроме того, соотношения интенсивностей сигналов из паттерна фрагментации ППТ сапогенина сильно отличаются.

Таким образом, выбирая между ППТ агликоном и его дегидратированным аналогом, нужно учитывать условие того, что фрагментарная формула не должна противоречить молекулярной. В рассмотренном примере найденные из масс-спектра разности сигналов между молекулярным аддуктом с натрием (m/z 789.5) и фрагментными ионами указывали именно на наличие глюкозного и рамнозного заместителей и дегидратированного агликона.

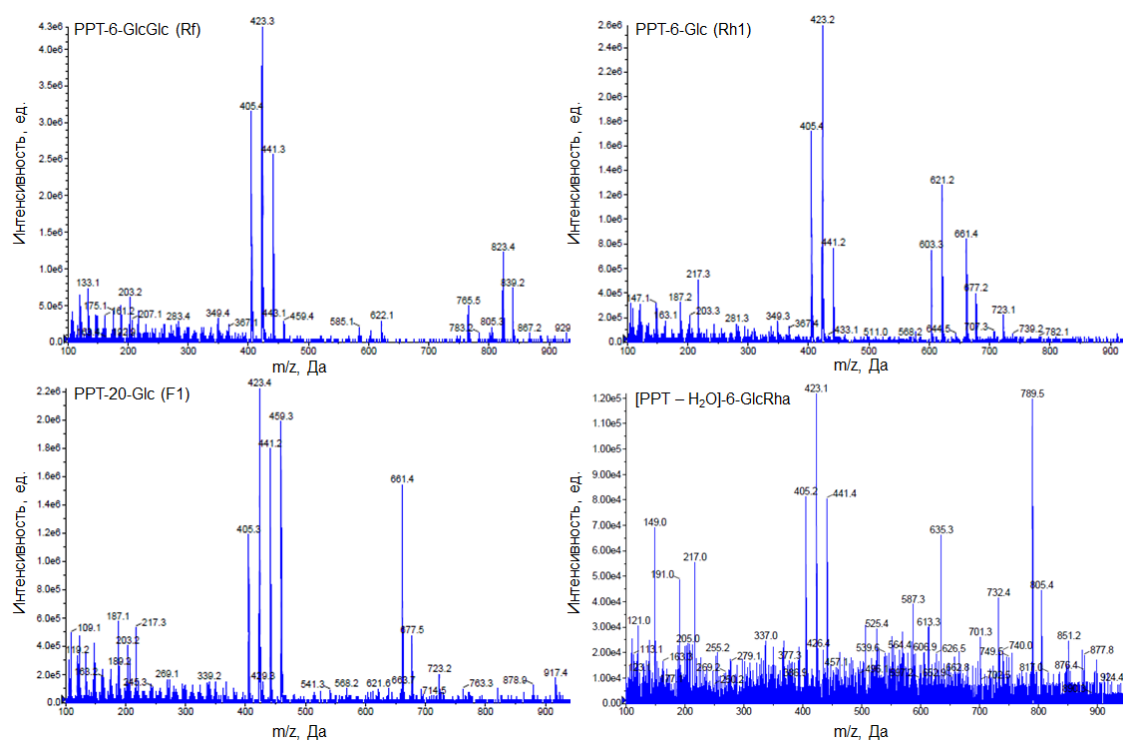


Рисунок 5.19 – Масс-спектры ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов гинсенозида Rf, гинсенозида Rh₁, гинсенозида F₁, и гинсенозида с дегидратированным ППТ сапогенином состава [PPT – H₂O]-6-GlcRha.

В итоге наиболее интенсивные сигналы фрагментных ионов из полученных паттернов фрагментации было решено использовать далее в качестве «диагностических» (таблица 5.4) для быстрого обнаружения гликозидов с заданным типом агликона. 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, с 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.

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 оно также может привести к частичной фрагментации ионов определяемых соединений. Исследование зависимости интенсивности сигналов выбранных диагностических ионов от параметров источника ионизации, в частности от ПД, необходимо для повышения чувствительности определения.

По сигналам диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов построены зависимости площадей пиков гинсенозидов ППТ, ППД и ОТ – типа от величины ПД. 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 (рис. 5.20).

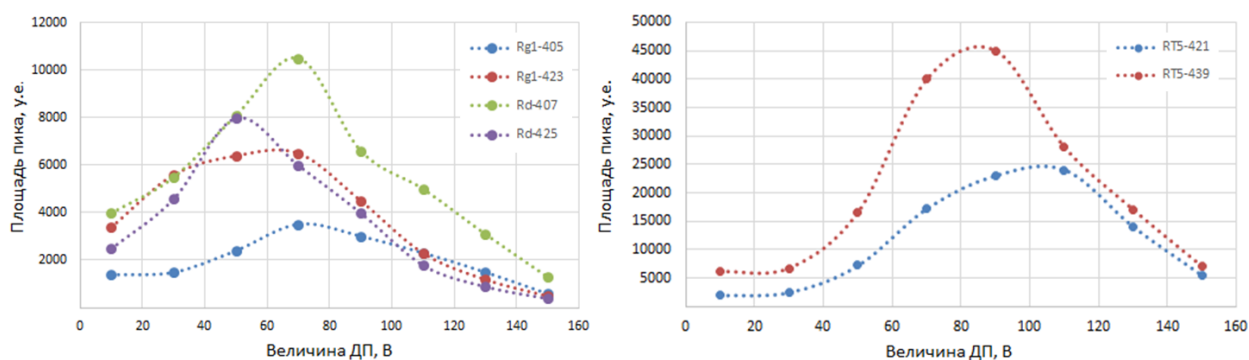


Рисунок 5.20 – Зависимость площадей пиков гинсенозидов от величины прилагаемого ПД. Для гинсенозидов ППТ – типа: синий — m/z 405; красный — m/z 423; ППД – типа: зеленый — m/z 407; фиолетовый — m/z 425; для гинсенозидов ОТ – типа: синий — m/z 421; красный — m/z 439.

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. 5.21). Параметр ПД устанавливали вблизи минимального и максимального из заданных фирмой – производителем значений, а также в середине интервала. Для прибора фирмы «Agilent» изменяли параметр напряжения на фрагменторе («Fragmentor Voltage»), соответствующий разности потенциалов между концами капилляра, и аналогичный ПД. Полученные результаты для гинсенозида ППТ – типа приведены на рисунке 5.21, для ППД и ОТ – типов — в приложении рис. П13 и П14.

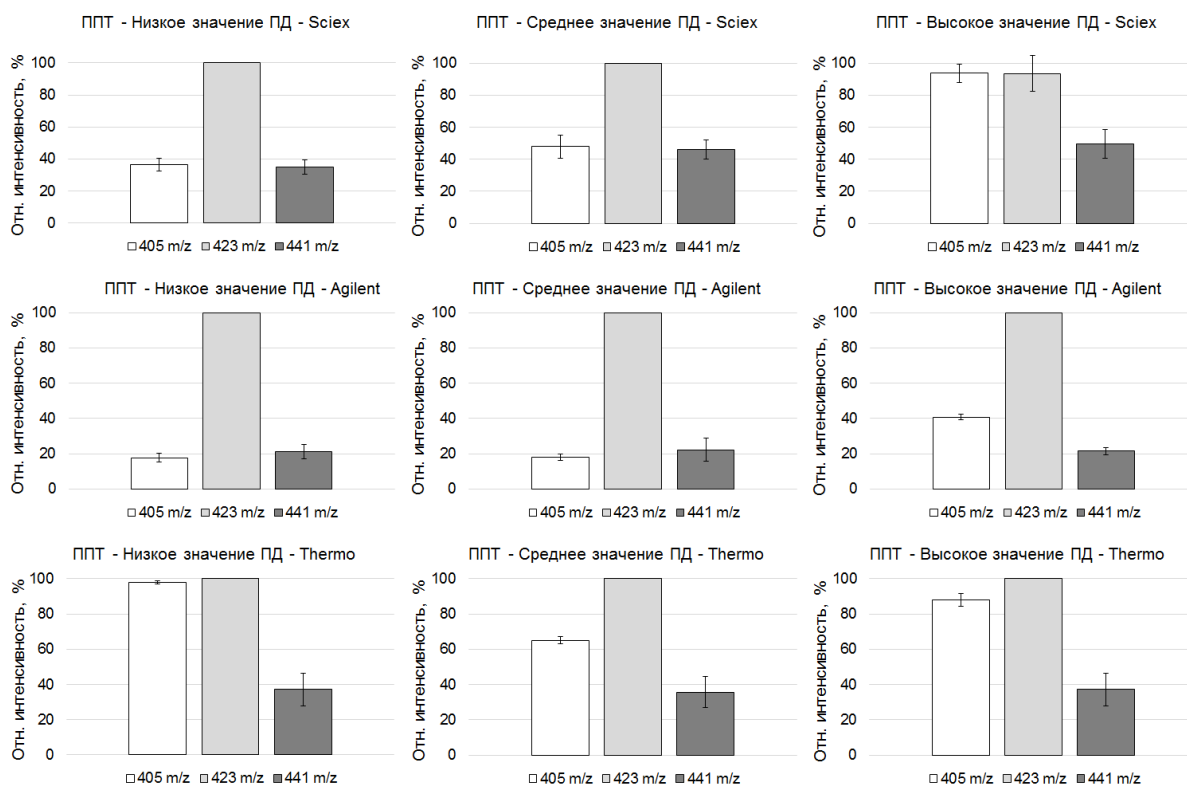


Рисунок 5.21 – Относительная интенсивность сигналов фрагментных ионов сапогенина ППТ – типа (белый — m/z 405, серый — m/z 423, чёрный — m/z 441) при низком, среднем и высоком значении ПД.

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 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 (рис. П14). 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 широком диапазоне 30 – 100 % (рис. П13). Данные особенности формирования масс-спектров необходимо учитывать при

разработке и переносе методики обнаружения и определения гинсенозидов с прибора одной фирмы на другое оборудование.

Таким образом, применение диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов позволит успешно обнаружить не только основные компоненты, но и следовые количества менее распространенных гинсенозидов, стандарты которых отсутствуют в лаборатории или коммерческом доступе. Однако при этом следует учитывать особенности применяемого оборудования, параметров ионизации и регистрации сигналов выбранных ионов.

Апробация разработанного подхода к идентификации гинсенозидов. 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. В работе [115] из корней трех видов женьшеня (*P. ginseng*, *P. notoginseng* и *P. quinquefolius*) было выделено более 620 гинсенозидов. 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 [333,334]. Таким образом, получение групповых гинсенозидных профилей является важной задачей в процессе контроля качества и изучения лекарственного потенциала того или иного женьшеневого сырья. Известно например, что ППТ гинсенозиды R_f и R₁, являются маркерами *P. ginseng* и *P. notoginseng* соответственно, а ОТ гинсенозиды, включая псевдогинсенозид F₁₁, характерны для *P. quinquefolius*, соответственно [167]. В то же время, соотношение ППТ и ППД гинсенозидов коррелирует с возрастом и частью растения [335]. Таким образом, 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. Для примера на рисунке 5.22 представлены хроматограммы экстрактов из корней азиатского и американского женьшеней, а также гранулированного женьшеневого чая.

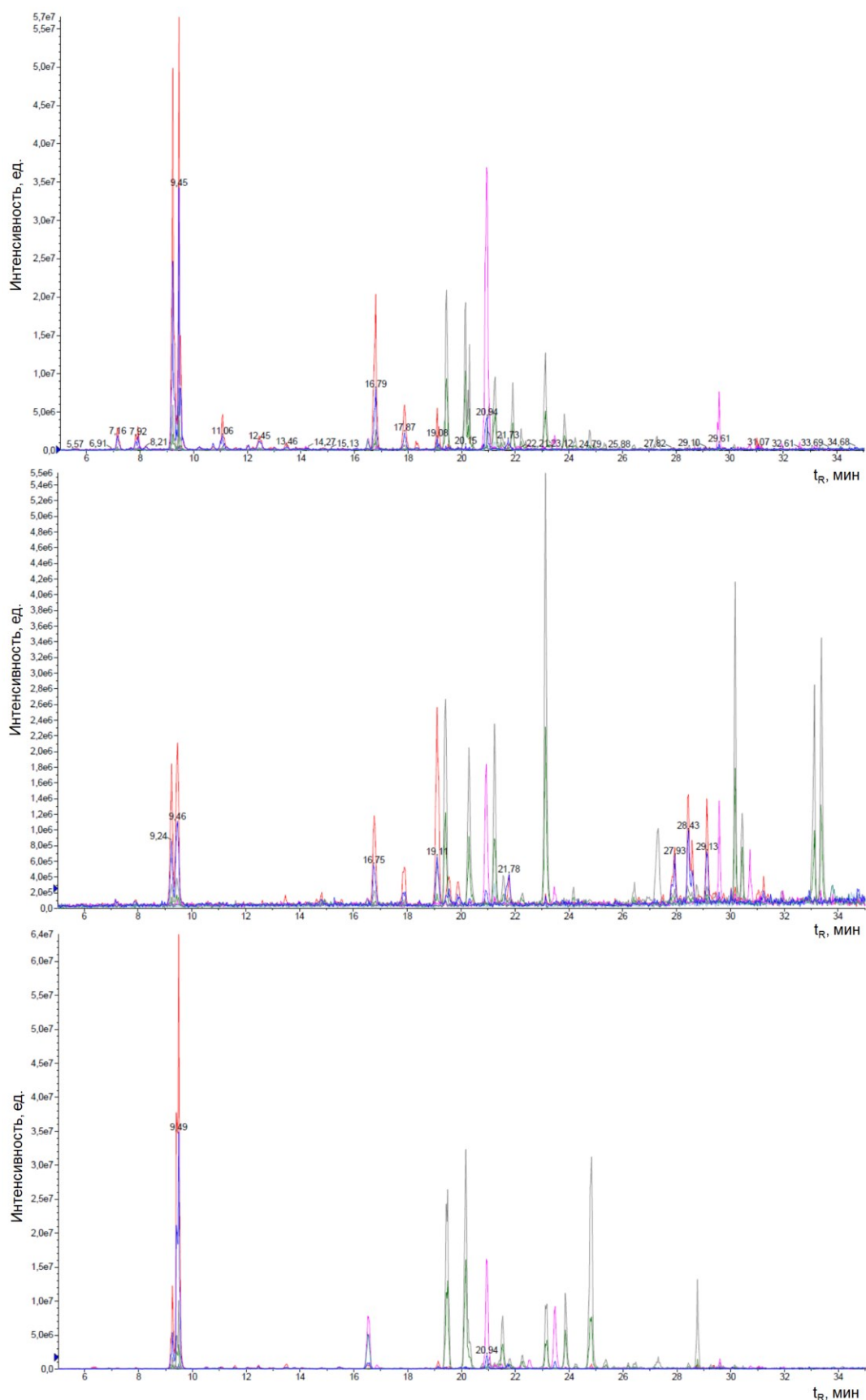


Рисунок 5.22 – Масс-хроматограммы экстрактов из корней азиатского женьшеня (А), из высушенных колец американского женьшеня (Б) и корейского женьшеневого чая (В) в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый- m/z 425.3, фиолетовый - m/z 439.3.

Таблица 5.5 – Фрагментарные формулы предварительно идентифицированных компонентов в женьшеневом сырье

Гинсенозид	Свежий корень (Дальний Восток)	Сухой корень (Дальний Восток)	Сухой корень (Брянская обл.)	Сухой корень (Сибирь)	Кольца сух. американского женьшеня	Китайский женьшеневый чай
ППТ-20-Glc-6-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	Н.О.*	Н.О.
ППТ-20-Glc-6-GlcXyl	Н.О.	✓	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-GlcXyl-6-Glc	Н.О.	Н.О.	✓	✓	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-Glc-6-Glc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППТ-20-Glc(Mal)Glc	✓	✓	✓	✓	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-Glc(Mal)-6-Glc(Mal)	Н.О.	✓	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-Glc-6-Glc(Mal)Rha	Н.О.	✓	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-Glc-6-Glc(Mal)	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.	Н.О.
ППТ-6-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	Н.О.	✓
ППТ-6-GlcXyl	✓	✓	✓	✓	Н.О.	Н.О.
ППТ-20-GlcXyl	Н.О.	Н.О.	✓	✓	Н.О.	✓
ОТ-6-GlcRha	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.	✓	Н.О.
ОТ-6-Glc	Н.О.	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.
ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.
ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	Н.О.	Н.О.
ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc (i)	✓	✓	✓	✓	Н.О.	Н.О.
ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc	✓	✓	Н.О.	✓	✓	Н.О.
ППД-20-GlcAra(f)-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Продолжение таблицы 5.5

ППД-20-GlcAra(p)-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc	✓	✓	✓	✓	✓	Н.О.
ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Ac)Glc	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.
ППД-20-GlcGlcXyl-3-GlcGlc	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.	Н.О.
ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc	✓	✓	✓	✓	✓	Н.О.
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc	Н.О.	✓	✓	✓	✓	Н.О.
ОК-20-GluAGlc-3-Glc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ОК-20-Glc-3-GluA	✓	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.	✓
ОК-20-GluAGlcXyl	Н.О.	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	Н.О.
ОК-20-GluAGlc	✓	Н.О.	✓	Н.О.	✓	Н.О.
ППД-20-Glc-3-GlcGlc	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc	✓	✓	✓	✓	✓	Н.О.
ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc	✓	✓	Н.О.	✓	Н.О.	Н.О.
ППД-20-Glc-6-Glc(Ac)Glc	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓	✓	Н.О.
ППД-3-GlcGlcGlc	✓	Н.О.	✓	Н.О.	✓	✓
ППД-20-Glc	✓	Н.О.	Н.О.	Н.О.	Н.О.	✓
Дополнительно	ППД-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Xyl	B _{7-b} -6-Glc	Н.О.	Н.О.	ППД-20-GlcXyl- 3-RhaXyl	B _{7-b} -6-GlcRha, B _{7-b} -6-GlcRha, B _{7-a} -3-GlcGlc, B _{7-a} -3-GlcGlc

* Н.О. – не обнаружен.

Определение структуры сахаридных заместителей и сапогенинов по масс-спектрам и временам удерживания проводилось в соответствии с алгоритмом, подробно описанным в работе [330]. Помимо ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов, были обнаружены и их дегидратированные аналоги, содержание которых особенно велико в продуктах из красного женьшеня, прошедшего обработку паром [122,336]. В таблице 5.5 приведен список предварительно идентифицированных гинсенозидов в исследованных объектах.

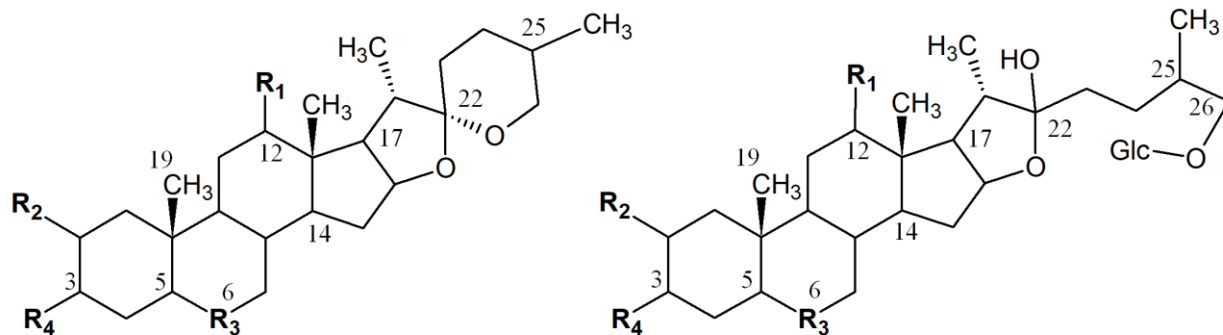
Существуют примеры создания системы качественной оценки состава многокомпонентных средств традиционной медицины на основе присутствия или отсутствия регистрируемых в режиме СИМ пиков для подобных наборов соединений [337], однако, добавление в такие химические «отпечатки пальцев» большего количества соединений из каждой группы, с использованием разработанного подхода, может привести к увеличению точности и информативности таких систем. Количественные аспекты группового определения гинсенозидов будут рассмотрены в главе 6.

5.2.2 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация стероидных сапонинов якорцев стелющихся

В качестве следующих объектов исследования, в состав которых входит группа стероидных сапонинов (рис. 5.23), выбраны надземные части растения и экстракты из клеточной культуры якорцев стелющиеся (*Tribulus terrestris* L.). Изучение особенностей масс-спектрометрического поведения стероидных сапонинов спиростанолового (диосцин) и фуростанолового (протодиосцин) типов проводили в режиме прямого ввода стандартных растворов в масс-спектрометр. Обнаружение и определение стероидных сапонинов, подобно гинсенозидам женьшеня, можно проводить в режиме МЗР при использовании отрицательной ЭРИ. Однако для групповой идентификации лучше подходят спектры, регистрируемые с помощью положительной ЭРИ, поскольку они содержат как интенсивные сигналы протонированных молекул, так и характеристичные сигналы фрагментных ионов, не образующиеся в значительных количествах при фрагментации в ячейке соударений.

Спиростаноловый сапогенин

Фуростаноловый сапогенин



Сапогенин	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Тигогенин	H	H	–CH ₂ –	OH
Гитогенин	H	OH	–CH ₂ –	OH
Хецогенин	=O	H	–CH ₂ –	OH
Хлорогенин	H	H	–CH(OH)–	OH
Диосгенин	H	H	=CH–	OH
Примеры спиросапонинов				
Диосцин	H	H	=CH–	OGlc(Rha)Rha
Аговозид	=O	H	–CH ₂ –	OGlc
Примеры фурустаноловых сапонинов				
Протодиосцин	H	H	=CH–	OGlc(Rha)Rha
Прототрибестин	H	H	=CH–	OGlc(Rha)SO ₃ Na

Рисунок 5.23 – Структуры сапонинов растений рода Якорцы (*Tribulus L.*).

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. 5.24).

Структуры молекул протодиосцина и диосцина отличаются наличием цикла, замыкающегося через атом кислорода на С22 атом. В связи с этим, в масс-спектрах регистрации положительных ионов могут наблюдаться разные по интенсивности сигналы паттернов фрагментации для спиростаноловых и фуростаноловых агликонов (таблица 5.6).

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.

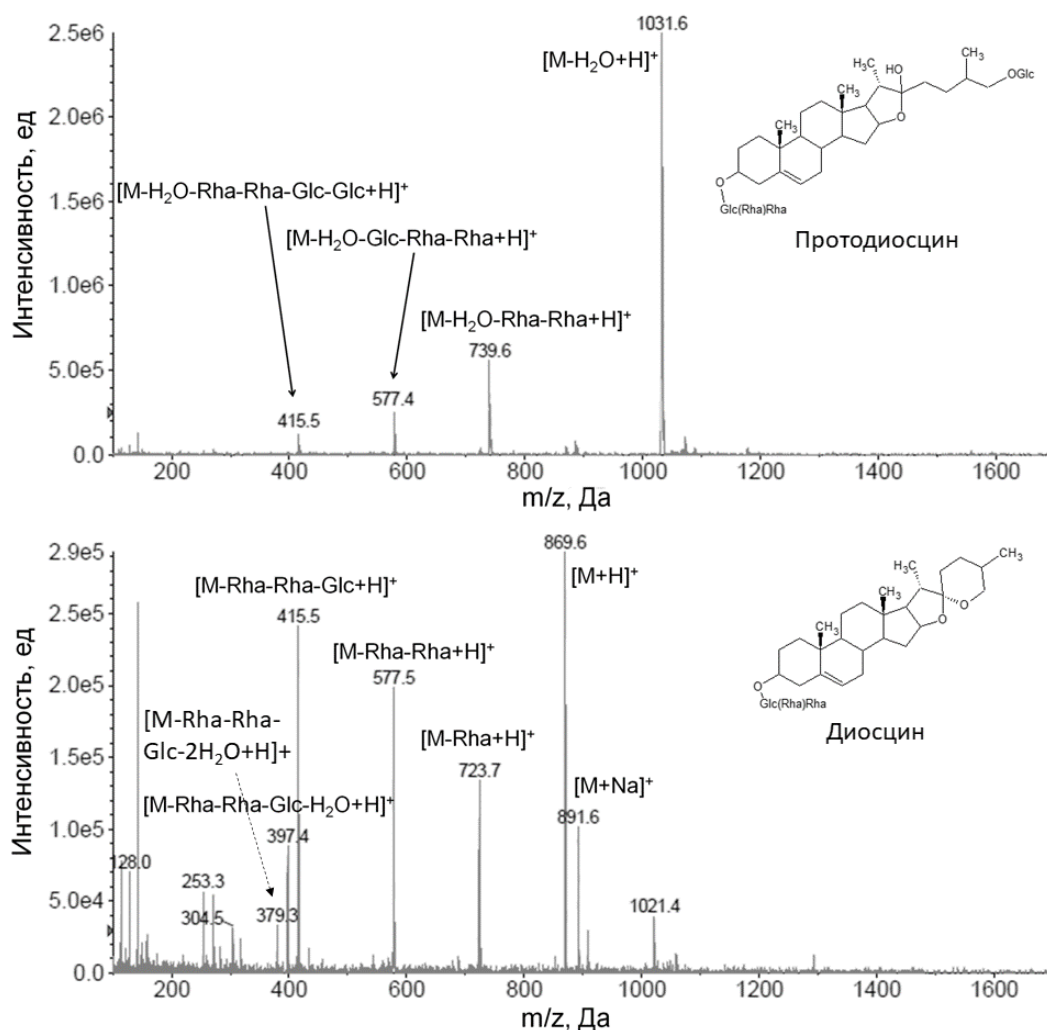


Рисунок 5.24 – Масс-спектры ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов и структуры протодиосцина и диосцина.

Таблица 5.6 – Значения m/z для диагностических ионов из паттернов фрагментации сапогенинов стероидных сапонинов 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 характерны для фураностанолового агликона (рис. П15-П24).

При этом, не смотря на одинаковые значения m/z , структуры этих ионов различны (рис. 5.25). С целью дифференциации этих ионов 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.

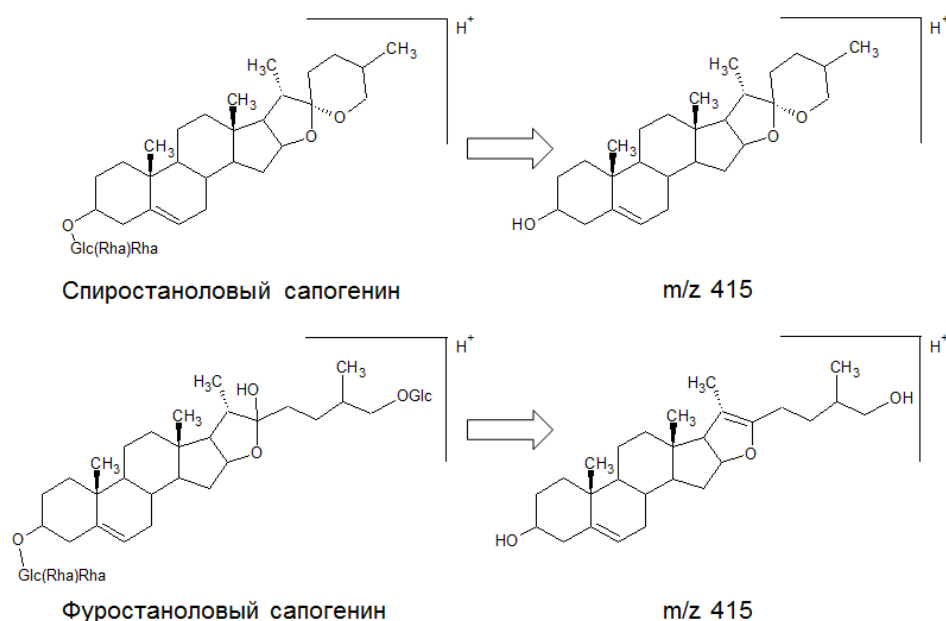


Рисунок 5.25 – Схема образования ионов с m/z 415 для диосцина и протодиосцина.

На основании полученных данных установлено, что для стероидных сапонинов фуростанолового типа (протодиосцин) максимальная интенсивность иона с m/z 415 соответствует ПД = 130 В, а для стероидных сапонинов спиростанолового типа (диосцин) — 70 В (рис. 5.26). Аналогичная особенность наблюдалась при регистрации масс-спектров протодиосцина и диосцина в режиме регистрации положительно заряженных ионов с различной установленной величиной напряжения на фрагменторе (оборудование фирмы «Agilent»).

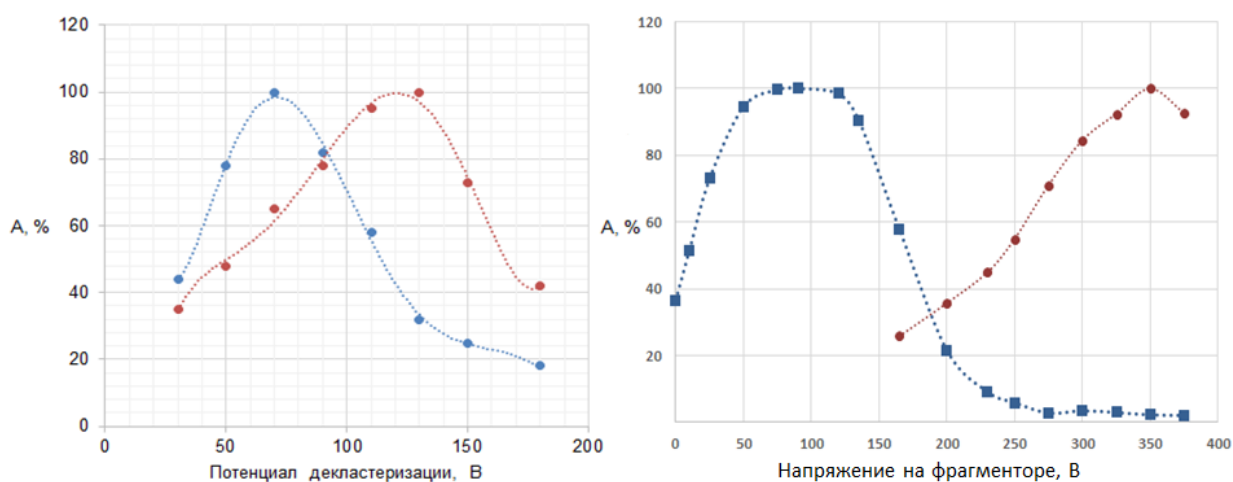


Рисунок 5.26 – Зависимость площади пиков, построенных по сигналам с m/z 415 для протодиосцина (красный) и диосцина (синий) при различном значении ПД.

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. Таким образом, использование выбранных диагностических

ионов позволяет проводить обнаружение компонентов, относящихся к двум разным подгруппам одной группы сапонинов, производных диосгенина.

Апробация разработанного подхода к идентификации стероидных сапонинов. Помимо протодиосцина и диосцина, в состав экстрактов из якорцев стелющихся входит большое число других важных компонентов близкой структуры, например террестросины А, В, С, D, Е и F и другие производные гекогенина, гитогенина, тигогенина и диосгенина [319]. 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.

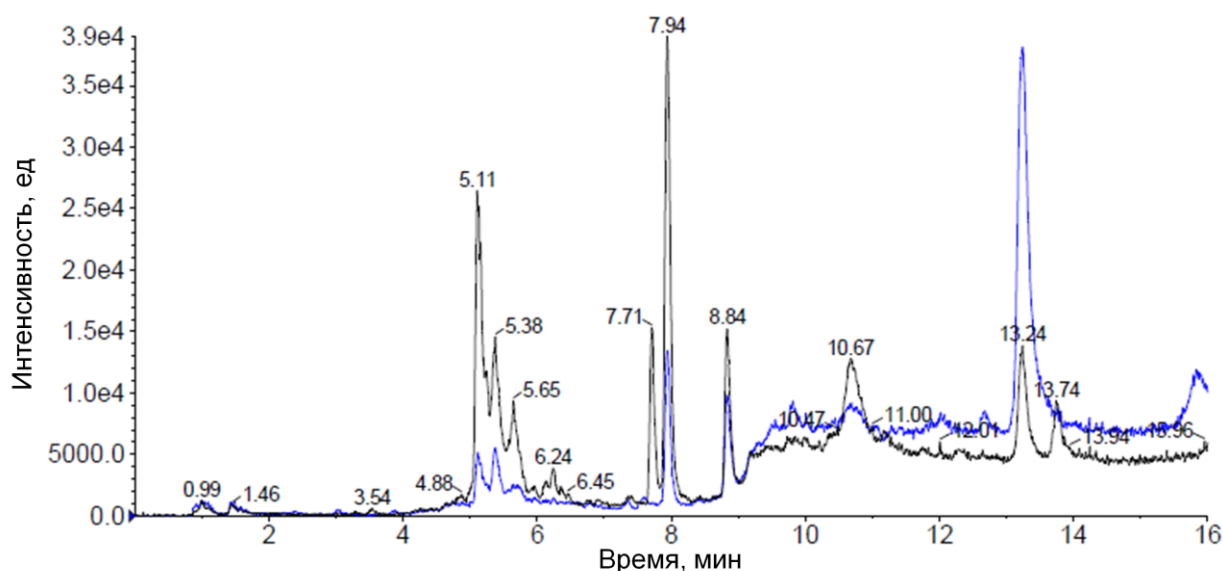


Рисунок 5.27 – Масс-хроматограммы экстракта из сухого растительного материала *T. terrestris* в режиме СИМ: m/z 415 (черный) и m/z 397 (синий).

Обнаруженные на хроматограмме экстракта из растительного материала якорцев стелющихся (рис. 5.27) производные диосгенина и гекогенина были предварительно 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 сопоставлению наблюдаемых в спектрах сканирования фрагментных ионов, соответствующих последовательному отщеплению сахаридных заместителей с образованием фрагментных ионов сапогенина и дегидратированного сапогенина, с расчетными массами данных фрагментов (таблица 5.7). 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 MC^2 и MC^3 (MC^4) спектры, регистрируемые с помощью ионных ловушек [115], или данные спектроскопии ЯМР.

Таблица 5.7 – Обнаруженные компоненты в экстракте из *T. terrestris*

Фрагментарная формула*	tr, мин	Молекулярные ионы	Фрагментные ионы
R-Glc-Rha (Рутин)	4.6	611.5 [M+H] ⁺ 623.5 [M+Na] ⁺	303.1 [M-Glc-Rha+H] ⁺
H(f)-Gal[-Rha]-Rha	4.7	1047.3 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1077.4 [M+Na] ⁺	901.6 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 755.6 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 593.5 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 431.4 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha-Gal+H] ⁺ 413.3 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha-Gal+H] ⁺
D(f)-Glc[-Rha]-Rha	5.2	1031.5 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1071.4 [M+Na] ⁺	885.5 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 739.6 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 577.5 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 415.4 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 397.4 [M-2H ₂ O-Rha-Rha-Glc-Glc+H] ⁺
H(f)-Gal[-Rha]-Rha	5.3	1047.3 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1077.4 [M+Na] ⁺	885.6 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 867.5 [M-2H ₂ O-Glc+H] ⁺ 721.7 [M-2H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 575.6 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 431.4 [M-Glc-Rha-Rha-Gal+H] ⁺ 413.3 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha-Gal+H] ⁺
D(f)-Glc[-Rha]-SO ₃ H	5.5	965.3 [M-H ₂ O+H] ⁺	885.5 [M-H ₂ O-SO ₃ H+H] ⁺ 739.4 [M-H ₂ O-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 577.6 [M-H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 415.4 [M-H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha-Glc+H] ⁺ 397.4 [M-2H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha-Glc+H] ⁺
D(f)-Glc[-Rha]-Rha	5.6	1031.5 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1071.4 [M+Na] ⁺	869.7 [M-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 723.6 [M-H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 577.2 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 415.3 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 397.3 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha-Glc+H] ⁺

Продолжение таблицы 5.7

D(f)-Glc[-Rha]-Glc	5.7	1047.5 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1087.4 [M+Na] ⁺	885.6 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 739.6 [M-H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 577.5 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Glc+H] ⁺ 415.3 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 397.3 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Glc-Glc+H] ⁺
H(f)-Rha-Rha-SO ₃ H	6.3	965.3 [M-H ₂ O+H] ⁺	885.5 [M-H ₂ O-SO ₃ H+H] ⁺ 721.7 [M-2H ₂ O-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 575.6 [M-2H ₂ O-SO ₃ H-Rha-Rha+H] ⁺ 431.4 [M-H ₂ O-SO ₃ H-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 413.3 [M-2H ₂ O-SO ₃ H-Rha-Rha-Glc +H] ⁺
H(s)-Gal	6.7	593.4 [M+H] ⁺	431.5 [M-Glc+H] ⁺ 413.5 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺
H(s)-Gal[-Rha]-Rha	6.8	885.7 [M+H] ⁺	739.6 [M-Rha+H] ⁺ 593.4 [M-Rha-Rha+H] ⁺ 431.5 [M-Rha-Rha-Gal+H] ⁺ 413.5 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Gal+H] ⁺
H(s)-Gal-Rha	7.4	739.6 [M+H] ⁺	593.4 [M-Rha+H] ⁺ 431.5 [M-Rha-Gal+H] ⁺ 413.5 [M-H ₂ O-Rha-Gal+H] ⁺
D(s)-Glc[-Rha]-Rha	8.0	869.6 [M+H] ⁺ 891.6 [M+Na] ⁺ 907.6 [M+K] ⁺	723.7 [M-Rha+H] ⁺ 577.5 [M-Rha-Rha+H] ⁺ 415.5 [M-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 397.5 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 379.5 [M-2H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺
D(s)-Glc-Rha	8.9	723.5 [M+H] ⁺ 745.6 [M+Na] ⁺	577.5 [M-Rha+H] ⁺ 415.5 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 397.3 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺

*Обозначение Hex заменено на Glc или Gal по аналогии с известными, описанными структурами.

Известно, что экстракты из якорцев стелющихся могут содержать 25(R)/25(S)-изомеры некоторых гликозидов, особенно в обогащённых этими соединениями экстрактах из клеточной культуры [338]. Кроме того, на хроматограмме (рис. 5.27) наблюдается перекрывание хроматографических пиков, что уменьшало число идентифицированных соединений, поэтому при анализе экстрактов из клеточной культуры использовали другую, более продолжительную, программу градиентного элюирования (рис. 5.28). Предварительно идентифицированные фрагментарные формулы соединений приведены в таблице ПЗ.

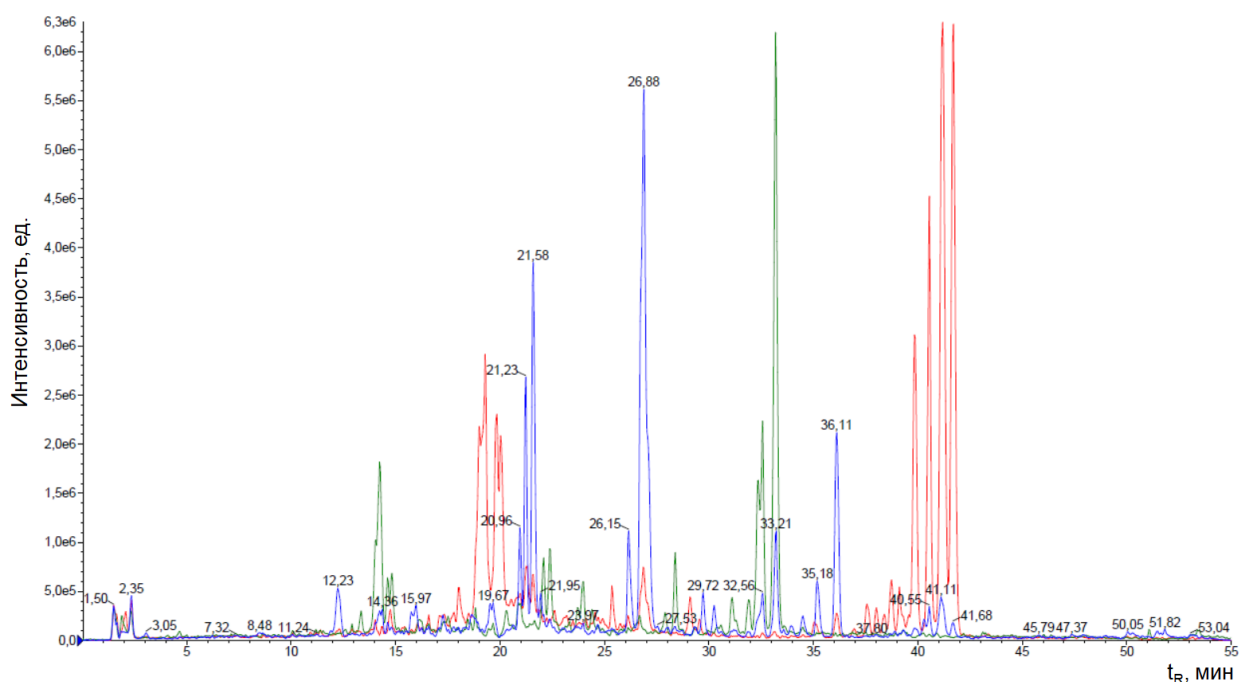


Рисунок 5.28 – Масс-хроматограмма экстракта из клеточной культуры *T. terrestris* в режиме СИМ: m/z 417 (красный), m/z 415 (синий) и m/z 413 (зеленый).

Несмотря на то, что хлорогенин ранее находили только в свободной от сахаров форме [319], некоторые его гликозиды все же могут быть обнаружены в клеточных культурах, поэтому во всех формулах агликони хлорогенина и гитогенина написаны через черту «/», поскольку отличить эти два агликона без использования стандартных образцов достаточно сложно. Для спиростаноловых гликозидов характерно образование аддуктных ионов сапогенина с водой, что предположительно происходит во время их пребывания в ионной ловушке [339]. 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 агликона, 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.

5.2.3 Исследование групповых особенностей масс-спектрометрического поведения и идентификация сапонинов солодки

В качестве следующего класса для исследования масс-спектральных особенностей гликозидов выбраны пентациклические тритерпеновые гликозиды, присутствующие в составе экстрактов из корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.). Детектирование и количественную оценку содержания основного компонента корня солодки, глицирризина, который является одним из самых распространенных растительных подсластителей, обычно проводят в режиме МЗР для отрицательных ионов [340]. Реализация данного режима возможна за счёт наличия в структуре глицирризина и его аналогов склонной к депротонированию карбоксильной группы. Так, масс-спектры глицирризина, полученные в режиме сканирования по полному ионному току отрицательных ионов, характеризуются наличием сигнала депротонированной молекулы глицирризина с m/z 821 (рис. 5.29).

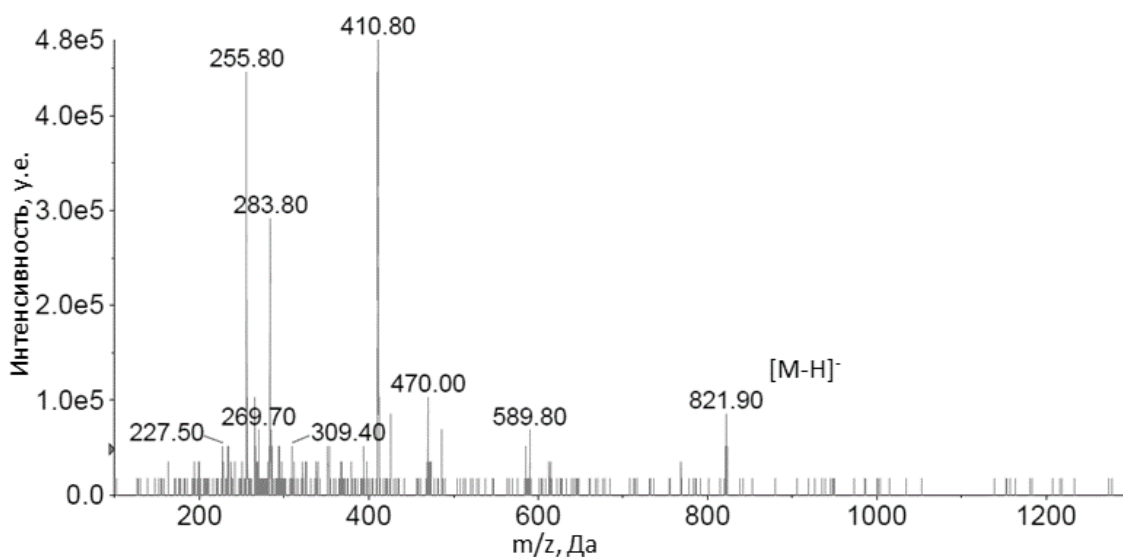


Рисунок 5.29 – Масс-спектр ЭРИ стандартного раствора глицирризина (0.01 мкг/мл) в режиме регистрации отрицательных ионов.

В результате направленной фрагментации депротонированных молекул гликозидов солодки в ячейке соударений в масс-спектре отрицательных фрагментных ионов 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) (рис. 5.30).

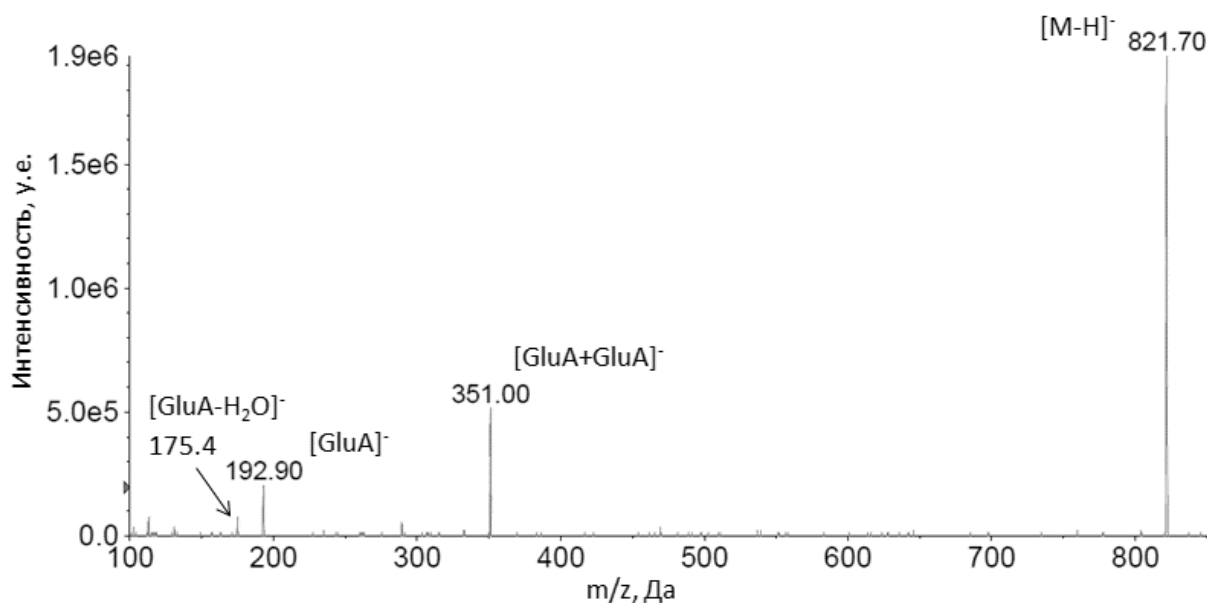


Рисунок 5.30. Масс-спектр фрагментных ионов ЭРИ для иона-предшественника с m/z 821.7 в режиме регистрации отрицательных ионов.

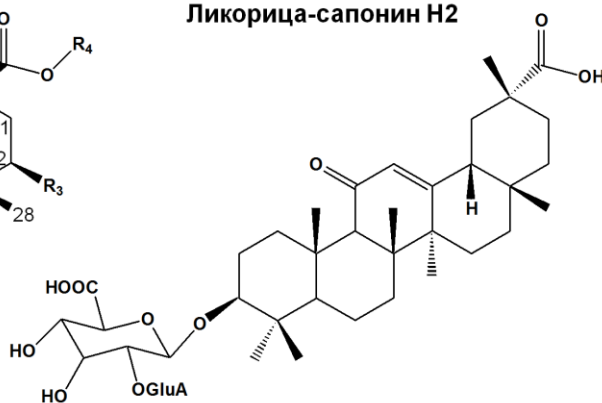
Помимо глицирризина, в корнях солодки содержится большое число других важных гликозидов близкой структуры, например, ликорица-сапонин G2, также в составе корня этого растения были обнаружены соединения с отличающимся типом агликона (рис. 5.31), например, гидроксиглицирретовой кислотой или глабролидом [341-346].

При этом, боковой заместитель, состоящий из двух остатков глюкуроновой кислоты, содержится в структуре многих из них, вследствие чего авторами работ [341,342] предлагается использовать ион с m/z 351 в качестве диагностического. Наличие цепочки из двух глюкуроновых кислот позволяет проводить групповой скрининг гликозидов солодки, при котором фрагментации подвергаются все ионы, попадающие в источник, в ходе, так называемого MS^E (MS^{All}) эксперимента. Присутствие в регистрируемых масс-спектрах второго порядка сигналов с m/z 351 должно свидетельствовать о наличии сапонинов солодки в анализируемом образце. Однако подобный подход основан на мониторинге нехарактеристичного фрагмента, который не отражает основной элемент структуры интересующих соединений — их агликон. Мешающее влияние других соединений, содержащих в качестве заместителя цепочку из двух остатков глюкуроновой кислоты, может проявляться при анализе сложных многокомпонентных продуктов или БАД.

Сапонины корня солодки

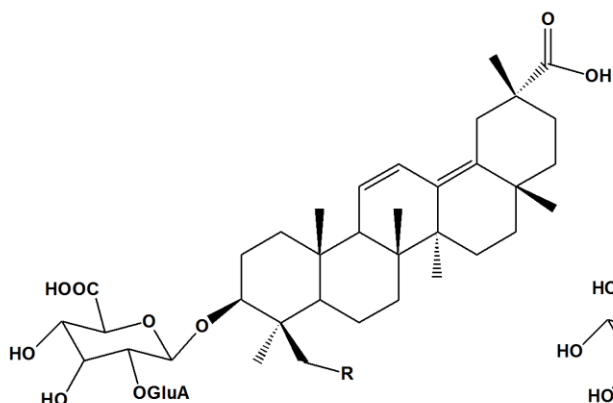


Ликорица-сапонин H2

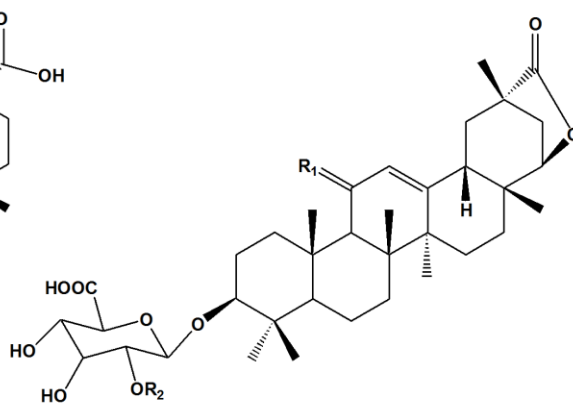


Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Глицирризин	H	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин A3	H	O	H	Glc	GluA	H
Ликорица-сапонин B2	H	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин D3	H	H ₂	OCOCH ₃	H	GluARha	H
Ликорица-сапонин G2	OH	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин J2	OH	H ₂	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин L3	OH	H ₂	OCOCH ₃	H	GluARha	H
22β-ацетоксиглицирризин	H	O	OCOCH ₃	H	GluA	H
Уралсапонин В	H	O	H	H	H	GluA
Апиоглицирризин	H	O	H	H	Api	H
Арабоглицирризин	H	O	H	H	Ara	H

Дегидропроизводные глицирризина



Производные с агликоном глабролида



Ликорица-сапонин C2 (R=H)	Ликорица-сапонин E2 (R ₁ =O, R ₂ =GluA)
Ликорица-сапонин K2 (R=OH)	Ликорица-сапонин F3 (R ₁ =H ₂ , R ₂ =GluARha)

Рисунок 5.31 – Состав гликозидов солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).

Наиболее интенсивные сигналы в масс-спектрах ионизации положительно заряженных ионов в масс-спектре глицирризина относятся к фрагментам тритерпенового остова, т.е. регистрируемые значения m/z будут непосредственно связаны с типом сапогенина (рис. 5.32).

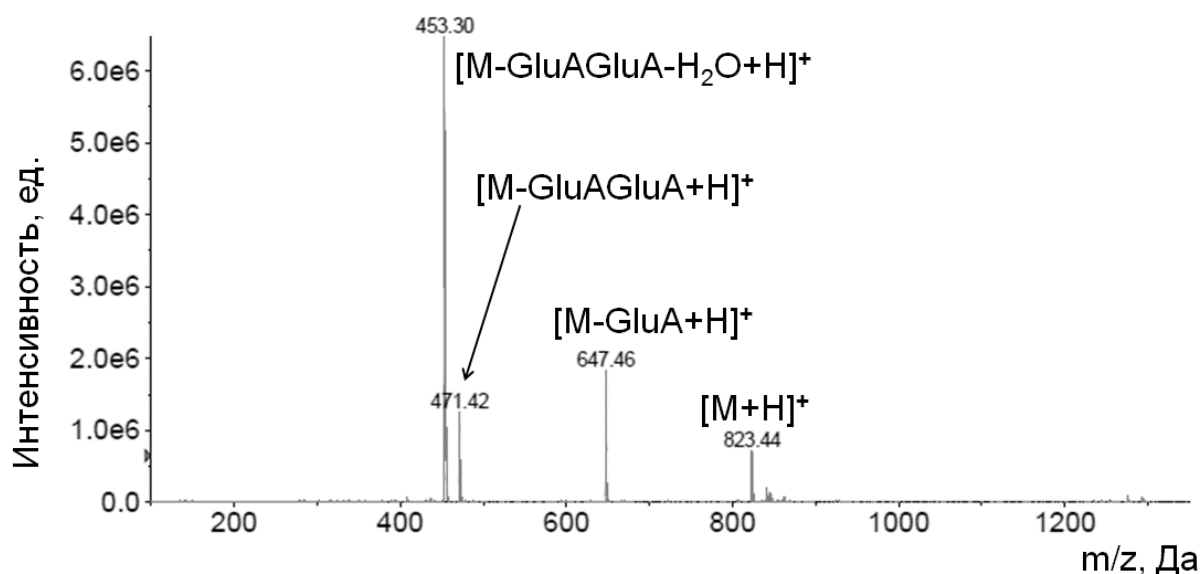


Рисунок 5.32 – Масс-спектр ЭРИ стандартного раствора глицирризина (10 мкг/мл) в режиме регистрации положительных ионов.

В масс-спектре глицирризина в режиме сканирования положительно заряженных ионов также присутствовал интенсивный сигнал протонированной молекулы $[M+H]^+$ с m/z 823, однако получить интенсивные сигналы ионов-продуктов при его фрагментации в ячейке соударений не удалось. Из этого следует, что детектирование глицирризина с использованием ионных переходов m/z 823→471 и 823→453, указанных в работе [340], оказывается не всегда возможным. Таким образом, как и в случае гинсенозидов женьшеня (см. п. 5.2.1), режим детектирования положительно заряженных ионов 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. В таблице 5.8 приведены наборы диагностических ионов, характерных для различных типов сапогенинового остова ряда соединений, присутствующих в экстрактах солодки.

Предполагаемые сигналы диагностических ионов для ближайших аналогов глицирризина (рис. П25-П36) могут быть рассчитаны на основании структурных формул их сапогенинов, а также подтверждены масс-спектрами, описанными в литературе [343–346]. Предложенный подход позволяет расширить круг обнаруживаемых соединений, дополняя его структурными аналогами с одинаковым или сходным агликоном.

Таблица 5.8 – 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

Влияние величины ПД на интенсивность сигналов диагностических ионов было исследовано на примере глицирризина (рис. 5.33).

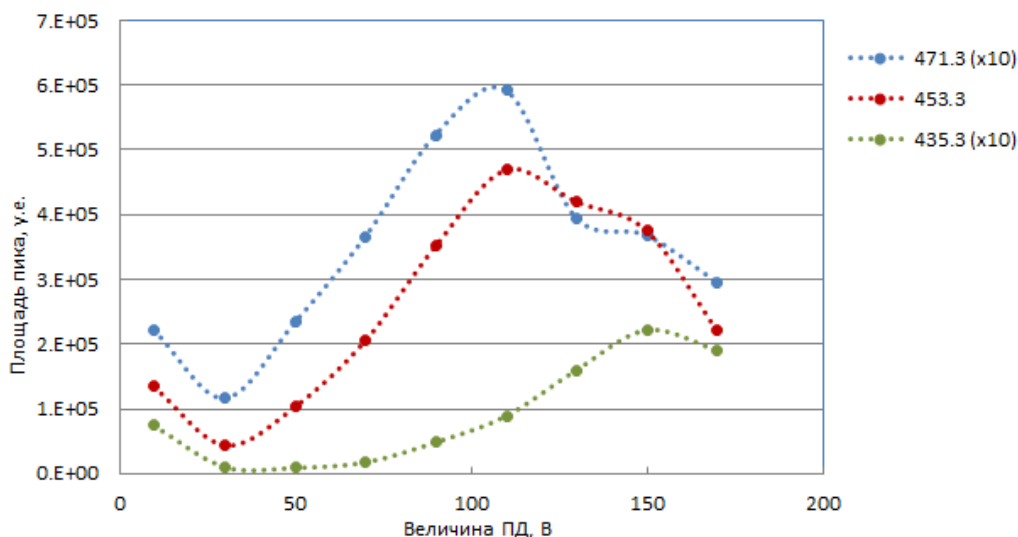


Рисунок 5.33– Зависимость площадей пиков глицирризина от ПД. (площади по сигналам m/z 471,3 и 435,3 умножены на 10 для удобства представления данных).

Величина ПД, соответствующая максимальной интенсивности сигналов диагностических ионов, лежит в диапазоне 100 – 110 В.

Апробация разработанного подхода к идентификации сапонинов солодки. Аналогично рассмотренному примеру стероидных гликозидов тритерпеновые гликозиды солодки представлены в широком химическом разнообразии [343–346], а их индивидуальные стандартные образцы получают лишь целенаправленным препаративным хроматографическим выделением.

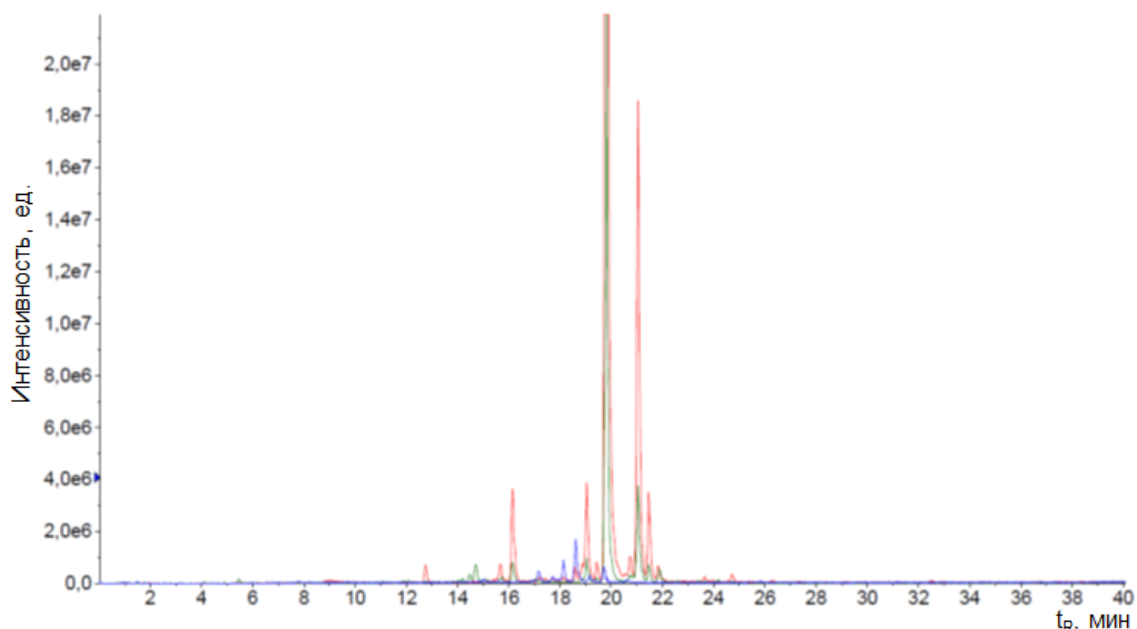


Рисунок 5.34 – Масс-хроматограмма экстракта из корней *G. glabra* в режиме СИМ: m/z 451 (синий), m/z 453 (красный) и m/z 455 (зеленый).

Используя литературные данные [343,347] и закономерности, установленные на примере глицирризина, были проанализированы масс-спектры,

зарегистрированные при хроматографировании образцов экстрактов из корней солодки (рис. 5.34). Фрагментарные формулы предварительно идентифицированных соединений представлены в таблице 5.9.

Таблица 5.9 – Обнаруженные компоненты в экстракте из корня *G. glabra*

Фрагментарная формула	tr, мин	Сигналы в масс-спектрах, m/z	
		Молекулярные ионы	Фрагментные ионы
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	14.81	861.7 [M+Na] ⁺ 877.7 [M+K] ⁺	663 [M-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA-2OH + -GluA-GluA	15.74	855.8 [M+H] ⁺ 877.9 [M+Na] ⁺ 893.8 [M+K] ⁺	661 [M-H ₂ O-GluA+H] ⁺ 503 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 485 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 467 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 449 [M-3H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA-Glc	15.91	1001.9 [M+H] ⁺ 1023.7 [M+Na] ⁺ 1039.6 [M+K] ⁺	825 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 649 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 631 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA-Glc+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA-Glc+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA-Glc+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA-Glc	16.16	985.8 [M+H] ⁺ 1007.7 [M+Na] ⁺	809 [M-GluA+H] ⁺ 647 [M-GluA-Glc+H] ⁺ 633 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 615 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA-Glc+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA-Glc+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA-Glc+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA-Glc+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA-Xyl	17.13	971.7 [M+H] ⁺ 993.7 [M+Na] ⁺	839 [M-Xyl+H] ⁺ 663 [M-GluA-Xyl+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA-Xyl+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA-Xyl+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA-Xyl+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	17.18	839.8 [M+H] ⁺ 861.8 [M+Na] ⁺ 877.5 [M+K] ⁺	663 [M-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	17.67	839.8 [M+H] ⁺ 861.8 [M+Na] ⁺ 877.5 [M+K] ⁺	663 [M-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺

Продолжение таблицы 5.9

GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	18.61	839.8 [M+H] ⁺ 861.8 [M+Na] ⁺ 877.5 [M+K] ⁺	701 [M+K-GluA+H] ⁺ 685 [M+Na-GluA+H] ⁺ 663 [M-GluA+H] ⁺ 645 [M-H ₂ O-GluA+H] ⁺ 627 [M-2H ₂ O-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 433 [M-3H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA-Rha	19.04	991.9 [M+Na] ⁺ 1007.7 [M+K] ⁺	809 [M-GluA+H] ⁺ 647 [M-GluA-Rha+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA-Glc	19,40	985.8 [M+H] ⁺ 991.9 [M+Na] ⁺ 1007.7 [M+K] ⁺	823 [M-Glc+H] ⁺ 647 [M-GluA-Glc+H] ⁺ 471 [M-GluA-Glc-GluA+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-Glc-GluA+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-Glc-GluA+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-Glc-GluA+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	19.71	839.8 [M+H] ⁺ 861.8 [M+Na] ⁺ 877.5 [M+K] ⁺	663 [M-GluA+H] ⁺ 645 [M-H ₂ O-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA	19,82	823.9 [M+H] ⁺ 845.8 [M+Na] ⁺ 861.7 [M+K] ⁺	647 [M-GluA+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA-OH (dO)GL-2OH (dOdH ₂)GA-2OH + -GluA-GluA	20.61	839.8 [M+H] ⁺ 861.9 [M+Na] ⁺ 877.7 [M+K] ⁺	663 [M-GluA+H] ⁺ 645 [M-H ₂ O-GluA+H] ⁺ 487 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 469 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 451 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA-Rha	20,73	991.9 [M+Na] ⁺ 1007.7 [M+K] ⁺	823 [M-Rha+H] ⁺ 647 [M-GluA-Rha+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA-Rha+H] ⁺
GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA	20,73	845.8 [M+Na] ⁺ 861.7 [M+K] ⁺	647 [M-GluA+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺

Продолжение таблицы 5.9

GA (dO)GL-OH (dOdH ₂)GA-OH + -GluA-GluA	21,49	845.8 [M+Na] ⁺ 861.7 [M+K] ⁺	647 [M-GluA+H] ⁺ 471 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 453 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 435 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 407 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
(dOdH ₂)GA ((dO)GL) + -GluA-GluA	21,9	825.8 [M+H] ⁺ 847.8 [M+Na] ⁺ 863.8 [M+K] ⁺	649 [M-GluA+H] ⁺ 613 [M-2H ₂ O-GluA+H] ⁺ 455 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 437 [M-2H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺ 409 [M-COOH-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
(dO)GA + -GluA-GluA	23.06	831.9 [M+Na] ⁺ 847.7 [M+K] ⁺	633 [M-GluA+H] ⁺ 457 [M-GluA-GluA+H] ⁺ 439 [M-H ₂ O-GluA-GluA+H] ⁺
GL	34.82	469.7 [M+H] ⁺	451 [M-H ₂ O+H] ⁺ 423 [M-HCOOH+H] ⁺ 405 [M-H ₂ O-HCOOH+H] ⁺

Большое количество изомерных соединений может быть связано с изомеризацией агликонов глицирретовой и гидроксиглицирретовых кислот с образованием гидрокси- производных 11-дезоксо-глабролида. Так, в таблице 5.9 для каждого пика указано 2-3 возможных агликона. Дополнительно образование изомеров возможно, вследствие гликозилирования 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 5.8) позволяет обнаруживать пики этих групп соединений и, таким образом, судить о присутствии фитокомпонентов этого растения в исследуемом объекте.

5.3 Групповое ВЭЖХ-МС профилирование экстрактов, содержащих растительные гликозиды

Одним из недостатков, или скорее ограничением, использования метода ВЭЖХ-МС является необходимость в трудоемкой ручной обработке больших объемов данных, поскольку полное хроматографическое разделение недостижимо даже при анализе экстракта из одного растения, а тем более при анализе экстракта из смешанного препарата, это приводит к наложению масс-спектров компонентов с близкими временами удерживания, что сильно осложняет интерпретацию.

Для повышения достоверности (надежности) и контроле качества лекарственного растительного сырья, пищевых добавок и БАД возможно использование хроматографической информации – хроматографических «отпечатков пальцев» [225]. Так, в упомянутой ранее (глава 3) фармакопейной статье о корнях родиолы розовой [280] приводится пример и описание хроматограммы, регистрируемой на длине волны, подходящей для детектирования гликозидов коричневого спирта – 250 нм. Таким образом, химик-эксперт получает дополнительную возможность судить о качестве проанализированного растительного материала не только по отдельным показателям (т.е. суммарное содержание гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин + содержание салидрозида), но и по присутствию и соотношению пиков на хроматограмме. При использовании более информативных способов анализа, таких как ВЭЖХ-МС в режиме сканирования, в т.ч. с использованием ЛИЛ, благодаря селективности регистрации сигналов БМ, возникает еще больше возможностей качественной оценки испытуемых образцов по сравнению с аутентичными, проанализированными в тех же условиях. Такой подход остается единственно возможным в случае отсутствия индивидуальных стандартных образцов БМ, однако должен применяться с осторожностью и не предполагает получения однозначных выводов о качестве, происхождении или принадлежности образца к какому-то виду/группе.

В литературе, в основном описано использование двумерных (2D) «отпечатков пальцев», как спектральных [205,207,215,216], так и хроматографических [348–351]. В случае трехмерных (3D) данных можно поступить двумя путями: 1) использовать трехмерные отпечатки, применив разложение по методу ПФА, с последующим использованием ИКА и МГК [217,352,353] для поиска компонентов, отвечающих за отличия между образцами, и кластеризации наборов неизвестных образцов; 2) использовать ПФА [254], ПФА2 [254,255], MCR [255] и другие способы для уменьшения размерности и перехода к обычной матрице данных ненаправленного анализа, с последующей ее обработкой аналогично первому подходу. Второй способ предпочтителен, если целью является установление в конечном итоге отдельных компонентов, БМ, содержание которых может быть отличительным признаком для исследованных групп образцов, в то время как первый способ применим в случае широких полос неразделенных

хроматографических пиков, относящихся к группам аналитов, общий профиль которых также может быть использован в качестве отличительной характеристики образцов [352,353]. В случае 3D данных флуоресцентного анализа [217,356] антистоксову область и область рэлеевского рассеяния «отрезают», поскольку в них нарушается трилинейность данных, необходимая для применения ПФА. В случае ВЭЖХ-ДМД и ВЭЖХ-МС данных можно не учитывать области до и вблизи мертвого времени, а также участок градиентного элюирования сильно удерживаемых примесей подвижной фазой с максимальным содержанием органического растворителя. В случае ВЭЖХ-МС необходима также стадия вычитания шума, поскольку регистрируемые спектры содержат множество шумовых сигналов, связанных с индивидуальными особенностями оборудования, разной конструкцией источников ионизации разных производителей, составом используемых подвижных фаз и т.д. Однако, даже в этом случае, потребуется трудоемкая процедура интерпретации полученных главных компонент ПФА разложения вручную, что не надежно и может приводить к спорным заключениям. Тем не менее, в некоторых случаях, как и в случае 3D данных ВЭЖХ-ДМД и флуоресценции, можно выявить групповой вклад компонентов со схожими сигналами в спектрах, например, одинаковым паттерном фрагментации остова молекулы.

Хроматограммы, зарегистрированные в режиме СИМ по выбранным характеристичным (диагностическим) ионам, относящимся к разным группам фитокомпонентов того или иного растения могут быть напрямую использованы для получения «отпечатков пальцев» по аналогии с ВЭЖХ-УФ хроматограммами, зарегистрированными на нескольких длинах волн [348-351]. Преимущества такого подхода заключаются в том, что, во-первых, набор диагностических ионов, например, присутствующих в паттерне фрагментации агликона в случае гликозидов, обычно включает несколько фрагментов, отвечающих особенностям структуры остова молекулы, что отличает его от аналогов даже при совпадении их брутто формул, что повышает информативность и достоверность такого подхода. Во-вторых, существующие способы контроля качества основаны на определении нескольких биомаркеров, стандарты которых чаще всего коммерчески доступны, а условия детектирования индивидуальны (регистрация выбранных ионных

переходов или молекулярных ионов по точному значению m/z), в то время как с помощью диагностических ионов возможна одновременная регистрация группы схожих по структуре компонентов растений, что также ведет к увеличению информативности и возможности визуальной и количественной интерпретации регистрируемых хроматограмм. Кроме того, режим регистрации выделенных диагностических ионов позволяет повысить чувствительность анализа, по сравнению с режимом сканирования по полному ионному току, однако сопряжен с потерей информации об остальных соединениях (из нерассмотренных групп компонентов). Очевидным недостатком, в свою очередь, является необходимость наличия априорной информации о том, какие группы веществ присутствуют в образцах и какие диагностические ионы следует использовать для их обнаружения и построения характеристичных хроматограмм.

В рассмотренном ниже примере для модельного набора образцов женьшеня, солодки, абруса, их смесей, а также образцов, содержащего абрус, ароматизированного (женьшеневого) улуна показано, как для построения отпечатков пальцев могут быть использованы известные на основании проведенных исследований (п.п. 5.1, 5.2) диагностические ионы, а также как можно их извлечь из исходных («сырых») данных ВЭЖХ-МС сканирования, воспользовавшись вышеупомянутым разложением 3D данных.

5.3.1 Сравнение хроматографических профилей, построенных по выбранным диагностическим ионам

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 (таблицы 5.1, 5.4, 5.8). Графически применение данного подхода можно показать, построив хроматограммы по сумме сигналов из наборов диагностических ионов (рис. 5.35).

В результате визуального сопоставления хроматограмм было обнаружено присутствие абрусозидов из листьев *A. precatorius*, а также в некоторых случаях компонентов экстракта корня солодки в составе женьшеневого улуна, что, по-видимому, и обуславливает сладкий привкус этого вида 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. 5.36).

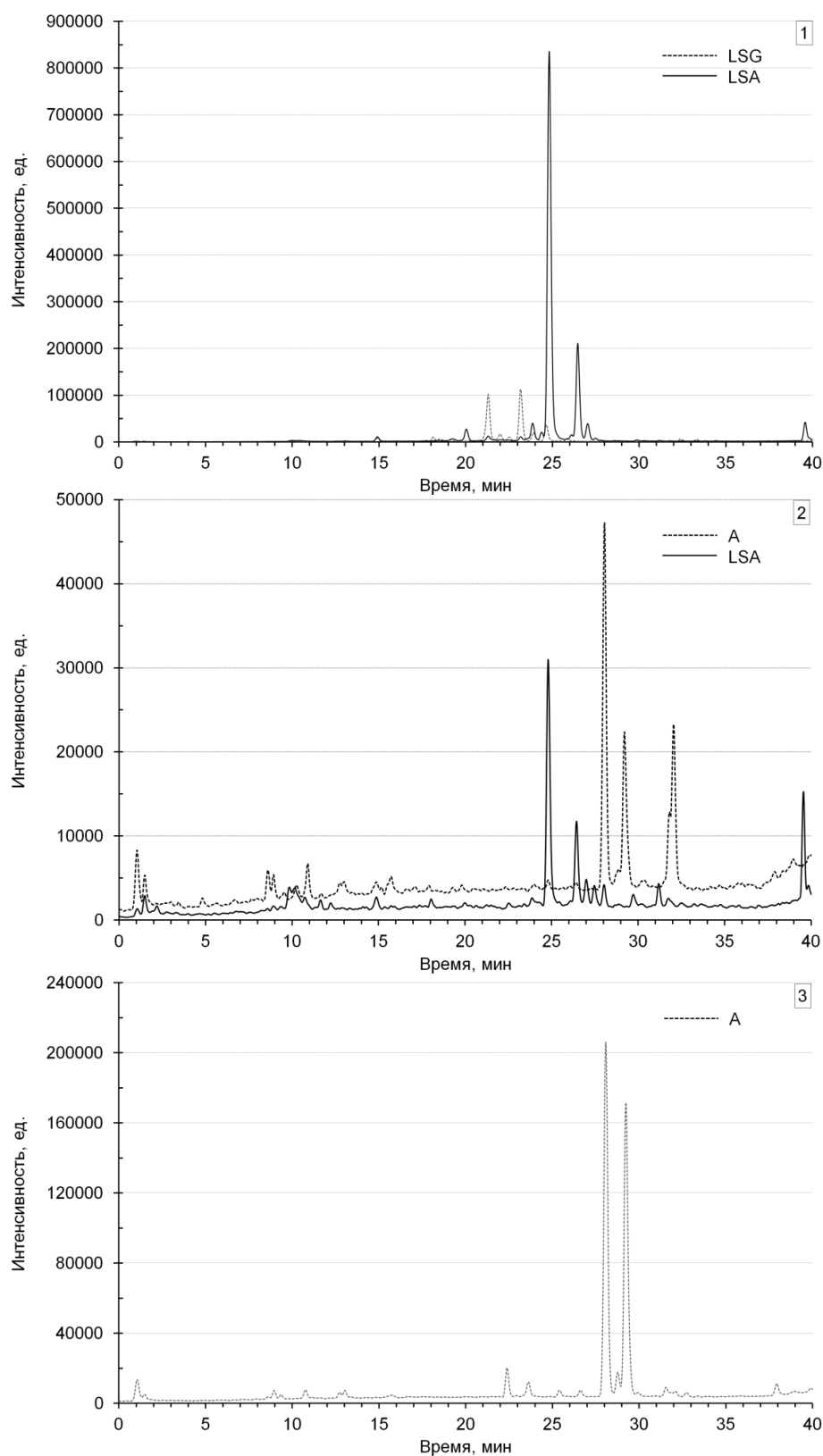


Рисунок 5.35 – Масс-хроматограммы экстракта из сухого корня солодки — 1, экстракта из женьшеневого улуна — 2 и листьев абруса молитвенного — 3, построенные путем суммирования сигналов, характерных для абрусозидов (A) и производных глицирретовой кислоты (GA) и 24-гидроксиглицирретовой кислоты (GA-OH).

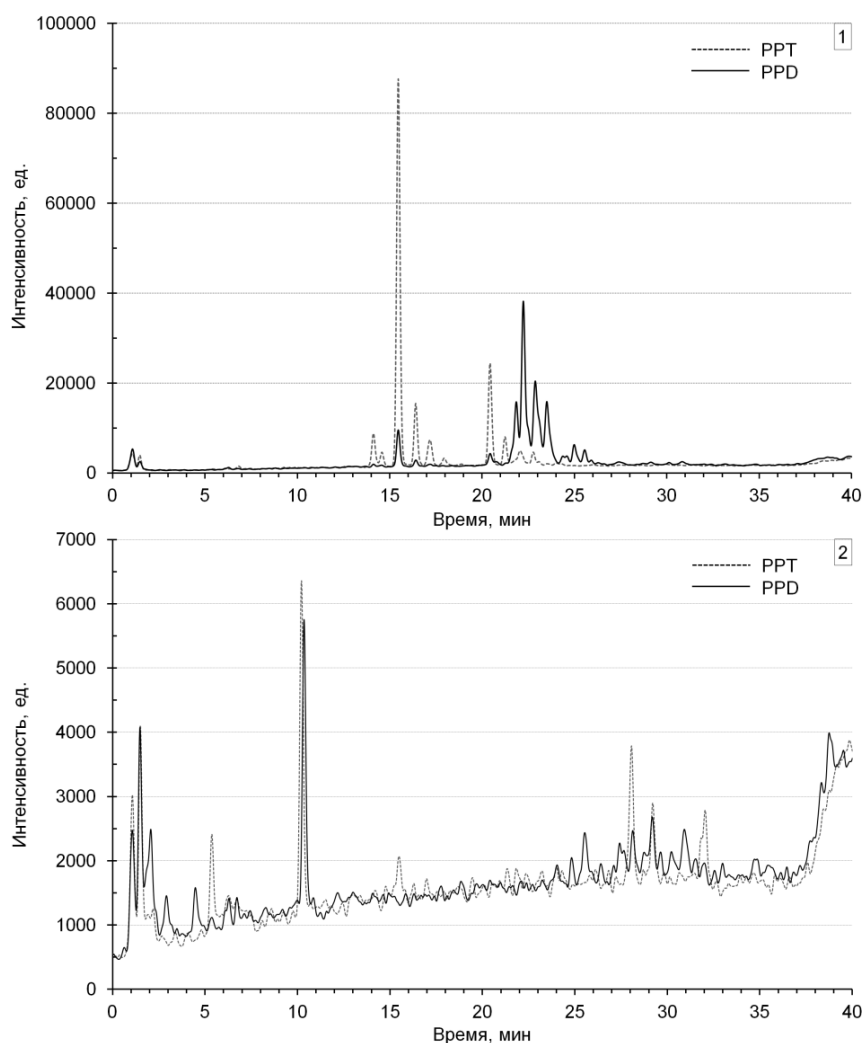


Рисунок 5.36 – Масс-хроматограммы экстракта из сухого корня азиатского женьшеня — 1 и экстракта из женьшеневого улуна — 2, построенные путем суммирования сигналов, характерных для гинсенозидов женьшеня протопанаксатриольного (ППТ, PPT) и протопанаксадиольного (ППД, PPD) типа.

Хроматографические пики с установленными временами удерживания практически отсутствовали на хроматограммах экстрактов из отдельных растений, построенных по сигналам диагностических ионов нехарактерной для этих экстрактов группы гликозидов. Например, на хроматограмме экстракта из корня женьшеня, построенной по сигналам диагностических ионов абрусозидов листьев абруса молитвенного присутствовал только пик гинсенозида Ro (рис. ПЗ7, 22.8 мин) из-за наличия иона с m/z 439 в паттерне фрагментации его сапогенина – олеаноловой кислоты, в то время как времена удерживания пиков абрусозидов больше 25 минут в тех же условиях хроматографирования, а их паттерны фрагментации также содержат другие характеристичные сигналы (рис. 5.10).

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, а отсутствующие значения заполнены нулями. При этом вместо численных значений площадей пиков использовались их относительные значения (%), нормированные на каждой из объединенных хроматограмм. Далее, используя формулы (5.1) и (5.2) [357], были рассчитаны линейные коэффициенты корреляции (ЛКК) Пирсона и индексы схожести (ИС) попарно для всех исследованных образцов (таблица 5.10).

$$\text{ИС} = \frac{x_1^t x_2}{\|x_1\| \|x_2\|} \quad (5.1)$$

$$\text{ЛКК} = \frac{z_1^t z_2}{\|z_1\| \|z_2\|} \quad (5.2)$$

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.

Таблица 5.10 – Сравнение хроматографических профилей по коэффициентам Пирсона (верхняя правая половина) и коэффициентам схожести (нижняя левая половина)

Образец*	AG	AM	GR	KT	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
KT	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, KT – корейский женьшеневый чай, GR – корень женьшеня, GU – «женьшеневый» улун, SR, SRM – корень солодки

Из данных, представленных в таблице 5.10 видно, что хроматограммы женьшеня (GR) и корейского женьшеневого чая (KT) 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.

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 фитокомпонентов 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, а также гербарные образцы растений. Предложенный способ позволил, на основании визуального и количественного сопоставления хроматомасс-спектрометрических профилей диагностических ионов тритерпеновых гликозидов, идентифицировать присутствие в составе пищевых добавок и продуктов экстрактов из корней солодки, женьшеня или листьев абруса молитвенного, которые могут отвечать за наличие сладкого вкуса или аромата.

5.3.2 Сравнение хроматографических профилей, полученных в режиме сканирования

В рассмотренном в п. 5.3.1 примере использовали выбранные на основании анализа стандартных растворов и литературных данных сигналы, соответствующие групповым характеристичным ионам из паттернов фрагментации сапогенинов. Однако поиск таких сигналов для каждой группы соединений, относящихся к каждой группе образцов может быть проведен напрямую из исходных («сырых») ВЭЖХ-МС данных. Для этого необходимо выполнить их математическую обработку.

Для обработки трехмерных данных, к которым относятся данные ВЭЖХ-МС в режиме сканирования, в том числе с использованием ЛИЛ, лучше всего подходит метод параллельного факторного анализа (ПФА, PARAFAC) [218]. Уравнение разложения исходного массива (тензора) данных для ПФА можно записать следующим образом (5.3):

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (5.3)$$

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 (см. п. 2.2.5) исходных ВЭЖХ-МС данных, полученных для расширенного набора образцов (были добавлены двойные и тройные смеси экстрактов из абруса, женьшеня и солодки), которая включала «обрезку»

хроматограмм по времени, объединение сигналов с одинаковым номинальным значением массы и фильтрацию шумов, окончательные наборы данных с добавлением и без добавления смесей представляли собой тензоры третьего порядка и имели размерности $34 \times 600 \times 1200$ и $18 \times 600 \times 1200$ соответственно. Эти тензоры были подвергнуты разложению по методу ПФА с количеством компонент равным трем, выбранным с помощью критерия CORCONDIA [358]. 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. Первая матрица с размерностью $18(34) \times 3$ является матрицей счетов, две другие – матрицами нагрузок, одна из которых представляет времена удерживания (ее размерность 600×3), а вторая размерностью 1200×3 представляет отношение массы к заряду (m/z). На рисунке 5.37 представлена визуализация счетов и разделение образцов на кластеры.

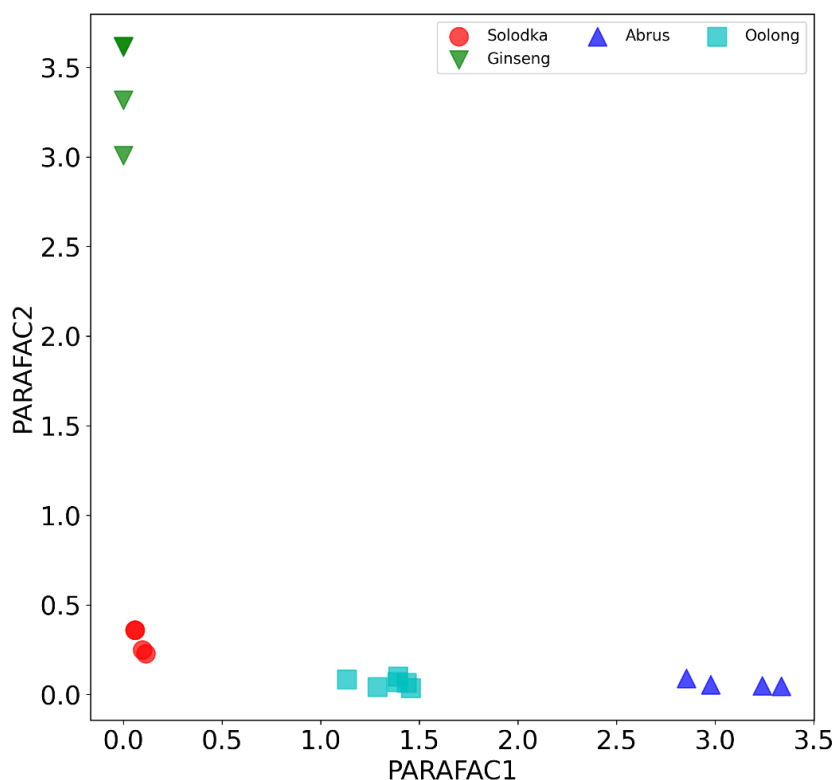


Рисунок 5.37 – Визуализация счетов ПФА для первой и второй компонент.

Расстояние⁸ 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. Как видно из

⁸ Указано среднее значение евклидова расстояния $\pm$ стандартное отклонение.

рисунка 5.37, образцы улуна имеют промежуточные значения по ГК₁, вклад которой максимален для образцов абруса, и практически нулевой вклад ГК₂ компоненты, по-видимому, отвечающей за профиль соединений женьшеня. Нагрузки, 1-ой и 2-ой компонент ПФА, отвечающие за времена удерживания, сравнивали с масс-хроматограммами чистых экстрактов по выделенным ионам, созданными суммированием интенсивностей упомянутых сигналов фрагментных ионов исследованных сапогенинов (таблицы 5.1, 5.4). Для образцов *A. precatorius* хроматограммы по выделенным ионам для ионов абрусогенина имеют ту же форму, что и временные нагрузки от ГК₁ (рис. 5.39 А, В). Для образцов *P. ginseng* такие же хроматограммы для фрагментных ионов с ППТ и ППД остовом аналогичны нагрузкам из ГК₂ (рис. 5.39 Б, Г).

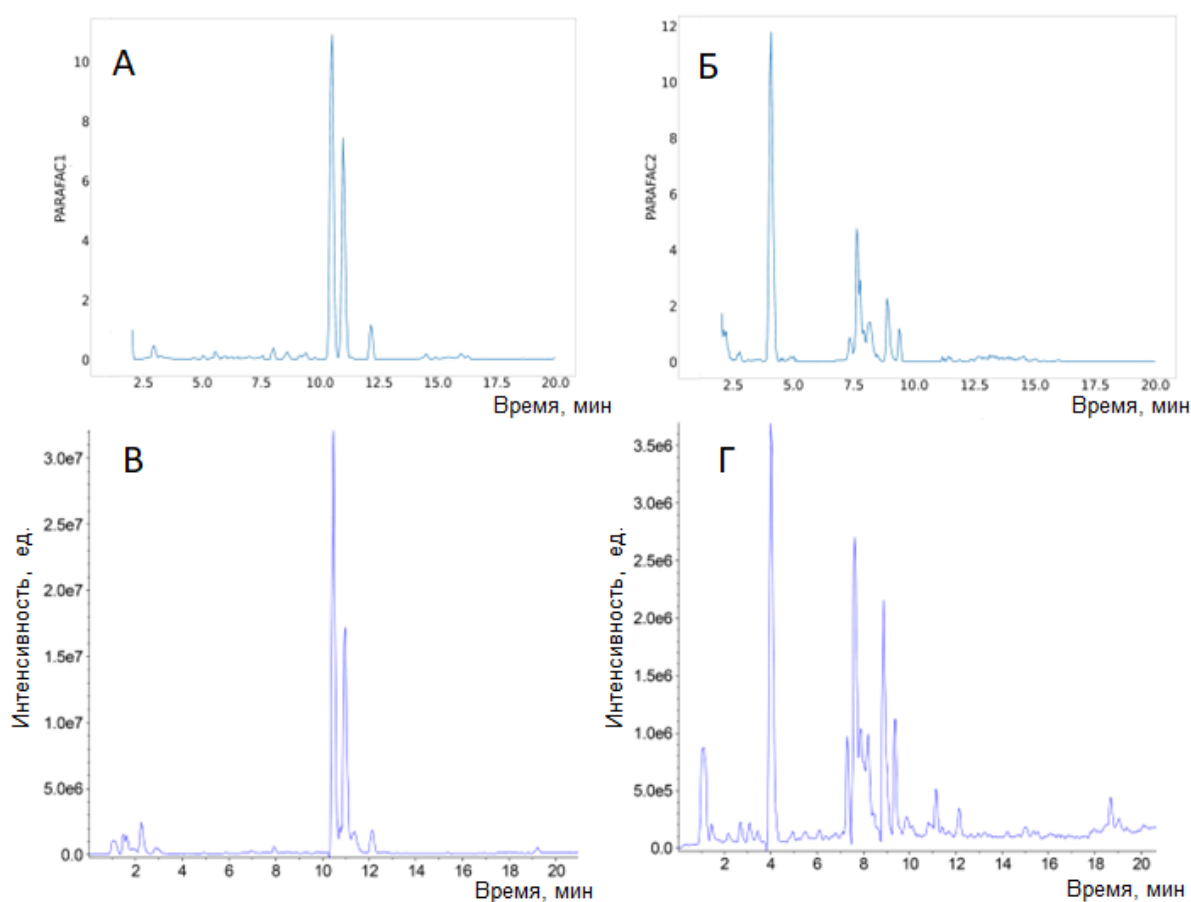


Рисунок 5.38 – Нагрузки по времени компоненты ГК₁ (А); Нагрузки по времени компоненты ГК₂ (Б); Суммарный сигнал по выделенным ионам с m/z 485, 467, 449, 439, 421 в образце *A. precatorius* (В); Суммарный сигнал по выделенным ионам m/z 443, 441, 425, 423, 407 в образце *P. ginseng* (Г).

Далее интерпретировали нагрузки по m/z . Веса всех значений m/z находились в диапазоне от 3.43 до 0.1×10^{-4} . В таблице 5.11 представлены значения m/z с наибольшими весами из компонент ГК₁ и ГК₂ с их возможной интерпретацией.

Таблица 5.11 – Значения m/z с наибольшим весом компонент $ГК_1$ и $ГК_2$

$ГК_1$			$ГК_2$		
m/z	Вес	Интерпретация*	m/z	Вес	Интерпретация
450	3.43	A [$^{13}CC_{29}H_{44}O_5-2H_2O+H$] ⁺	443	2.26	ППД [$C_{30}H_{52}O_3-H_2O+H$] ⁺
449	3.27	A [$C_{30}H_{44}O_5-2H_2O+H$] ⁺	570	2.36	ППД [$^{13}CC_{29}H_{52}O_3-3H_2O+Glc+H$] ⁺
440	3.35	A [$^{13}CC_{29}H_{44}O_5-H_2O-CO+H$] ⁺	569	2.42	ППД [$C_{30}H_{52}O_3-3H_2O+Glc+H$] ⁺
439	3.14	A [$C_{30}H_{44}O_5-H_2O-CO+H$] ⁺	459	1.93	ППТ [$C_{30}H_{52}O_4-H_2O+H$] ⁺
404	3.12	A [$^{13}CC_{29}H_{44}O_5-3H_2O-CO+H$] ⁺	423	1.91	ППТ [$C_{30}H_{52}O_4-3H_2O+H$] ⁺
403	3.04	A [$C_{30}H_{44}O_5-3H_2O-CO+H$] ⁺	405	2.07	ППТ [$C_{30}H_{52}O_4-4H_2O+H$] ⁺
422	3.28	A [$^{13}CC_{29}H_{44}O_5-2H_2O-CO+H$] ⁺	823	2.08	ППТ Rg_1 [$M+Na$] ⁺
421	3.23	A [$C_{30}H_{44}O_5-2H_2O-CO+H$] ⁺	824	2.10	ППТ [$^{13}C-Rg_1$ [$M+Na$] ⁺
468	3.29	A [$^{13}CC_{29}H_{44}O_5-H_2O+H$] ⁺	825	1.96	ППТ [$^{13}C_2-Rg_1$ [$M+Na$] ⁺
467	3.09	A [$C_{30}H_{44}O_5-H_2O+H$] ⁺	405	2.07	ППТ [$C_{30}H_{52}O_4-4H_2O+H$] ⁺
441	3.12	A [$^{13}C_2C_{28}H_{44}O_5-H_2O-CO+H$] ⁺	790	2.40	ППТ [$C_{30}H_{52}O_4+Glc+Rha-H_2O+Na$] ⁺ ППД [$C_{30}H_{52}O_3+2Glc-H_2O+Na$] ⁺
485	2.83	A [$C_{30}H_{44}O_5+H$] ⁺	406	1.97	ППТ [$^{13}CC_{29}H_{52}O_4-4H_2O+H$] ⁺
469	2.83	A [$^{13}C_2C_{28}H_{44}O_5-H_2O+H$] ⁺	425	2.25	ППД [$C_{30}H_{52}O_3-2H_2O+H$] ⁺

* $C_{30}H_{44}O_5$ - абрусогенин (А), $C_{30}H_{52}O_3$ - агликон протопанаксадиола (ППД), $C_{30}H_{52}O_4$ - агликон протопанаксатриола (ППТ)

Можно заметить, что сигналы ионов из компоненты $ГК_2$ соотносятся с фрагментными характеристичными ионами гинсенозидов из экстрактов корней *P. ginseng* (таблица 5.4). Эти сигналы включают сигналы ионов, полученных последовательным отщеплением 1-2 сахарных фрагментов и молекул H_2O . Кроме того, все ионы $ГК_1$ хорошо соотносятся с характеристичными ионами фрагментов абрусогенина (таблица 5.1). Таким образом, можно заключить, что $ГК_1$ отвечает за группу гликозидов, характерных для абруса, а $ГК_2$ за группу гинсенозидов женьшеня, т.е. предложенный подход позволил обнаружить характеристичные сигналы этих групповых диагностических фрагментных ионов напрямую в исходных ВЭЖХ-МС данных.

Образцы в расширенном наборе были визуально разделены на 7-8 групп: 3 группы индивидуальных экстрактов, 3-4 группы смесей, а последняя группа представляет образцы чая (улуна) (рис. П38). Разделение групп образцов было подтверждено применением метода k-средних (с ожидаемым количеством кластеров, равным восьми). В результатах анализа методом k-средних все образцы были помечены правильными классами, и индекс Рэнда [359] составил 100%. Однако в результатах, полученных иерархической кластеризацией с использованием

евклидовой метрики для вычисления расстояния между точками и взвешенного попарно группового метода расчета расстояния между кластерами (рис. П39), два образца из тройных смесей были отнесены к группе двойной смеси *P. ginseng* и *A. Precatorius* и индекс Рэнда составил 98.4%.

На полученных графиках (рис. 5.37 и П38) точки данных, относящихся к экстрактам чая-улуна, расположены между группами экстрактов *A. precatorius* и *G. glabra* и вблизи кластера их двойных смесей, что совпадает с данными, полученными путем построения характеристичных хроматограмм (см. п. 5.3.1). 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. Для этого можно использовать различные модели основе МГК и кластерного анализа по аналогии с работой [217], требующие валидации на большом объеме экспериментальных данных. Однако, в любом случае, такой анализ может быть использован только в качестве предварительного, и необходимо использовать стандартные образцы БМ для их однозначной идентификации в исследуемых экстрактах.

5.4 Выводы к главе 5

Суммируя установленные особенности масс-спектров растительных сапонинов различной структуры, следует отметить частое отсутствие сигналов протонированных молекул, а также более низкую интенсивность сигналов аддуктов с ионами натрия и калия, по сравнению с сигналами отрицательно заряженных депротонированных молекул, по которым определяется молекулярная масса соединения. Можно заключить, что регистрация отрицательных ионов и ионных переходов в режиме МЗР или СИМ является более чувствительным способом детектирования для данных классов соединений, по сравнению с регистрацией положительных ионов, однако последняя позволяет получить доступ к дополнительной структурной информации и установлению фрагментарных формул обнаруженных веществ благодаря явлению фрагментации в источнике ионов. Отщепление сахаридных заместителей выражается в виде серии ионов в масс-спектре, по разнице m/z между которыми устанавливают количество и состав

боковых сахаридных цепей. Сигналы фрагментных ионов сапогенина, образующиеся при отщеплении нескольких молекул воды, характеризуют тип сапогенина и повышают надежность идентификации за счет одновременной регистрации нескольких ионов. В случае одинаковых значений m/z для ионов из паттернов фрагментации разных (изомерных) сапогенинов может быть использована зависимость их интенсивностей от потенциала декластеризации, устанавливаемого на входе в масс-анализатор, тогда при мониторинге в режиме СИМ такие сигналы будут иметь одинаковое значение m/z , но разные условия регистрации сигнала, а на хроматограммах пики, относящиеся к данным типам агликонов будут демонстрировать разное соотношение этих сигналов.

Выбранные таким образом групповые характеристичные фрагментные ионы служат в качестве диагностических для быстрого обнаружения структурных аналогов на хроматограммах растительных экстрактов и построения характеристичных хроматограмм, которые могут быть использованы как для поиска и предварительной идентификации минорных соединений и изменённых по боковой цепи производных из рассматриваемых групп компонентов, так и в качестве «отпечатков пальцев» для исследуемых растений. Сопоставление таких «отпечатков пальцев» позволяет напрямую классифицировать образцы смесей и продуктов на их основе по содержанию той или иной группы фитокомпонентов без использования индивидуальных стандартных образцов их фитокомпонентов. Предлагаемый подход ВЭЖХ-МС-ПФА также можно использовать для нецелевого поиска групповых признаков. Продемонстрирована возможность выявления диагностических групповых сигналов путем анализа матриц нагрузок.

В экстрактах ароматизированного чая улуна разных производителей были определены добавки *G. glabra* и *Abrus precatorius*. Присутствие фитокомпонентов последнего (абрусозидов) было подтверждено путем выделения их агликона (абрусозида) и одного из его гликозидов в индивидуальном состоянии с последующим анализом методом ЯМР.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ГРУППОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ И СТЕРОИДНЫХ САПОНИНОВ⁹

Описание проблемы. Постановка задачи. В настоящее время известно более 600 различных гинсенозидов женьшеня [115]. Традиционный метод определения гинсенозидов [278,279] включает в себя приготовление серии стандартных растворов и установление градуировочных функций. Этот процесс является трудоемким и занимает большое количество времени, более того, не всегда есть возможность получить необходимые для анализа стандартные образцы. В связи с этим возникает потребность в новых способах группового определения гинсенозидов и других биоактивных компонентов растений, использующих меньшее количество дорогостоящих индивидуальных стандартных образцов. Такие методы (QAMS, SSDMC) были разработаны в варианте ВЭЖХ-УФ и внедрены в фармакопею Китая [360,361]. Разработка ВЭЖХ-МС-КАМС методик еще более перспективна, поскольку в ВЭЖХ-УФ необходимо использовать относительные времена удерживания (relative retention times, RRT), в то время как в ВЭЖХ-МС есть возможность получить масс-спектр для каждого пика и удостовериться в правильности его идентификации.

Разработка таких методик включает несколько основных стадий: 1) выбор условий детектирования исследуемой группы соединений; 2) выбор условий их хроматографического разделения; 3) расчет и оценка стабильности и

⁹ При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Stavrianidi 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%; Stekolshchikova E., Turova P., Shpigun O., Rodin I., Stavrianidi 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%; 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%; 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%; Stavrianidi 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%; 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%; Abashev M., Stekolshchikova E., Stavrianidi 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%.

воспроизводимости факторов отклика (ФО) и относительных факторов отклика (ОФО) с использованием стандартных образцов определяемых соединений; 4) оценка метрологических характеристик; 5) проверка применимости при анализе экстрактов из растительного сырья.

6.1 Выбор условий группового разделения и определения тритерпеновых сапонинов женьшеня

В п. 5.2.1 приведены результаты исследования масс-спектрометрического поведения гинсенозидов женьшеня. Помимо потенциала декластеризации (ПД) такие параметры, как температура источника, потенциал на нулевом квадруполе (входной потенциал, ВП), давление потоков газа-завесы и газа-распылителя, а также напряжение на капилляре, влияют на эффективность ионизации, которая в свою очередь определяет величину отклика масс-спектрометрического детектора. Влияние этих параметров на чувствительность и ФО при определении гинсенозидов рассмотрено ниже, а в следующем пункте будут рассмотрены особенности хроматографического поведения и разделения групп гинсенозидов с разным типом агликона.

6.1.1 Исследование хроматографического поведения гинсенозидов

Гинсенозиды различных типов отличаются друг от друга структурой агликона (сапогенина). Помимо основания в состав гинсенозидов входят сахаридные остатки и другие заместители. Чаще всего в структурах гинсенозидов встречаются глюкоза, рамноза, арабиноза, а также более простые структуры, например, ацетил- и малонил-заместители. Для эффективного разделения гинсенозидов необходимо находить баланс между селективностью используемых хроматографических систем по отношению к разным агликонам и разным сахаридным заместителям. Наиболее распространенным вариантом разделения гинсенозидов является ОФ ВЭЖХ с использованием C18 сорбентов [362].

Ранее [330] были выбраны условия хроматографического разделения гинсенозидов на колонке Acclaim C18 150×3 мм с размером частиц 3 мкм и диаметром пор 120 Å со скоростью потока 0.4 мл/мин. Программа градиента приведена красной линией на рисунке 6.1.

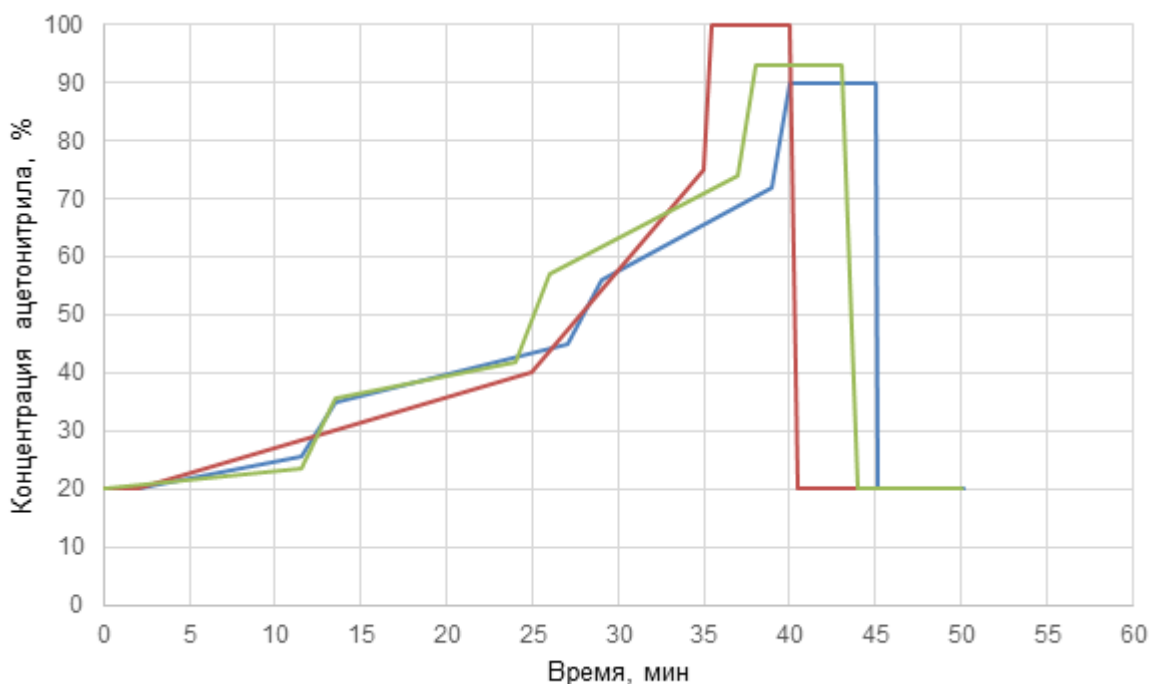


Рисунок 6.1 – Программы градиентного элюирования на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 3 мкм (красный); на аналогичной колонке с диаметром зерна сорбента 2.2 мкм (синий); выбранный градиент элюирования на той же колонке (зеленый).

При проведении анализа смеси стандартных гинсенозидов в приведенных условиях не удалось добиться полного ($R_s > 1,5$) разделения некоторых соединений, относящихся к одному структурному типу и отличающихся на один рамнозный заместитель, например, Re и Rg₁, F₁₁ и RT₅. Кроме того, поскольку детектирование велось в режиме СИМ, основной задачей было добиться разделения хроматографических пиков гинсенозидов, содержащих в своей структуре одинаковый сапогенин, характеризующийся одинаковыми значениями m/z фрагментных ионов в масс-спектре. Времена удерживания и величины разрешений пиков представлены в таблице 6.1. Хроматограмма представлена на рисунке 6.2.

В данных хроматографических условиях наблюдался ряд пар аналитов, для которых достигалось частичное разделение, недостаточное для корректного проведения количественного анализа. Пары Rg₁ и Re, F₁₁ и RT₅, Rh₁ и Rg₂, Rb₃ и Rb₂, F₁ и Rd содержат сапогенин одного типа, в то время как для некоторых пар, относящихся к гинсенозидам различного типа, не требуется полное разделение, поскольку детектируемые фрагменты гинсенозидов данных пар принадлежат к типам ППД и ОТ, ППТ и ОК, ППД и ОК и не имеют между собой сигналов с близкими значениями m/z .

Таблица 6.1 – Времена удерживания и величины разрешений пиков гинсенозидов

Гинсенозид	t_r , мин	R_s
R ₁	9.95	-
Rg ₁	11.81	7.44 (Rg ₁ -R ₁)
Re	11.94	0.65 (Rg₁-Re)
Rf	15.71	15.08 (Rf-Re)
F ₁₁	16.83	3.73 (Rf-F ₁₁)
RT ₅	17.10	0.90 (F₁₁-RT₅)
Rb ₁	17.17	0.23 (RT₅-Rb₁)*
Rg ₂	18.10	3.38 (Rb ₁ -Rg ₂)
Rc	17.78	2.08 (Rb ₁ -Rc), 1.16 (Rg₂-Rc)*
Rh ₁	18.37	1.08 (Rh₁-Rg₂)
Ro	18.30	0.25 (Rh₁-Ro)*
Rb ₂	18.46	0.64 (Ro-Rb₂)*, 1.00 (Rh₁-Rb₂)*
Rb ₃	18,66	1.00 (Rb₂-Rb₃)
F ₁	20.18	6.08 (Rb ₃ -F ₁)
Rd	20.29	0.37 (F₁-Rd)*
F ₂	27.16	22.90 (F ₂ -Rd)
Rg ₃	28.56	4.67 (Rg ₃ -F ₂)
C-K	32.94	14.60 (CK-Rg ₃)
Rh ₂	33.50	1.87 (Rh ₂ -CK)

*гинсенозиды в паре относятся к разным группам по структуре сапогенина

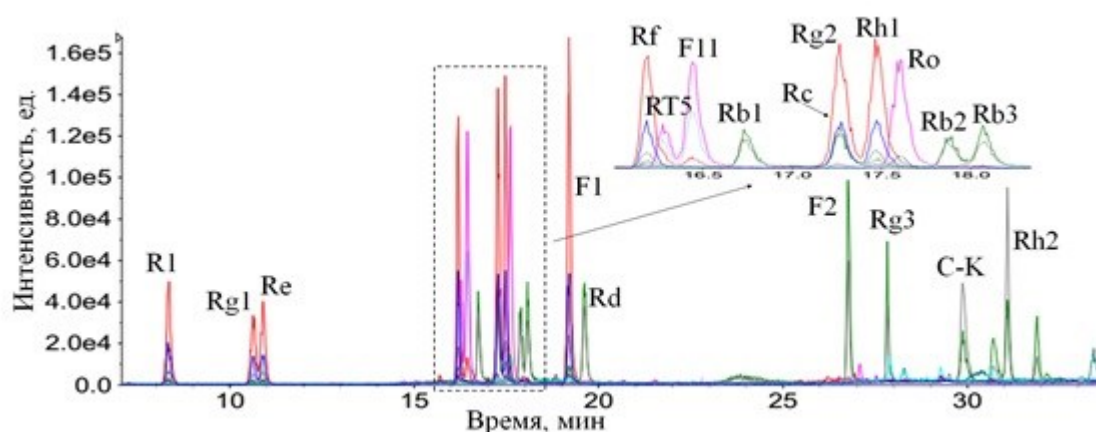


Рисунок 6.2 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна 3.0 мкм в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый- m/z 425.3.

Несколько улучшить хроматографическое разделение попробовали, используя аналогичную колонку с меньшим диаметром зерна сорбента (Acclaim

RSLC C18 150×2.1 мм 2.2 мкм). На данном этапе работы так же параллельно варьировали программу градиентного элюирования, таким образом, чтобы добиться максимальной эффективности и оптимальных кажущихся коэффициентов емкости (от 1 до 5). Были протестированы различные условия разделения так, чтобы было возможно разделить 15 гинсенозидов двух типов (ППД и ППТ) при совместном определении в режиме СИМ.

В условиях ступенчатого градиента (рис. 6.1) удалось получить удовлетворительное ($R_s > 1.0$) разрешение пиков гинсенозидов и добиться разделения таких трудноразделяемых компонентов, как изомерные гинсенозиды Rb₂ и Rb₃, гинсенозиды Rg₁ и Re, отличающиеся одним сахаридным заместителем (рамноза), а также гинсенозиды Rg₂ и Rh₁, отличающиеся одним сахаридным заместителем (глюкозой). Выбранная программа градиентного элюирования подходит для анализа методами ВЭЖХ-МС (рис. 6.3) и ВЭЖХ-УФ (рис. 6.4).

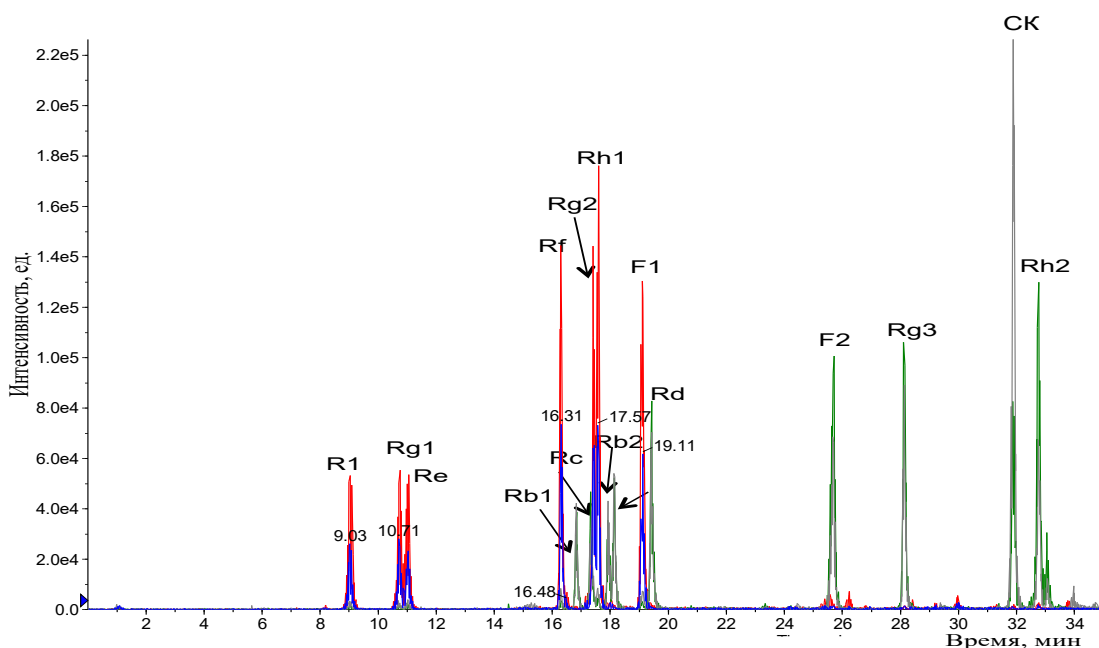


Рисунок 6.3 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна 2.2 мкм в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый - m/z 425.3.

После добавления к стандартной смеси еще 2 слабополярных гинсенозидов F₄ и Rh₃ была подобрана третья программа градиентного элюирования (рис. 6.1). Суммарное время одного хроматографического анализа с учетом стадии промывки колонки и кондиционирования на начальных условиях составило 50 мин (рис. 6.5).

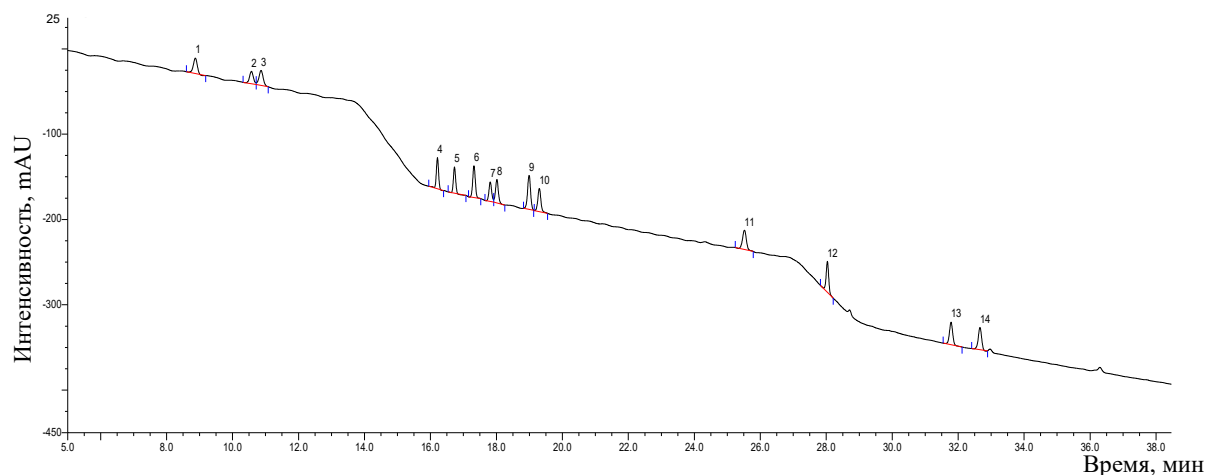


Рисунок 6.4 – Хроматограмма стандартной смеси гинсенозидов на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна 2.2 мкм. УФ-детектирование: 200 нм. Цифрами отмечены гинсенозиды: 1- R₁, 2- Rg₁, 3- Re, 4- Rf, 5- Rg₂, 6- Rb₁, 7- Rb₂, 8- Rb₃, 9- F₁, 10- R_d, 11- F₂, 12- Rg₃, 13- C-K, 14- Rh₂.

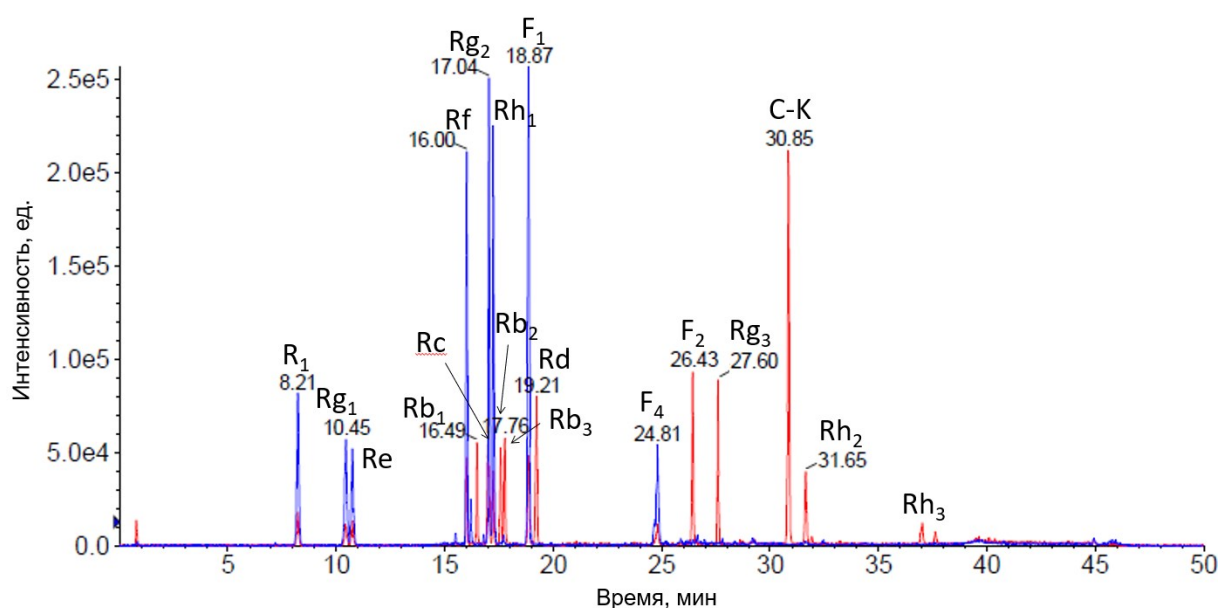


Рисунок 6.5 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна 2.2 мкм в выбранных условиях градиентного элюирования в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый - m/z 425.3.

Также, желательным является разделение гинсенозидов разного типа (принадлежащих к ППТ, ОТ и ППД типам), так как соотношение массы к заряду сигнала фрагмента гинсенозида ППТ типа меньше на 2 Да, чем m/z соответствующих сигналов паттерна фрагментации ППД сапогенина, и наблюдается слабый сигнал изотопного расщепления $A+2$, связанный с присутствием двух изотопов ^{13}C , вследствие чего на приборах низкого разрешения происходит наложение и суммирование $A+1/A+2$ и A сигналов ППТ и ППД гинсенозидов,

соответственно. Вклад сигнала ионов, содержащих изотоп ^{18}O , в интенсивность сигнала $A+2$ при этом оказывается незначительным в силу низкой распространенности данного изотопа и малого количества атомов кислорода в агликонах гинсенозидов.

С целью охарактеризовать разделение гинсенозидов с отличающимися тритерпеновыми остовами молекулы на различных колонках вычисляли групповые коэффициенты селективности. Первоначально рассчитывали приведенные (кажущиеся) факторы удерживания для каждого компонента смеси по формуле (6.1):

$$k'^0 = (t_R - t_{R^0})/t_{R^0} \quad (6.1)$$

где t_R – время удерживания; t_{R^0} – время удерживания гинсенозидов R_1 и R_{b1} ;

Далее, отдельно для гинсенозидов ППТ (6.2) и ППД (6.3) типа вычисляли среднегрупповой приведенный фактор удерживания (среднее значение приведенных факторов удерживания всех соединений данной группы).

$$k'^0_{\text{ППТ}} = \frac{\sum_{i \in \text{ППТ}} k'^0(R_i)}{i} \quad (6.2)$$

$$k'^0_{\text{ППД}} = \frac{\sum_{i \in \text{ППД}} k'^0(R_i)}{i} \quad (6.3)$$

Затем находили отношение среднегрупповых приведенных факторов удерживания гинсенозидов ППТ и ППД типа и тем самым получали групповой коэффициент селективности (6.4):

$$\alpha_{\text{ППД/ППТ}} = k'^0_{\text{ППТ}}/k'^0_{\text{ППД}} \quad (6.4)$$

Чтобы обеспечить удовлетворительное разделение вышеуказанных пар гинсенозидов и групп сапонинов между собой одновременно, оптимизировали условия ВЭЖХ разделения таким образом, чтобы значение группового коэффициента селективности было максимальным. Оптимизировали такие условия проведения анализа как объемная скорость потока элюента, температура термостата колонки, состав элюента и состав добавки в подвижную фазу. А также проводили эксперименты на различных колонках. Условия анализа указаны в таблице 6.2.

На колонке Acclaim C18 (150×3 мм; 3 мкм), заполненной модифицированным сорбентом C18: Варьирование хроматографических параметров проводили в соответствии с таблицей 6.3.

Таблица 6.2 – Условия разделения гинсенозидов на различных колонках

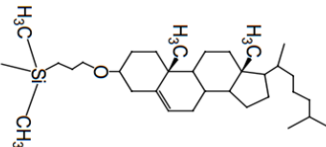
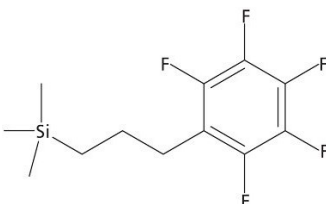
Колонка	Структура заместителя	Условия определения
Acclaim 120 A C18 (150 × 3 мм; 3 мкм)	C18	ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN-CH ₃ OH 10%
Acclaim 120A C18 (150 × 2.1 мм; 2.2 мкм)	C18	ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN, F = 0.4 мл/мин, T _{кол} = 35 °С
Acclaim 120A C18 (150 × 2.1 мм; 2.2 мкм)	C18	ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN-CH ₃ OH 20%, F = 0.4 мл/мин, T _{кол} = 35 °С
Hypersil GOLD aQ (150 × 2.1 мм; 3 мкм)	C18, C ₃ H ₆ OH	ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN, F = 0.4 мл/мин, T _{кол} = 35 °С
Hypersil Gold C8 (150 × 2.1 мм; 5 мкм)	C8	ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN, F = 0.5мл/мин, T _{кол} = 30 °С
Cosmosil cholester (100 × 20 мм; 2.5 мкм)		ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN, F = 0.4мл/мин, T _{кол} = 30 °С
Cosmosil cholester (100 × 20 мм; 2.5 мкм)		ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN-CH ₃ OH 13%, F = 0.4мл/мин, T _{кол} = 30 °С
Hypersil Gold PFP (150 × 2.1 мм; 3 мкм)		ПФ: H ₂ O-CH ₃ CN, F = 0.5мл/мин, T _{кол} = 30 °С

Таблица 6.3 – Варьирование хроматографических параметров при разделении гинсенозидов на колонке Acclaim C18

Параметр	Значения
Скорость потока элюента	0.6; 0.7; 0.8 мл/мин
Температура колонки	25, 30, 35 °С
pH	2.7; 3.3; 4.3; 6.1
C _(MeOH)	0, 10, 20, 40, 60 об. %

Изменение объемной скорости потока элюента. Первым шагом было варьирование скорости потока, все остальные параметры сохранялись прежними. Эксперимент проводили при скоростях 0.8 мл/мин, 0.7 мл/мин, 0.6 мл/мин. Полученные значения разрешений некоторых пар гинсенозидов представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Разрешение пар пиков гинсенозидов при различных скоростях потока

R_s пиков гинсенозидов	Скорость потока		
	0.6 мл/мин	0.7 мл/мин	0.8 мл/мин
<i>Гинсенозиды одного типа</i>			
R _s (R _{g1} – R _e)	0.65	0.74	0.71
R _s (F ₁₁ – R _{T5})	0.90	0.77	0.60
R _s (R _{h1} – R _{g2})	1.08	0.10	1.20
R _s (R _{b2} – R _{b3})	1.00	1.00	0.95
<i>Гинсенозиды разных типов</i>			
R _s (R _{g2} – R _c)	1.16	0.73	0
R _s (R _{h1} – R _{b2})	1.00	2.28	2.00
R _s (F ₁ – R _d)	0.37	1.20	1.64

Полученные данные свидетельствуют о том, что для пары R_{g2}-R_c величина разрешения уменьшается с увеличением объемной скорости потока и при значении 0.8 мл/мин данные соединения перестают разделяться. Разрешение пар R_{h1}-R_{b2}, F₁-R_d, напротив, ухудшается с уменьшением объемной скорости потока элюента. Таким образом, в качестве оптимального значения выбрано 0.7 мл/мин.

При изменении объемной скорости потока меняется эффективность хроматографической колонки. Чем больше число теоретических тарелок (ЧТТ), тем выше эффективность разделения и меньше ширина хроматографического пика. Следовательно, величина разрешения между смежными пиками будет расти. Ниже, в таблице 6.5, приведена зависимость числа теоретических тарелок от скорости потока элюента.

Из данных в таблице 6.5 видно, что наибольшее ЧТТ, а, следовательно, эффективность колонки, наблюдали при значении скорости потока элюента 0.7 мл/мин. Групповой коэффициент селективности $\alpha_{\text{лпд/ппт}}$ (6.4) не значительно изменялся на разных скоростях потока, что согласуется с теорией хроматографического разделения. Для колонки с данными характеристиками сорбента не удастся достигнуть величин разрешения близких к 1.5 для всех пар

аналитов только посредством изменения скорости потока, поэтому в дальнейшем рассмотрено влияние других параметров на разделение гинсенозидов.

Таблица 6.5 – Эффективность (N , ЧТТ) для пиков гинсенозидов при различных скоростях потока элюента

Гинсенозид	Скорость потока элюента		
	0.6 мл/мин	0.7 мл/мин	0.8 мл/мин
Rf	8448	16169	15283
F ₁	25090	33805	31725
F ₁₁	17451	23572	15478
Ro	20632	28078	26706
Rd	25364	54291	51529

Изменение температуры колонки. Следующим шагом стало исследование влияния температуры термостата колонки на разделение пиков. Начальная температура составляла 35°C. Полученные значения разрешения пиков некоторых пар анализов приведены в таблице 6.6.

Таблица 6.6 – Разрешение пар пиков гинсенозидов при различной температуре колонки

R _s гинсенозидов	Температура колонки				
	22 °C	25 °C	30 °C	35 °C	37 °C
<i>Гинсенозиды одного типа</i>					
R _s (Rg ₁ – Re)	1.18	1.07	0.92	0.68	0.51
R _s (F ₁₁ – RT ₅)	0.55	0.60	0.67	0.77	0.82
R _s (Rh ₁ – Rg ₂)	0.91	0.77	1.04	0.98	0.94
R _s (Rb ₂ – Rb ₃)	0.98	0.95	0.95	1.00	0.96
<i>Гинсенозиды разных типов</i>					
R _s (Rg ₂ – Rc)	2,89	2.80	2.56	1.76	1.55
R _s (Rh ₁ – Rb ₂)	0.21	0.20	0.27	0.72	0.55
R _s (F ₁ – Rd)	0.31	0.33	1.05	1.17	1.23

Ниже на рисунке 6.6 представлена зависимость группового коэффициента селективности (6.4) от температуры колонки.

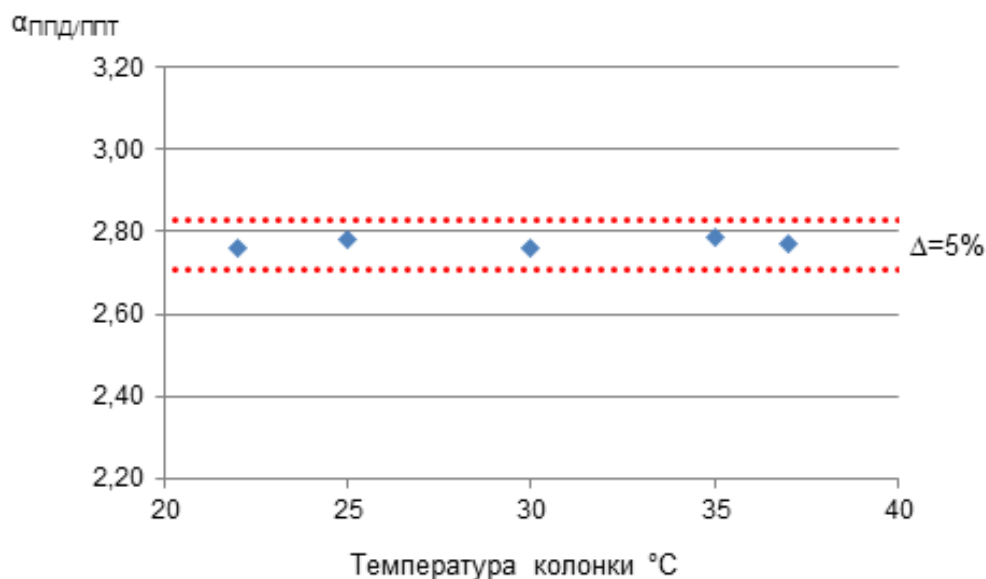


Рисунок 6.6 – Зависимость группового коэффициента селективности от температуры колонки.

Из графика следует, что изменение температуры разделения не оказывает значительного влияния на групповой коэффициент селективности, и, как следствие, не позволяет достичь лучшего разделения гинсенозидов ППТ и ППД типа.

Выбор оптимальной температуры термостата колонки обусловлен противоположным изменением разрешения пар $R_{g1} - R_e$ и $F_{11} - R_{t5}$ с изменением температуры (рис. 6.7).

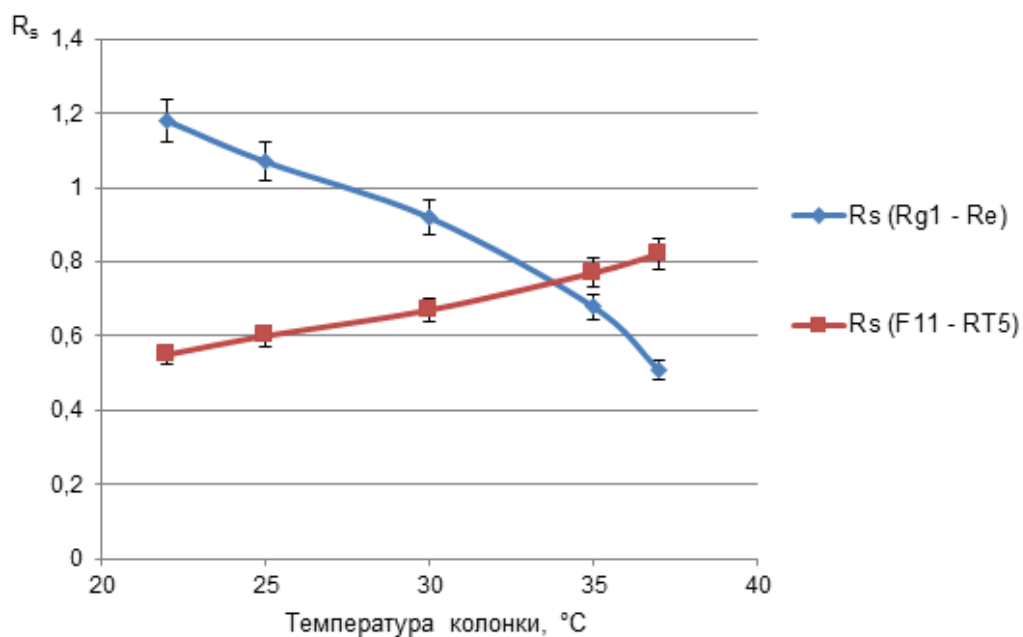


Рисунок 6.7 – Зависимость разделения пар пиков $R_{g1}-R_e$ и $F_{11}-R_{t5}$ от температуры колонки.

Представленный график иллюстрирует, что при повышении температуры ухудшается разрешение пары R_{g1} - R_e , и улучшается для пары F_{11} - R_{T5} . В качестве оптимальной температуры выбрали среднюю – 30°C.

Таким образом, наибольшее значение имеет подбор температуры при выбранных условиях анализа для улучшения разделения отдельных пар хроматографических пиков, а на групповой коэффициент селективности (6.4) температура влияет незначительно.

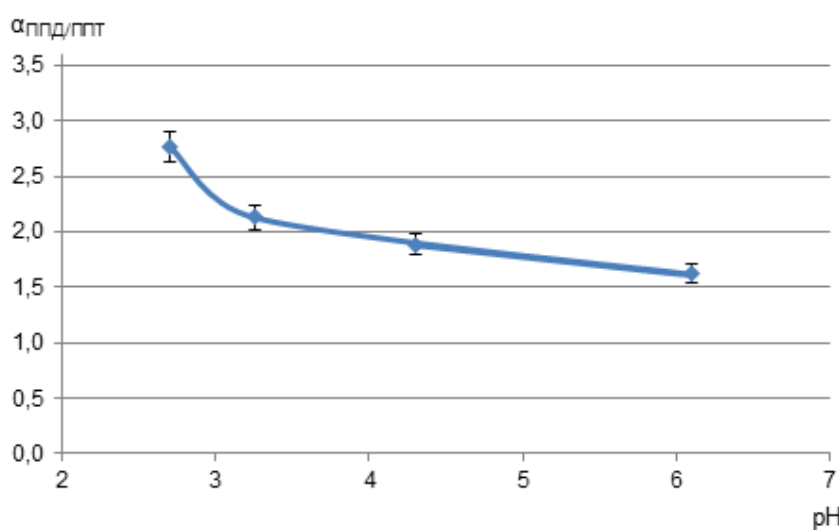
Изменение величины рН. На следующем этапе проверялось влияние рН подвижной фазы на параметры хроматографического поведения анализируемых веществ. Различные добавки к элюенту используются для поддержания постоянного значения рН подвижной фазы и смещения кислотно-основного равновесия ионизирующихся аналитов для перевода в одну протонированную или депротонированную форму. Это позволяет добиться приемлемых времен удерживания и интенсивностей пиков определяемых веществ в случае работы масс-спектрометра в режиме регистрации положительных ионов. В начальных экспериментах в подвижной фазе присутствовала добавка муравьиной кислоты в количестве 0.1% по объему. В качестве добавок к подвижной фазе использовали уксусную кислоту, ацетат аммония и формиат аммония. Разделение смеси стандартных гинсенозидов проводили с использованием в качестве подвижной фазы водных растворов 0.1% уксусной кислоты, 10 мМ ацетата аммония и 10 мМ формиата аммония. Полученные значения разрешения для некоторых веществ приведены в таблице 6.7.

Добиться полного разделения пар пиков не удалось. На рисунке 6.8 представлен график зависимости группового коэффициента селективности (6.4) от рН подвижной фазы.

Полученная зависимость показывает, что снижение рН подвижной фазы обеспечивает более полное разделение групп гинсенозидов, имеющих в своем составе разный сапогенин и отличающихся количеством ОН-групп. При использовании буферных растворов наблюдается понижение интенсивности сигналов и, соответственно, площадей пиков (уменьшение чувствительности), в силу подавления ионизации.

Таблица 6.7 – Разрешение пар пиков гинсенозидов при различных значениях pH

R_s пиков гинсенозидов	pH			
	0.1 % HCOOH	0.1 % CH ₃ COOH	10 мМ HCOONH ₄	10 мМ CH ₃ COONH ₄
	2.7	3.3	4.3	6.1
<i>Гинсенозиды одного типа</i>				
R _s (Rg ₁ – Re)	0.92	0.55	0.67	0.65
R _s (F ₁₁ – RT ₅)	0.67	1.15	1.15	1.10
R _s (Rh ₁ – Rg ₂)	1.04	1.04	1.08	1.35
R _s (Rb ₂ – Rb ₃)	0.95	0.76	0.90	1.40
<i>Гинсенозиды разного типа</i>				
R _s (Rg ₂ – Rc)	2.56	0.88	1.20	1.50
R _s (Rh ₁ – Rb ₂)	0.27	1.08	0.93	1.09
R _s (F ₁ – Rd)	1.05	0.92	1.05	1.20

**Рисунок 6.8** – График зависимости группового коэффициента селективности от pH.

Далее варьировали содержание муравьиной кислоты, для того чтобы оценить влияние небольшого изменения значения pH. На рисунке 6.9 проиллюстрирована зависимость тангенсов углов наклона градуировочных графиков гинсенозидов, содержащих в своем составе различные типы сапогенина, от концентрации муравьиной кислоты. Структура гинсенозидов содержит несколько кислотных гидроксильных групп, способных к диссоциации в водном растворе. Добавка муравьиной кислоты в элюент применяется для поддержания постоянного значения

pH подвижной фазы. Такой прием позволяет добиться приемлемых времен удерживания и интенсивностей сигналов определяемых веществ при проведении масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

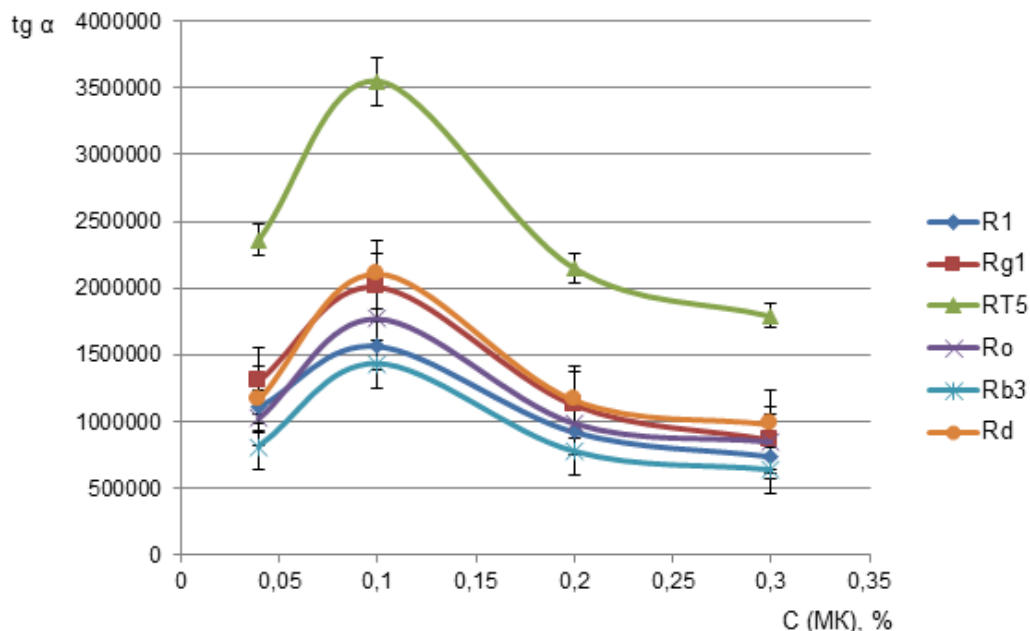


Рисунок 6.9 – Зависимость тангенсов углов наклона градуировочных графиков гинсенозидов от концентрации муравьиной кислоты (МК).

Кривая зависимости чувствительности определения гинсенозидов от объемной доли добавки муравьиной кислоты характеризуется максимумом, соответствующим концентрации муравьиной кислоты равной 0,1 %. Последующее увеличение доли добавки муравьиной кислоты в подвижную фазу не приводит к улучшению ионизации определяемых соединений.

Изменение объемной доли органического растворителя в подвижной фазе. В обращенно-фазовом варианте хроматографии элюирующая сила растворителя падает с ростом его полярности. Так, в ряду растворителей вода – метанол – ацетонитрил – изопропанол наблюдается рост элюирующей силы [363]. Ранее разделение гинсенозидов на обращенно-фазовой колонке проводили с использованием системы растворителей вода-ацетонитрил, однако, как было показано, подобный состав элюента не позволяет добиться приемлемого разделения пар гинсенозидов одного типа. Ацетонитрил и метанол принадлежат к разным группам согласно классификации по Снайдеру [363]. Так, метанол обладает большей способностью к протонодонорным взаимодействиям, ацетонитрил – к диполь-дипольным взаимодействиям. Таким образом, происходит изменение селективности

при замене одного растворителя на другой из группы, наиболее удаленной на треугольнике или при их смешении. Основываясь на вышеупомянутом различии в свойствах растворителей, проводили изменение состава элюента путём увеличения объемной доли метанола. Величину добавки изменяли в диапазоне 0-60%. На рисунке 6.10 и 6.11 приведена зависимость группового коэффициента селективности (6.4) и разрешения пар пиков $R_{g1} - R_e$ и $R_{b2} - R_{b3}$ от концентрации метанола. На разрешение соседних пиков гинсенозидов ППТ и ОТ типа содержание метанола не оказывает влияния.

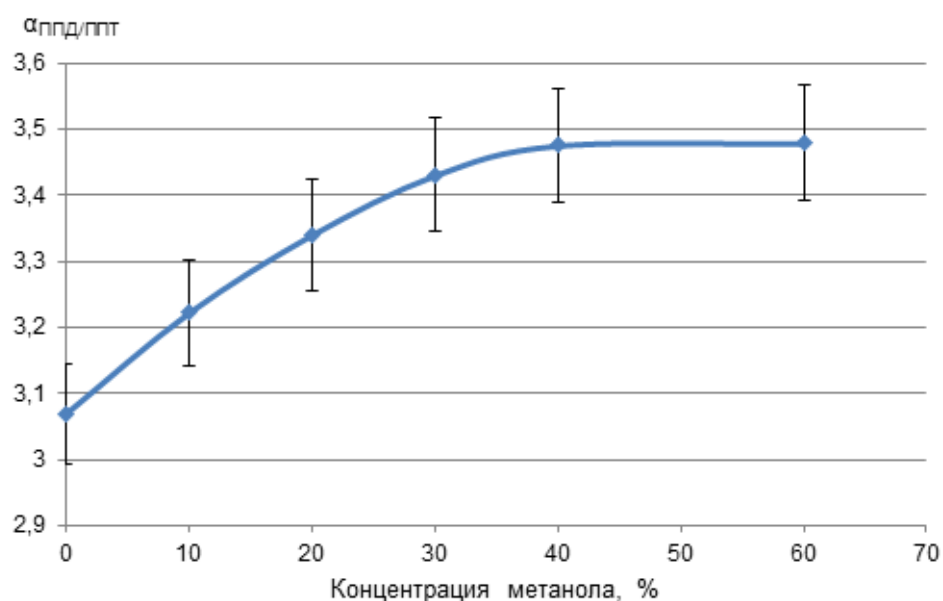


Рисунок 6.10 – Зависимость группового коэффициента селективности от концентрации метанола.

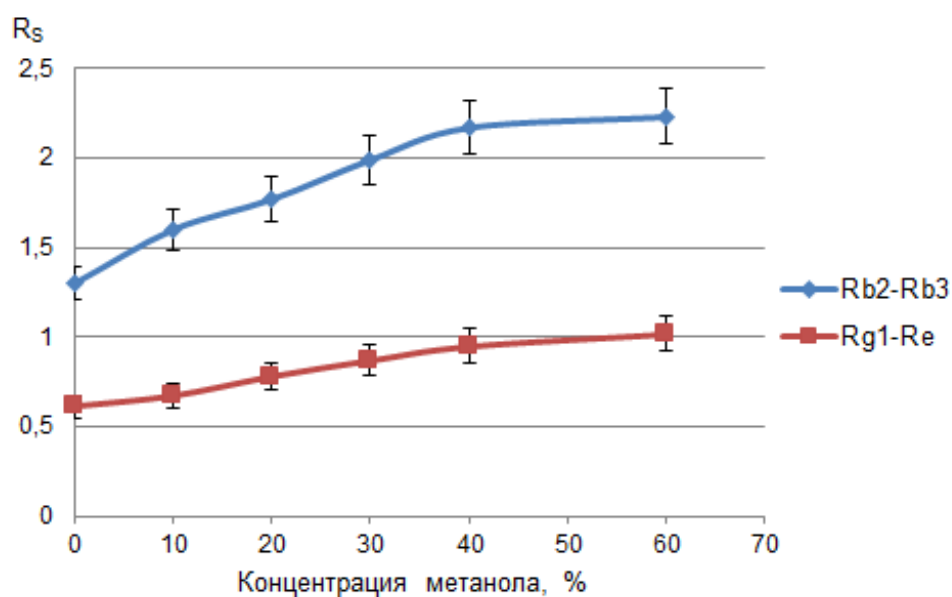


Рисунок 6.11 – Зависимость разрешения пар пиков $R_{g1} - R_e$ и $R_{b2} - R_{b3}$ от концентрации метанола.

Из рисунка 6.10 и 6.11 можно сделать вывод, что при увеличении концентрации метанола разделение пиков гинсенозидов, принадлежащих к различным типам, растёт.

Таким образом, было показано, что изменение температуры колонки, скорости потока, состава и программы градиента подвижной фазы не приводит к полному ($R_s > 1.5$) разделению хроматографических пиков гинсенозидов внутри одной группы, а также между гинсенозидами различных типов. Кроме того, нецелесообразно увеличивать содержание метанола более 30%, поскольку это приводило к существенному снижению интенсивности сигналов фрагментных ионов и увеличению времен удерживания определяемых веществ. Поэтому на следующем этапе экспериментов для решения задачи группового разделения ППТ и ППД гинсенозидов проводили анализ на других хроматографических сорбентах (таблица 6.2). Результаты экспериментов на различных колонках приведены в таблице 6.8.

Таблица 6.8 – Значения параметров разделения пиков 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 150×3 мм, 3 мкм	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 150×21 мм, 3 мкм	H ₂ O- CH ₃ CN	0.9	2.2	2.5	0.9	0.7	< 0.2	0.6
Hypersil Gold C8 150×21 мм, 5 мкм	H ₂ O- CH ₃ CN	1.3	3.2	2.5	0.9	2.1	< 0.2	< 0.2
Cosmosil 100×20 мм, 2.5 мкм	H ₂ O- CH ₃ CN	0.9	2.3	2.5	2.5	< 0.2	0.4	0.6
Cosmosil 100×20 мм, 2.5 мкм	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 150×21 мм, 3 мкм	H ₂ O- CH ₃ CN	4.5	20.3	4.6	1.7	2.7	1.7	1.4

Колонка Hypersil GOLD aq заполнена неподвижной фазой на основе силикагеля с привитыми C18-группами с эндкеппингом. Полярные группы,

которыми модифицируют сорбент в данной колонке, обуславливают дополнительные взаимодействия с полярными соединениями, что обеспечивает большее удерживание полярных компонентов. Показано (таблица 6.8), что полярной модификации сорбента Hypersil GOLD aq оказывается недостаточно для изменения селективности разделения пары гинсенозидов Rh₁ и Rg₂, а также и для других пар гинсенозидов. Колонка Hypersil Gold C8 (150 × 21 мм, 3 мкм) обеспечивает схожую с колонкой C18 селективность и аналогичный порядок элюирования, но характеризуется меньшими временами удерживания. При работе на данной колонке наложались пики гинсенозидов Rg₂ – Rh₁ и Rb₂ – Rb₃, разделение пары RT₅ – F₁₁ достигло приемлемого значения (больше 1.5). Аналогичным образом, полного разделения на данной колонке достигнуть не удалось.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что разделение стандартной смеси гинсенозидов на колонках с привитыми алкильными заместителями остается неудовлетворительным, независимо от длины и модификации углеводородной цепи и добавки метанола. В связи с этим последующие эксперименты по подбору условий хроматографического разделения проводили на колонках с альтернативной селективностью. Так, например, сорбент, использующийся в колонке Cosmosil cholester (100 × 20 мм, 2.5 мкм), представляет собой силикагель с привитыми холестериловыми группами (таблица 6.2). Удерживание аналитов на данном сорбенте реализуется преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий. Использование подвижной фазы на основе ацетонитрила с 13% добавкой метанола позволило добиться удовлетворительного разделения пары Rg₁ – Re, в то время как разрешение для остальных пар пиков гинсенозидов оставалось неудовлетворительным для количественного анализа.

Колонка Hypersil Gold PFP (150 × 21, 3 мкм) заполнена сорбентом, представляющим собой силикагель с привитыми пентафторфенильными группами (таблица 6.2). 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. Более того, наблюдается лучшее разделение групп гинсенозидов с ППТ и ППД агликонами (рис. 6.12), а также критических пар пиков

гинсенозидов, отличающихся на один рамнозный заместитель, например, Rg₁ – Re и Rg₂ – Rh₁.

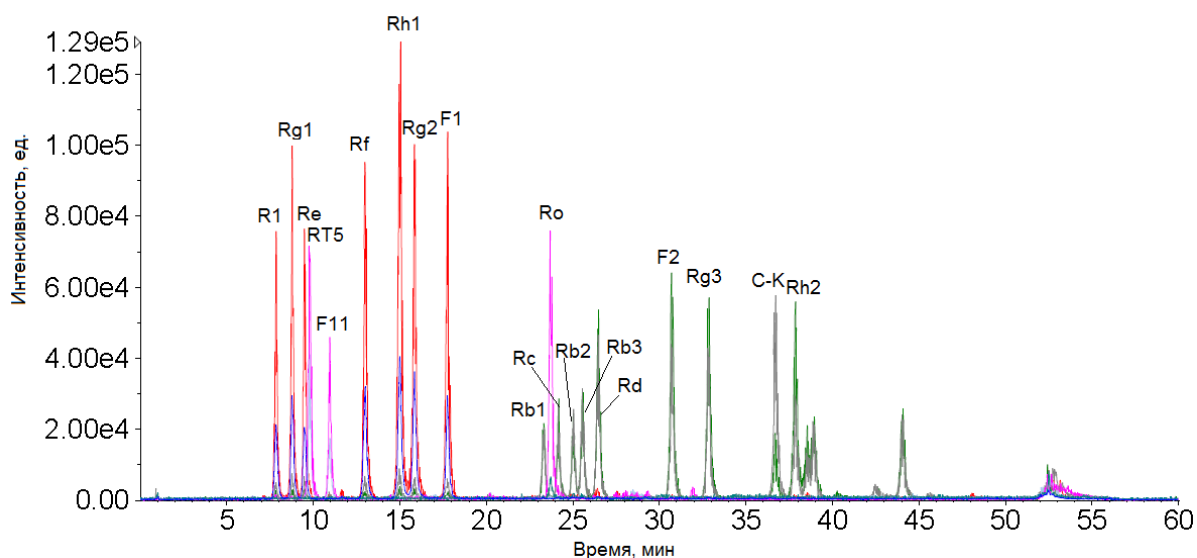


Рисунок 6.12 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов на колонке Hypersil Gold PFP в режиме СИМ: красный - m/z 423.3, синий - m/z 405.3, зеленый - m/z 407.3, серый - m/z 425.3.

Можно заключить, что при использовании сорбентов с селективностью, отличной от селективности колонок C18 (Cosmosil cholester, Hypersil gold PFP) разделяются пары Rg₁ – Re. При добавлении метанола в элюент разрешение пиков Rb₂ – Rb₃ становится близким к 1.5 (таблица 6.9).

Таблица 6.9 – Параметры разделения пиков гинсенозидов на колонке Hypersil Gold PFP

Гинсенозид	t_r , мин	R_s
R ₁	7.87	-
Rg ₁	8.8	4.65 (Rg ₁ – R ₁)
Re	9.51	3.55 (Rg ₁ – Re)
Rf	13.04	17.65 (Rf – Re)
F ₁₁	10.97	10.35 (Rf – F ₁₁)
RT ₅	9.83	5.7 (F ₁₁ – RT ₅)
Rb ₁	23.34	67.55 (RT ₅ – Rb ₁)
Rg ₂	15.88	37.3 (Rb ₁ – Rg ₂)
Rc	24.18	4.20 (Rb ₁ – Rc), 41.50 (Rg ₂ – Rc)
Rh ₁	15.02	3.44 (Rh ₁ – Rg ₂)
Ro	23.72	34.80 (Rh ₁ – Ro)
Rb ₂	25.03	6.55 (Ro – Rb ₂), 40.04 (Rh ₁ – Rb ₂)
Rb ₃	25.58	2.75 (Rb ₂ – Rb ₃)

Продолжение таблицы 6.9

F ₁	17.79	38.95 (Rb ₃ – F ₁)
Rd	26.49	43.50 (F ₁ – Rd)
F ₂	30.74	21.25 (F ₂ – Rd)
Rg ₃	32.84	10.50 (Rg ₃ – F ₂)
C-K	36.72	19.40 (C-K – Rg ₃)
Rh ₂	37.89	5.85 (Rh ₂ – C-K)

Однако только при работе на силикагеле с привитыми пентафторфенильными группами происходит полное разделение всех пар хроматографических пиков, кроме того групповой коэффициент селективности (6.4), полученный при разделении на пентафторфенильном сорбенте, заметно превосходит групповые коэффициенты селективности при разделении на других сорбентах, что свидетельствует о возможности более полного разделения компонентов экстракта корня женьшеня, в котором присутствует большое количество близких по структуре гинсенозидов. 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 содержаний гинсенозидов использовали выбранные условия разделения как на пентафторфенильном сорбенте, так и на C18 сорбенте.

6.1.2 Предварительная оценка параметров отклика при определении гинсенозидов женьшеня

Перед расчётом ФО и ОФО для определяемых гинсенозидов с разным типом агликона необходимо оценить линейность и воспроизводимость отклика в случае УФ и МС детектирования, а также влияние матричных эффектов.

Рабочий диапазон концентраций разработанного способа определения методом ВЭЖХ-УФ-МС. Диапазон линейности определяли как участок на графике зависимости аналитического сигнала (площади пика) от концентрации гинсенозида, который аппроксимируется линейной функцией с коэффициентом корреляции $R > 0.99$. Для определения диапазона линейности готовили серии стандартных растворов гинсенозидов последовательным разбавлением с концентрациями от 0.01 до 30 мкг/мл, строили график зависимости площади полученных пиков от

концентрации, из полученных зависимостей определяли диапазон линейности. Графики зависимости площади пиков от концентрации, полученных для гинсенозида Rd, приведены на рисунке 6.13.

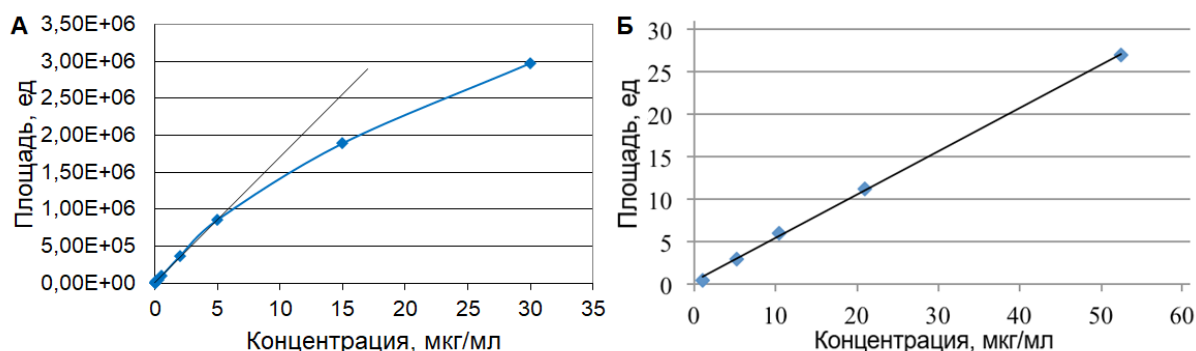


Рисунок 6.13 – Зависимость аналитического сигнала (площади пика) от концентрации гинсенозида Rd в случае МС (А) и УФ (Б) детектирования.

Линейный диапазон определяемых концентраций начинается со значения C_{lim} , при котором соотношение сигнал/шум равно 10. Пределом обнаружения считали концентрации гинсенозидов, соотношение сигнал/шум для которых равно 3. Верхней границей диапазона линейности считали концентрацию гинсенозида, после которой происходит значительное отклонение графика функции от линейного. Полученный диапазон аппроксимировали линейной функцией и определяли коэффициент корреляции. Для большинства гинсенозидов линейный диапазон концентраций при МС детектировании наблюдался от 30 до 5000 нг/мл (коэффициенты корреляции в диапазоне 0.9957-0.9998). В случае УФ детектирования надежное определение концентрации было возможно в диапазоне от 1 до 50 мкг/мл из-за высокого фонового сигнала подвижной фазы с добавкой муравьиной кислоты. В указанном диапазоне коэффициенты корреляции градуировочных зависимостей большинства гинсенозидов были близки к 0.999.

Отклик в УФ-детектировании зависит только от молярного коэффициента поглощения определяемого вещества, в отличие от масс-спектрометрического детектирования, где интенсивность сигнала является функцией многих параметров. В связи с этим для зависимости аналитического сигнала от концентрации гинсенозидов в случае ВЭЖХ-УФ не наблюдается отклонение от линейности в рассматриваемом диапазоне концентраций (рис. 6.13).

Оценка влияния матричного эффекта (МЭ). Оценку влияния МЭ проводили методом «введено-найдено» (см. п. 2.2.6). Для метода ВЭЖХ-МС МЭ имеет важное

значение в количественном анализе и может сказаться на эффективности ионизации аналита в случае, если происходит соэлюирование аналита и компонента матрицы. В случае ЭРИ МЭ связан с конкуренцией при ионизации между трудноиспаряемыми компонентами матрицы и молекулами аналита перед переходом в газовую фазу, однако, точный механизм такого влияния до конца неизвестен. Влияние МЭ было оценено в серии экспериментов с добавками на разных уровнях концентраций гинсенозидов Rd и F₂ в образец высушенного корня женьшеня. Полученные результаты приведены в таблице 6.10. Показано, что значимого МЭ не наблюдается.

Таблица 6.10 – Оценка влияния матричного эффекта высушенных корней женьшеня на значение аналитического сигнала, полученного методом ВЭЖХ-УФ-МС

Образец	S, ед. ($\times 10^4$)	МЭ* (ВЭЖХ-МС)	S, ед.	МЭ (ВЭЖХ-УФ)
Суш. кольца корня женьшеня	3.1 ± 0.3	-	5.8 ± 0.5	-
Суш. кольца корня женьшеня с добавкой (F ₂ 0.2, Rd 5.0), мкг/мл	5.4 ± 0.4	1.00	9 ± 1	1.06
Суш. кольца корня женьшеня с добавкой (F ₂ 0.6, Rd 10.0), мкг/мл	10 ± 1	1.05	11 ± 1.0	1.00
Водный раствор с добавкой (F ₂ 0.2, Rd 5.0), мкг/мл	2.3 ± 0.2	-	3.1 ± 0.4	-
Водный раствор с добавкой (F ₂ 0.6, Rd 10.0), мкг/мл	7 ± 1	-	± 0.5	-

*Расчёт по пику гинсенозида F₂ для ВЭЖХ-МС и Rd для ВЭЖХ-УФ.

Воспроизводимость. Оценку воспроизводимости при ВЭЖХ-УФ-МС определении проводили на основе значений относительного среднеквадратического отклонения (ОСКО) результатов экспериментов. Для этого в течение 3-х дней проводили анализ стандартного раствора гинсенозида Rb₁ на трех уровнях концентрации (таблица 6.11).

Таблица 6.11 – Оценка воспроизводимости при определении гинсенозидов

Концентрация Rb ₁ , нг/мл	Воспроизводимость, ОСКО, %			
	ВЭЖХ-УФ		ВЭЖХ-МС	
	1 день ($n=3$, $P=0.95$)	3 дня ($n=9$, $P=0.95$)	1 день ($n=3$, $P=0.95$)	3 дня ($n=9$, $P=0.95$)
110	-*	-	4	9
550	-	-	2	4
1100	5	9	2	9

*меньше минимальной определяемой концентрации.

Выполнение серии анализов проводилось в одной и той же лаборатории, на одной и той же аппаратуре, одним и тем же аналитиком. Наблюдаемые значения относительного ОСКО не превышали 5% и 10% в случае УФ-детектирования.

6.1.3 Разработка способа КАМС для определения гинсенозидов

Традиционный метод количественного определения гинсенозидов включает в себя приготовление серии стандартных растворов и установление градуировочных функций. Этот процесс является трудоемким и требует большое количество времени, более того, не всегда есть возможность получить необходимые для анализа стандартные образцы. В связи с этим возникает потребность в новом способе определения гинсенозидов, использующем меньшее количество стандартов. Такой альтернативой служит метод количественного анализа многокомпонентной системы (КАМС) [361].

Аналитическим сигналом для каждого сапонины женьшеня в методе ВЭЖХ-УФ-МС является площадь хроматографического пика. Таким образом, отношение площади пика (S_x) к концентрации (C_x) в стандартном растворе в области линейной зависимости площади от концентрации называется фактором отклика (6.5):

$$FO = \frac{S_x}{C_x} \quad (6.5)$$

Относительные факторы отклика могут быть рассчитаны для нескольких веществ относительно одного выбранного референтного (реперного) соединения тремя способами.

1) *Способ расчета по одной точке.* Для определения фактора по этому способу необходимо приготовить стандартные растворы эталонного и определяемого соединений, таким образом, чтобы их концентрации были больше значения середины рабочего диапазона концентраций. Значение фактора определяется по формуле (6.6):

$$OFO = \frac{S_s/C_s}{S_x/C_x} \quad (6.6)$$

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.

2) *Многоточечный способ расчета.* Фактор пересчета, рассчитанный по этому способу, представляет собой среднее значение факторов, полученных на разных уровнях концентраций способом расчета по одной точке. Для этого необходимо приготовить серии стандартных растворов соединений, которые в дальнейшем будут использоваться как эталонное и определяемое, определить градуировочные уравнения для этих соединений и провести коррекцию значений концентраций по полученному уравнению в зависимости от аналитического сигнала. В случае, если на малых уровнях концентраций наблюдаются сильные флуктуации значения фактора, необходимо ограничить рабочий диапазон концентраций снизу. Рассчитать факторы по методу расчета по одной точке и построить график зависимости фактора пересчета от концентрации определяемого соединения. По факторам пересчета, принадлежащим новому рабочему диапазону концентраций определить конечный фактор пересчета по формуле (6.7):

$$\text{ОФО} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{S_s/C_s}{S_x/C_x}}{n} \quad (6.7)$$

где n - число уровней концентраций.

3) *Расчет фактора пересчета по способу тангенсов.* Как и многоточечный способ расчета, расчет фактора способом тангенсов требует построения градуировочных графиков и установления градуировочных зависимостей определяемого и эталонного соединений. Однако, в данном случае фактор определяется как отношение угловых коэффициентов наклонов графиков градуировочных зависимостей (6.8):

$$S_s = C_s \times k_s + b_s; \quad S_x = C_x \times k_x + b_x;$$

$$\text{ОФО} = \frac{k_s}{k_x} \quad (6.8)$$

где k_s , k_x — коэффициенты наклона градуировочных функций эталонного соединения и определяемого соответственно.

В методе КАМС содержание определяемых компонентов производится по формуле (6.9):

$$C_x = \frac{S_x}{S_s/C_s} \times f_x \quad (6.9)$$

где C_x — концентрация определяемого соединения, C_s — 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, f_x — ОФО для данного компонента.

Расчёт ОФО для ВЭЖХ-УФ определения гинсенозидов. Для разработки и проверки применимости способа ВЭЖХ-УФ-КАМС провели хроматографическое разделение стандартных смесей гинсенозидов в выбранных условиях (см. п. 2.2.6). В качестве эталонного гинсенозида выбран гинсенозид Rb₁, так как он встречается в большинстве продуктов на основе женьшеня. Факторы были рассчитаны тремя разными способами: по одной точке, по нескольким точкам и способом тангенсов. Результаты представлены в таблице 6.12.

Таблица 6.12 – ОФО гинсенозидов (ВЭЖХ-УФ), полученные способами многоточечного расчета, расчета по одной точке и способом тангенсов

Гинсенозид	Многоточечный способ расчета	Расчет по одной точке	Расчет по способу тангенсов	ОСКО*, %
Rb ₁	1.00	1.00	1.00	0.6
Rb ₂	1.17	1.18	1.15	0.9
Rb ₃	0.97	0.97	0.96	0.2
Rd	0.87	0.87	0.86	0.2
Rg ₃	0.77	0.77	0.76	0.3
Rh ₂	0.78	0.78	0.75	2.0
Rg ₁	0.72	0.72	0.63	4.2
Rf	0.80	0.80	0.76	2.7
Rg ₂	0.72	0.73	0.71	2.7
Re	0.89	0.89	0.94	1.0
F ₁	0.64	0.64	0.64	4.6
R ₁	0.99	0.99	0.93	3.9
C-K	0.92	0.92	0.91	0.6
F ₂	0.85	0.85	0.81	3.3

*ОСКО оценивали при расчёте ОФО по нескольким точкам.

Из приведенных на рисунке 6.14 графиков зависимости ОФО от концентрации гинсенозидов видно, что наблюдается отклонение значения коэффициента для концентраций гинсенозидов ниже 5 мкг/мл, таким образом, наименьшая определяемая концентрация для метода ВЭЖХ-УФ-КАМС составляет 5 мкг/мл.

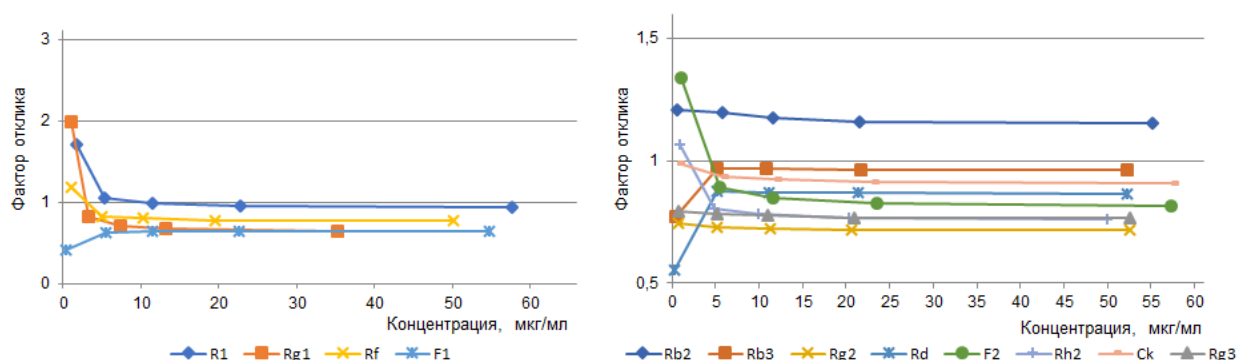


Рисунок 6.14 – Зависимость ОФО гинсенозидов ППТ- и ППД-типа от концентрации в выбранных условиях их определения методом ВЭЖХ-УФ.

Расчёт ОФО для ВЭЖХ-МС определения гинсенозидов. Метод КАМС хорошо зарекомендовал себя для определения содержаний методом ВЭЖХ-УФ [364,365]. Однако в случае МС детектирования воспроизводимость факторов отклика может оказаться значительно хуже. Для определения факторов пересчета провели хроматографическое разделение смеси гинсенозидов: Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rd, Rc, Rh₁, Rg₃, Rh₂, Rg₁, Rf, Rg₂, Re, F₁, R₁, C-К, F₂. Для каждого из гинсенозидов был определен ОФО и его относительное стандартное отклонение (таблица 6.13).

Таблица 6.13 – ОФО гинсенозидов (ВЭЖХ-МС), полученные способами многоточечного расчета, расчета по одной точке и способом тангенсов

Гинсенозид	Многоточечный способ расчета	Расчет по одной точке	Расчет по способу тангенсов	ОСКО, %*
R ₁	1.09	1.09	1.08	1.4
Rg ₁	0.74	0.74	0.74	1.3
Re	1.05	1.05	1.03	2.9
Rf	0.52	0.52	0.51	3.2
Rh ₁	0.43	0.44	0.44	4.8
Rg ₂	0.42	0.43	0.44	2.9
F ₁	0.49	0.50	0.50	1.7
Rc	0.86	0.86	0.86	2.5
Rb ₂	1.05	1.05	1.06	1.3
Rb ₃	0.69	0.69	0.68	1.9
Rd	0.45	0.45	0.45	1
F ₂	0.25	0.26	0.26	6.9
Rg ₃	0.26	0.27	0.28	8.2
C-К	0.27	0.27	0.27	0.4
Rh ₂	0.17	0.18	0.19	8.3

*ОСКО оценивали при расчёте ОФО по нескольким точкам.

В качестве реперного гинсенозида выбран Rb₁, так как он встречается в большинстве продуктов на основе женьшеня.

ОФО, полученные выше по отдельным точкам, отличаются от рассчитанным по способу тангенсов не более, чем на 6%, что говорит о возможности использования этих методов расчета фактора альтернативно основному (способу тангенсов). Это особенно полезно при замене способа многоточечного расчета фактора на способ расчета по одной точке, т. к. в этом случае можно отказаться от анализа большого количества стандартных образцов для построения градуировочного графика и ограничиться лишь одним, принадлежащим середине исследуемого диапазона.

Аналогично примеру ВЭЖХ-УФ-КАМС были построены зависимости фактора пересчета от концентрации гинсенозидов (рис. 6.15).

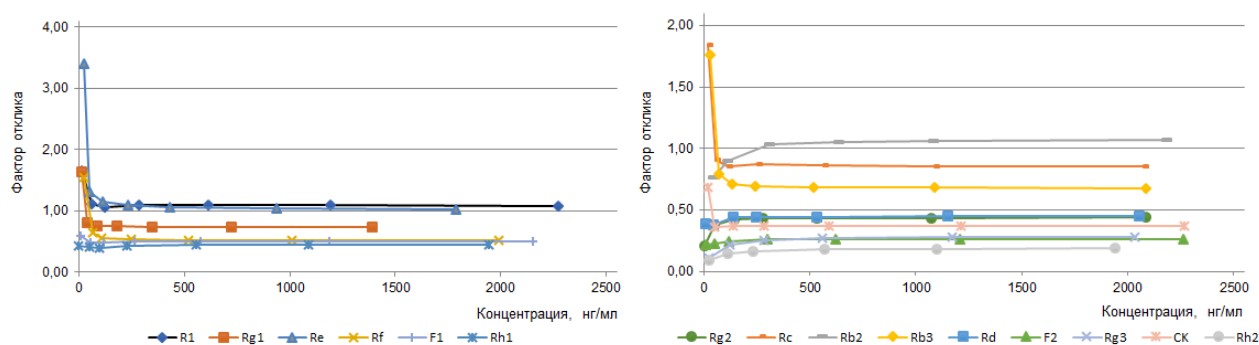


Рисунок 6.15 – Зависимость ОФО гинсенозидов ППТ- и ППД-типа от концентрации в выбранных условиях их определения методом ВЭЖХ-МС.

Для большинства гинсенозидов на уровне концентраций ниже 60 мкг/мл наблюдаются сильные флуктуации значения фактора. Соответственно, применение КАМС ограничивается диапазоном концентраций от 60 до 2500 мкг/мл.

Поскольку для детектирования гинсенозидов использовали характеристичные фрагментные ионы их сапогенинов с последовательной потерей молекул H₂O (см. п. 5.2.1), аналитический сигнал также может быть получен путем суммирования сигналов нескольких ионов. В таблице 6.14 представлены значения факторов, где для определения гинсенозидов использовался один ион, сумма двух и сумма трех самых интенсивных ионов (m/z 443, 425, 407 для ППД, и m/z 441, 423, 405 для ППТ гинсенозидов).

Таблица 6.14 – Значения ОФО для разных способов детектирования гинсенозидов, рассчитанные способом тангенсов

Гинсенозид	По одному иону	По сумме двух ионов	По сумме трех ионов
Rb ₁	1.00	1.00	1.00
R ₁	1.27	1.09	0.91
Rg ₁	1.09	0.74	0.69
Re	1.17	1.05	0.87
Rf	0.83	0.52	0.49
Rh ₁	0.71	0.43	0.45
Rg ₂	0.69	0.42	0.40
F ₁	0.89	0.49	0.36
Rc	0.90	0.86	0.85
Rb ₂	1.07	1.05	1.05
Rb ₃	0.75	0.69	0.70
Rd	0.45	0.45	0.44
F ₂	0.21	0.25	0.27
Rg ₃	0.22	0.26	0.27
C-K	0.56	0.27	0.26
Rh ₂	0.12	0.17	0.19

Видно, что значения факторов отклика сильно зависят от выбранного иона, что может быть препятствием при использовании рассчитанных факторов на другом оборудовании и в других условиях, поскольку соотношения интенсивностей этих ионов не постоянны (см. п. 5.2.1). В таблице 6.15, на примере двух гинсенозидов, представлено обоснование выбора способа тангенсов и определения гинсенозидов по двум ионам. Такой выбор был сделан, поскольку относительная погрешность метода КАМС (ООМ, %), рассчитанная по формуле (6.10):

$$\text{ООМ, \%} = \frac{|C_{\text{КАМС}} - C_{\text{BC}}|}{C_{\text{BC}}} \times 100\% \quad (6.10)$$

по сравнению с методом внешнего стандарта (BC) оказалось наименьшей.

В дальнейших экспериментах, для расчета ОФО использовали отдельные реперные стандарты для каждой группы гинсенозидов (Rg₁ – для ППТ гинсенозидов, и Rb₁ для ППД гинсенозидов), что позволило дополнительно улучшить точность и воспроизводимость результатов определения.

Таблица 6.15 – Обоснование выбора способа определения площади пика и способа расчета ОФО

Гинсено-зид	Ионы	Многоточечный способ, ООМ, %			Способ тангенсов, ООМ, %		
		700 нг/мл	340 нг/мл	120 нг/мл	700 нг/мл	340 нг/мл	120 нг/мл
R _{g1}	405	1.6	4.5	0.2	0.13	2.8	2.0
	405-423	0.13	5.1	1.9	0.25	4.7	1.5
	405-423-441	1.5	2.8	7.1	0.26	4.4	8.7
R _c	407	8.7	4.4	7.9	0.80	4.7	11.5
	407-425	6.7	1.3	3.1	0.16	4.9	3.2
	407-425-443	10.1	5.4	1.0	0.34	4.6	10.4

*Черным отмечено наилучшее совпадение со способом внешних стандартов.

Таблица 6.16 – Параметры МС детектирования при определении гинсенозидов на разном оборудовании

МС параметры	Прибор №1 AB Sciex (3200)	Прибор №2 TSQ Vantage	Прибор №3 Agilent (6470)	Прибор №4 Agilent (6460)	Прибор №5 Shimadzu (2020)
Нагретый обволакивающий газ	2.76 Бар	50 у.е.	12 л/мин	15 л/мин	-
Газ для распыления	2.07 Бар	10 у.е.	10 л/мин	10 л/мин	1.5 л/мин
Газ завесы (осушающий)	0.76 Бар	5 у.е.	7 л/мин	7 л/мин	15 л/мин
Температура обволакивающего газа	300 °C	320 °C	350 °C	250 °C	400 °C
Температура осушающего газа	-	-	325 °C	325 °C	-
Температура зоны интерфейса	100 °C	350 °C	-	-	250 °C
Напряжение на капилляре распылителя	+5.5 кВ	+3.5 кВ	+3.5 кВ	+3.5 кВ	+4.5 кВ
Входной потенциал	±10 В	-	-	-	-
Потенциал декластеризации (фрагментора)	60 В	15 В	75 В	75 В	-

Оценка стабильности ОФО. Согласно литературным данным [364,365] при использовании метода ВЭЖХ-УФ в сочетании со способом КАМС для межлабораторных испытаний, при изменении градиента, состава и скорости потока подвижной фазы, температуры термостата колонки и объема вводимой пробы флуктуации коэффициентов пересчета от лаборатории к лаборатории не превышали 10%. В наших экспериментах варьировались параметры разделения и МС-детектирования гинсенозидов (таблица 6.16).

Полученные на разных приборах значения ОФО, вычисленные относительно внутригрупповых реперных гинсенозидов R_{g1} и R_{b1} , приведены в таблице 6.17.

Таблица 6.17 – Значения ОФО, полученные при ВЭЖХ-МС определении гинсенозидов на разном оборудовании

Гинсенозид (репер)	Прибор №1	Прибор №2	Прибор №3	Прибор №4	Прибор №5	ОСКО, %
$R_1 (R_{g1})$	1.17	1.10	1.16	1.00	1.03	7.1
$R_e (R_{g1})$	1.24	1.22	1.21	1.16	1.29	3.9
$R_f (R_{g1})$	0.73	0.83	0.74	0.61	0.76	10.9
$R_{h1} (R_{g1})$	0.55	0.70	0.57	0.48	0.56	14.2
$R_{g2} (R_{g1})$	0.59	0.69	0.59	0.48	0.60	12.7
$F_1 (R_{g1})$	0.76	0.75	0.76	0.93	0.91	10.9
$R_c (R_{b1})$	0.94	0.83	0.94	0.81	0.73	10.4
$R_{b2} (R_{b1})$	0.89	0.92	0.91	0.92	0.89	1.9
$R_{b3} (R_{b1})$	0.72	0.67	0.74	0.69	0.65	5.0
$R_d (R_{b1})$	0.45	0.31	0.41	0.35	0.31	16.8
$F_2 (R_{b1})$	0.31	0.24	0.35	0.34	0.29	14.5
$R_{g3} (R_{b1})$	0.34	0.26	0.37	0.25	0.24	20.3
$C-K (R_{b1})$	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

Также, варьируя в широком диапазоне значения отдельных параметров (таблица 2.3) на одном приборе, были оценены максимальные ОСКО для ОФО при применении метода ВЭЖХ-МС-КАМС в одной лаборатории одним аналитиком на одном оборудовании (таблица 6.18).

Было показано, что наиболее значимыми параметрами оказались условия масс-спектрометрического детектирования, а именно: давление газа завесы, потенциал декластеризации и температура в источнике ионизации, в то время как

при УФ детектировании наиболее значимым параметром обычно является длина волны детектирования [365].

Таблица 6.18 – Значения ОСКО, % для ОФО, рассчитанные при варьировании (5 уровней) условий ВЭЖХ-МС определения гинсенозидов

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

Согласно литературным данным [365] при использовании метода ВЭЖХ-УФ в сочетании со способом КАМС для межлабораторных испытаний, при изменении градиента, состава и скорости потока подвижной фазы, температуры термостата колонки и объема вводимой пробы флуктуации коэффициентов пересчета от лаборатории к лаборатории не превышают 10%. В следующем эксперименте были одновременно изменены аналогичные параметры разделения и МС детектирования гинсенозидов (таблица 6.19, рис. 6.16).

Результаты эксперимента показали (таблица 6.20), что ОФО, полученные методами ВЭЖХ-МС, обладают относительно низкой стабильностью. При таком варианте детектирования разные условия получения аналитического сигнала приводят к более значительному изменению факторов отклика, чем при использовании УФ-детектирования. Это связано с тем, что МС-детектирование предполагает тщательный подбор и контроль условий для хорошей воспроизводимости ионизации с последующим МС-детектированием при анализе

образцов. Оценка влияния всех условий детектирования на значение фактора пересчета требует длительного многофакторного анализа.

Таблица 6.19 – Изменение параметров хроматографического разделения и детектирования для оценки стабильности ОФО

Параметры	Способ 1	Способ 2
Колонка	Acclaim RSLC 120 C18 (150 × 2.1 мм; 2.2 мкм)	Acclaim RSLC 120 C18 (150 × 2.1 мм; 3 мкм)
Концентрация муравьиной кислоты подвижной фазы (v/v), %	0.1	0.5
Температура термостата, °C	25	30
Температура источника ионизации, °C	350	450
Потенциал декластеризации, В	70	60
Скорость потока, мл/мин	0.40	0.45

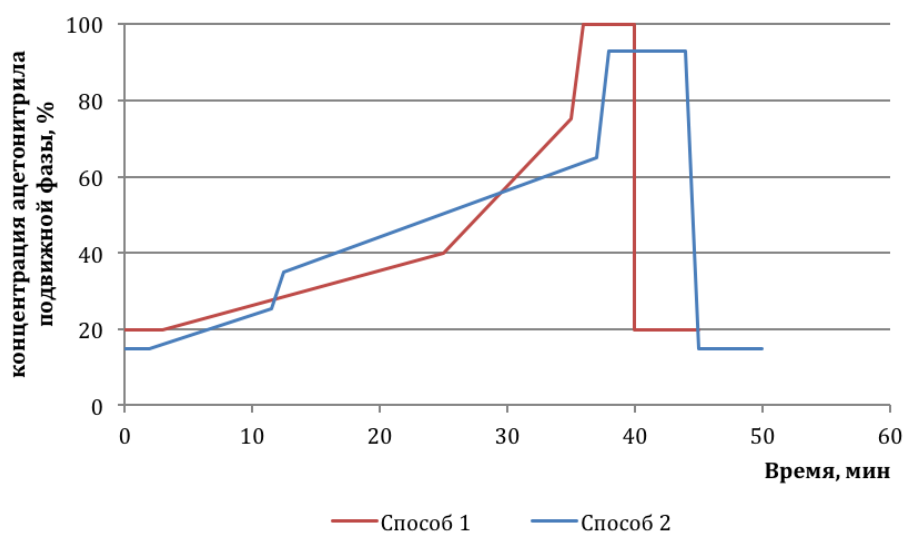


Рисунок 6.16 – Программа градиентного элюирования для способов 1 (красный) и 2 (синий).

Таблица 6.20 – Значения ОФО*, полученные при определении гинсенозидов в условиях способов 1 и 2

Гинсенозид	Способ 1	Способ 2	Δ, %
R ₁	1.09	1.62	33
R _f	0.52	0.67	22
R _{h1}	0.43	0.64	33
R _{g2}	0.42	0.43	3

Продолжение таблицы 6.20

F1	0.49	0.73	33
Rc	0.86	0.91	6
Rb ₂	1.05	1.11	6
Rb ₃	0.69	0.61	14
Rd	0.45	0.50	10
F ₂	0.25	0.29	15
Rg ₃	0.26	0.31	16
C-K	0.27	0.37	37
Rh ₂	0.17	0.24	29

*Использовали однотоочечный способ расчёта ОФО.

Зависимость ОФО от концентрации ацетонитрила подвижной фазы.

Исходя из результатов исследования стабильности факторов отклика, описанных в предыдущем разделе, можно заключить, что концентрация ацетонитрила является одним из наиболее значимо влияющих на значения ОФО параметров. Для оценки влияния ацетонитрила на значения ФО были выбраны 6 гинсенозидов ППТ-типа: R₁, Rg₁, Re, Rf, F₁, Rh₁, и проведено их хроматографическое разделение в условиях ступенчатого градиента (рис. 6.17).

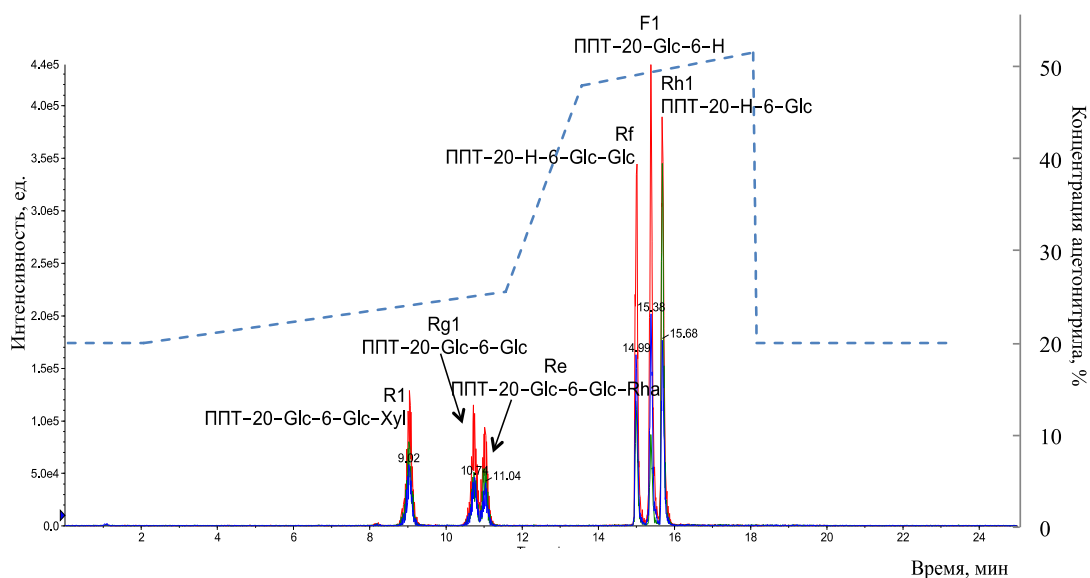


Рисунок 6.17 – Масс-хроматограмма смеси гинсенозидов ППТ-типа: R₁, Rg₁, Re, Rf, F₁, Rh₁, полученная в режиме СИМ: красный- m/z 423, синий- 405, зеленый- 407, серый- 425.

По интенсивностям пиков на представленной хроматограмме можно заключить, что величина аналитического сигнала пропорциональна концентрации ацетонитрила подвижной фазы. Далее для построения зависимостей ФО

гинсенозидов от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе использовали изократический режим элюирования, пошагово изменяя соотношение фаз А и Б на 5%. Оказалось, что независимо от типа сапогенина гинсенозида, их можно разделить на 2 больших класса по значениям тангенсов угла наклона линейной зависимости площади пика от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Для первого класса гинсенозидов $a=1065 \pm 44$, а для второго — $a=1848 \pm 35$ (рис. 6.18).

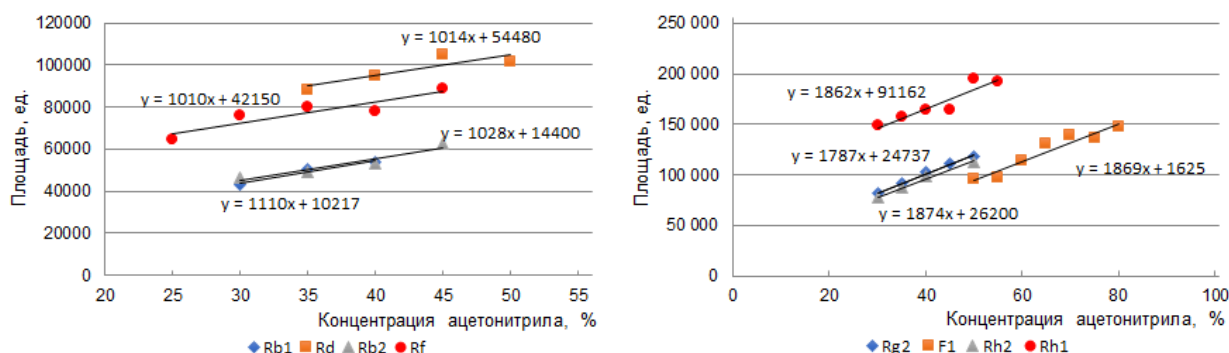


Рисунок 6.18 – Зависимость площади пика от концентрации ацетонитрила (%) в подвижной фазе для гинсенозидов Rb₁, Rd, Rb₂, Rf и Rg₂, C-K, Rh₂, Rh₁.

Очевидно, что полученные прямые не проходят через начало координат, поэтому можно заключить, что зависимость фактора пересчета от концентрации ацетонитрила нельзя представить как $f = k \times C_{MeCN}$, где C_{MeCN} – концентрация ацетонитрила в подвижной фазе, k коэффициент пропорциональности, отражающий влияние концентрации ацетонитрила на величину площади пика гинсенозида. Следовательно, эта зависимость имеет сложный вид и значительный вклад вносит структура гинсенозида, которая напрямую влияет на степень ионизации и фрагментацию.

Поскольку величина фактора отклика сильно зависит от структуры гинсенозида и его способности образовывать ионы [ППТ-4H₂O+H]⁺, [ППТ-3H₂O+H]⁺ и [ППД-3H₂O+H]⁺, [ППД-2H₂O+H]⁺, то можно проследить зависимость между относительным фактором отклика и структурой сапонина. Например, используя площади пиков по сумме двух ионов 407 и 425 для ППД и 405 и 423 для ППТ, соответственно, были вычислены по формуле (6.7) относительные факторы отклика по гинсенозиду Rb₁. Представленные в таблице 6.21 результаты свидетельствуют о том, что значение фактора уменьшается в зависимости от уменьшения длины боковых цепей из сахаридных остатков. Более того, при прочих равных условиях ОФО для гинсенозида ППТ-типа больше, чем для гинсенозида

ППД-типа; значение фактора пересчета для гинсенозида, содержащего «-Glc-Glc» заместитель больше, чем для гинсенозида, содержащего «-Glc» заместитель, а также значение фактора пересчета в зависимости от входящего в боковую цепь сахара уменьшается в ряду $\text{Ara(p)} \geq \text{Glc} > \text{Ara(f)} > \text{Xyl} > \text{Rha}$.

Таблица 6.21 – Сопоставление структуры гинсенозида и его ОФО

Гинсенозид	Формула	ОФО относительно Rb ₁
<i>ППД</i>		
Rb ₂	ППД-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc	1.05
Rb ₁	ППД-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc	1.00
Rc	ППД-20-Glc-Ara(f)-3-Glc-Glc	0.86
Rb ₃	ППД-20-Glc-Xyl-3-Glc-Glc	0.69
Rd	ППД-20-Glc-3-Glc-Glc	0.45
F ₂	ППД-20-Glc-3-Glc	0.25
Rg ₃	ППД-20-H-3-Glc-Glc	0.26
C-K	ППД-20-Glc-3-H	0.27
Rh ₂	ППД-20-H-3-Glc	0.17
<i>ППТ</i>		
R ₁	ППТ-20-Glc-6-GlcXyl	1.09
Re	ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha-3-H	1.05
Rg ₁	ППТ-20-Glc-6-Glc-3-H	0.74
Rf	ППТ-20-H-6-Glc-Glc-3-H	0.52
F ₁	ППТ-20-Glc-6-H-3-H	0.49
Rg ₂	ППТ-20-H-6-Glc-Rha-3-H	0.42
Rh ₁	ППТ-6-Glc	0.43

Наблюдаемые тенденции показывают, что факторы могут быть предложены на основе структуры гинсенозида, однако для проверки этого тезиса требуется большее количество стандартных растворов гинсенозидов. Так, помимо основных гинсенозидов (рис. 5.22), содержание которых может быть оценено методом внешнего стандарта или способом КАМС, на хроматограммах образцов свежего корня женьшеня (Дальний Восток, измельч.) сухого корня азиатского женьшеня (Сибирь) и сушеных колец корня американского женьшеня присутствуют

небольшие и средние по площади пики других гинсенозидов ППТ и ППД-типов. Для них были предложены значения факторов на основе их фрагментарных формул (таблица 6.22), которые определяли из масс-спектров этих пиков.

Таблица 6.22 – Структуры неизвестных гинсенозидов и предложенные факторы пересчета для определения их содержания в образцах корней женьшеня

Гинсенозид	t _R , мин	ОФО	Св. корень (ДВ*), мг/г	Сух. корень (Сибирь), мг/г	Сух. кольца корня, мг/г
ППТ-20-Glc-6-GlcGlc	8.15	1.3	0.31	0.42	< ПО
ППТ-20-GlcXyl-6-Glc	9.02	1.1	< ПО	0.37	< ПО
ППТ-20-Glc-6-Glc-3-H (Rg ₁)	10.76	0.74	0.30	3.18	0.42
ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha-3-H (Re)	11.02	1.05	0.65	3.81	6.50
ППТ-20-Glc(Mal)Glc	14.6	0.8	0.05	0.57	< ПО
ППТ-20-Glc(Mal)-6-Glc(Mal)	15.10	0.9	< ПО	0.18	< ПО
ППТ-20-H-6-Glc-Glc-3-H (Rf)	16.31	0.52	< ПО	1.23	< ПО
ППД-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc (Rb ₁)	16.81	1.0	1.20	3.81	8.84
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc	17.14	1.0	0.46	< ПО	4.87
ППД-20-GlcAra(f)-3-GlcGlc (Rc)	17.30	0.86	1.20	2.14	< ПО
ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc	17.51	1.1	0.92	0.88	0.53
ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc	17.71	1.2	< ПО	2.98	< ПО
ППД-20-GlcAra(p)-3-GlcGlc (Rb ₂)	17.91	1.05	0.52	2.07	< ПО
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc	18.10	1.0	< ПО	2.54	< ПО
ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc	18.31	0.7	0.15	0.12	1.09
ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc	18.62	1.0	0.09	1.00	< ПО
ППД-20-Glc-3-GlcGlc (Rd)	19.43	0.45	0.87	0.84	0.78
ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc	19.92	0.5	0.38	1.03	0.50
ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc	20.25	0.5	0.10	0.36	< ПО
ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc	20.79	0.5	< ПО	0.47	< ПО
ППД-3-GlcGlcGlc	20.82	0.5	0.09	< ПО	1.85
ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc	21.15	0.6	0.14	0.22	< ПО

* ДВ – Дальний Восток.

Таким образом, применение метода КАМС позволяет расширить диапазон количественно и полуколичественно определяемых гинсенозидов в женьшеневой продукции.

6.1.4 Апробация разработанного способа определения гинсенозидов

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. В

работе [115] из корней трех видов женьшеня (*P. ginseng*, *P. notoginseng* и *P. quinquefolius*) было выделено более 620 гинсенозидов. 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, что значительно усложняет разработку процедур контроля качества различных препаратов на основе женьшеня. Как правило, в целях контроля качества определяют сумму наиболее часто встречающихся гинсенозидов: Rb₁, Rb₂, Re, Rc, Rg₁, Rd или содержание определенных гинсенозидов-маркеров, например, гинсенозиды Rf, нотогинсенозид R₁ и псевдогинсенозид F₁₁ можно использовать в качестве биомаркеров корней *P. ginseng*, *P. notoginseng* и *P. quinquefolius*, соответственно. В целях опробования разработанного способа КАМС на реальных объектах были проанализированы экстракты из различных образцов растительных объектов и коммерческих препаратов на основе женьшеня.

Анализ экстрактов с помощью разработанного способа ВЭЖХ-УФ-КАМС. Содержания гинсенозидов определяли с помощью градуировочных зависимостей и по способу КАМС, с факторами, рассчитанными способом многоточечного расчета. Оценивали ошибку определения гинсенозидов в процентах, сравнивая с данными, полученными методом внешнего стандарта. Полученные результаты приведены в таблице 6.23.

Из приведенных данных видно, что для всех гинсенозидов, кроме неполностью разделенных пиков Rg₁ и Re, расчет по методу внешнего стандарта и КАМС дает близкие значения концентраций. Отклонение не превышает 10 %. Однако на хроматограммах большинства образцов помимо основных гинсенозидов присутствуют пики их аналогов и других биоактивных компонентов женьшеня. Это может приводить к ухудшению метрологических характеристик разработанного способа из-за неспецифичного поглощения аналитов в УФ-области спектра.

Таблица 6.23А – Содержания гинсенозидов, определенные методом ВЭЖХ-УФ, рассчитанные методами КАМС и внешнего стандарта (ВС)

Образец	Сухой корень (Дальний восток)			Сухой корень (Брянская обл.)			Сухой корень (Сибирь)			Экстракт корня (Дальний Восток)			Добавка сухой экстракт женьшеня		
	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %
	ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС	
R ₁	0.30	0.28	7	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₁	3.7	3.6	2	2.21	2.25	2	3.15	3.06	3	22.5	22.1	2	3.12	3.06	2
Re	2.6	2.7	4	2.6	2.7	3	< ПО	< ПО	-	80.6	80.8	1	8.1	8.2	1
Rf	1.050	1.054	0.4	0.47	0.48	1	0.999	0.995	0.4	< ПО	< ПО	-	1.27	1.28	1
Rg ₂	2.0	2.1	2	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	9.15	9.16	0.1
F ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	6.8	7.1	4	< ПО	< ПО	-
Rb ₁	2.7	-	-	4.7	-	-	4.5	-	-	61.2	-	-	15.2	-	-
Rb ₂	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	4.10	4.08	1	20.5	20.6	1	12.43	12.41	0.1
Rb ₃	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	6.8	7.0	3	0.89	0.93	5
Rd	< ПО	< ПО	-	0.6	0.7	6	0.90	0.94	4	36.35	36.42	0.2	6.2	6.3	1
F ₂	< ПО	< ПО	-	0.077	0.078	0.2	< ПО	< ПО	-	3.44	3.45	0.2	-	-	-

Таблица 6.23Б – Содержания гинсенозидов, определенные методом ВЭЖХ-УФ, рассчитанные методами КАМС и внешнего стандарта (ВС)

Образец	Свежий корень (Дальний Восток)			Свежий корень (Дальний Восток, измельч.)			Женьшеневый чай (Корея)			Сухие кольца корня женьшеня		
	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %
	ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС	
R ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₁	0.35	0.29	6	0.6	0.5	12	0.22	0.18	18	0.45	0.46	1
Re	0.79	0.80	1	0.41	0.42	2	0.28	0.35	20	8.2	7.8	5
Rf	0.136	0.143	5	0.21	0.19	8	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₂	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
F ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rb ₁	1.0	-	-	0.3	-	-	0.8	-	-	13.5	-	-
Rb ₂	0.69	0.70	1	0.46	0.43	7	0.76	0.75	1	2.81	2.89	3
Rb ₃	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rd	1.45	1.42	2.5	0.68	0.62	9	0.54	0.55	1.1	0.89	0.94	6
F ₂	0.169	0.168	1	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	0.109	0.115	5

Анализ экстрактов с помощью разработанного способа ВЭЖХ-МС-КАМС.

Метод ВЭЖХ-МС является более точным и информативным, позволяет избежать ошибки в определении гинсенозидов, которые могут возникнуть в случае определения методом ВЭЖХ-УФ. С помощью метода ВЭЖХ-МС можно подтвердить или опровергнуть принадлежность сигнала гинсенозидам.

Содержания гинсенозидов в экстрактах определяли с помощью градуировочных функций и по методу КАМС, с факторами, рассчитанными способом многоточечного расчета. Оценивали ошибку определения гинсенозидов в процентах (6.10), сравнивая с данными, полученными методом внешнего стандарта. Полученные результаты приведены в таблице 6.24.

Из полученных данных можно сделать вывод, что разработанный способ ВЭЖХ-МС определения гинсенозидов в сочетании с КАМС позволяет осуществлять селективное детектирование аналитов по характеристичным сигналам, что является преимуществом этого способа по сравнению с ВЭЖХ-УФ. При этом отклонение значений для всех гинсенозидов, полученных по методу внешнего стандарта и КАМС не превышает 15%, а для большинства хорошо разделенных пиков не превышает 5%.

Оценка качества женьшеневой продукции. Контроль качества женьшеневой продукции производится, как правило, по сумме коммерчески доступных гинсенозидов: Rb₁, Rb₂, Rc, Re, Rg₁, Rd. Однако, отсутствие этих гинсенозидов совсем не означает бесполезность и непригодность продукта, т. к. в настоящее время известны сотни гинсенозидов, в разных частях растения [115,366], которые обладают полезными для человека свойствами. Более того, недооценка содержания гинсенозидов, получаемая в случае определения гинсенозидов по сумме шести основных, может оказаться опасным для здоровья человека преуменьшением. Так в 2009 в канадской монографии, посвященной *P. ginseng*, со ссылкой на несколько авторов были указаны значения допустимой дневной дозы суммарного содержания женьшеневых сапонинов для всех препаратов в пределах 0.024–0.294 г [367], превышение которой является нежелательным.

Таблица 6.24А – Содержания гинсенозидов, определенные методом ВЭЖХ-МС, рассчитанные методами КАМС и внешнего стандарта (ВС)

Образец	Свежий корень (Дальний Восток, измельч.)			Сухой корень (Дальний восток)			Добавка сухой экстракт женьшеня			Сухие кольца корня женьшеня			Женьшеневый чай (Корея)		
Гинсено-зид	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %
	ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС		ВС	КАМС	
R ₁	< ПО	< ПО	-	0.2	0.3	11	0.33	0.37	11	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₁	0.70	0.68	3	3.73	3.72	0.2	3.2	3.3	3	0.40	0.36	11	0.45	0.47	5
Re	0.56	0.55	2	2.5	2.6	2	6.6	6.9	4	6.4	5.5	12	0.44	0.46	5
Rf	< ПО	< ПО	-	1.21	1.24	3	1.45	1.53	5	< ПО	< ПО	-	0.44	0.46	5
Rg ₂	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	-	-	-	< ПО	< ПО	-	0.05	0.06	7
Rh ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	0.67	0.69	3	< ПО	< ПО	-	0.28	0.29	7
F ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	≈ ПО	≈ ПО	-	< ПО	< ПО	-	≈ ПО	≈ ПО	-
Rb ₁	0.5	-	-	2.4	-	-	9.5	-	-	8.9	-	-	1.59	-	-
Rc	0.78	0.77	2	0.70	0.72	3	8.0	8.2	3	< ПО	< ПО	-	1.69	1.77	5
Rb ₂	0.39	0.40	4	1.54	1.53	0.5	7.6	7.6	0.1	< ПО	< ПО	-	0.91	0.95	5
Rb ₃	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	1.3	1.4	5	< ПО	< ПО	-	0.108	0.113	5
Rd	0.78	0.77	1	0.28	0.30	7	5.2	5.5	2	0.8	0.7	11	0.57	0.62	9
F ₂	≈ ПО	≈ ПО	-	< ПО	< ПО	-	≈ ПО	≈ ПО	-	< ПО	< ПО	-	≈ ПО	≈ ПО	-

Таблица 6.24Б – Содержания гинсенозидов, определенные методом ВЭЖХ-МС, рассчитанные методами КАМС и внешнего стандарта (ВС)

Образец	Сухой корень (Брянская обл.)			Сухой корень (Сибирь)			Экстракт корня (Дальний Восток)			Свежий корень (Дальний Восток)		
Гинсено- зид	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %	концентрация, мг/г		ООМ, %
	BC	КАМС		BC	КАМС		BC	КАМС		BC	КАМС	
R ₁	0.19	0.21	10	0.3	0.4	8	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₁	2.42	2.43	0.5	3.17	3.18	0.4	1.8	2.1	14	0.29	0.30	3
Re	2.4	2.5	2	3.7	3.8	2	42.3	42.8	1.3	0.6	0.7	1
Rf	0.6	0.7	4	1.19	1.23	3	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rg ₂	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-
Rh ₁	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	3.5	3.9	13	< ПО	< ПО	-
F ₁	≈ ПО	≈ ПО	-	< ПО	< ПО	-	4.6	4.5	2	< ПО	< ПО	-
Rb ₁	4.1	-	-	3.8	-	-	36.0	-	-	1.2	-	-
Rc	1.81	1.84	1.5	2.11	2.14	1	15.3	15.6	2	1.2	1.2	0.5
Rb ₂	1.459	1.462	0.2	2.09	2.07	1	9.7	10.2	6	0.5	0.5	4
Rb ₃	0.20	0.22	11	< ПО	< ПО	-	3.5	3.9	11	< ПО	< ПО	-
Rd	0.82	0.84	3	0.82	0.84	3	25.2	25.4	1	0.9	0.9	1.0
F ₂	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	< ПО	< ПО	-	≈ ПО	≈ ПО	-

К тому же использование только 6 гинсенозидов является недостаточным для определения вида женьшеня, каждый из которых обладает собственным уникальным набором свойств, в виду того, что для отнесения к конкретному виду необходим специфичный гинсенозид-маркер, таких гинсенозидов в ряду Rb_1 , Rb_2 , Rc , Re , Rg_1 , Rd нет. Оценка соотношений гинсенозидов, например, Rg_1/Rb_1 может быть одним из показателей для установления вида женьшеня, однако, значение соотношения может нарушаться из-за трансформации гинсенозидов, обусловленного внешним влиянием окружающей среды.

Разработанный новый способ количественной оценки содержаний гинсенозидов позволяет проводить более комплексную оценку профиля сапонинов в образце. Следовательно, данным способом могут быть оценены специфические гинсенозиды для точного определения вида женьшеня, к тому же суммарное содержание всех обнаруженных гинсенозидов. Таким образом, применение данного способа в анализе женьшеня и продуктов на его основе является перспективным. Проведено сравнение разработанных способов ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС для оценки фармакопейных показателей контроля качества женьшеня (таблица 6.25): суммарное содержание Rb_1 , Rb_2 , Rc , Re , Rg_1 , Rd ; содержание гинсенозидов Rb_1 и Rg_1 в отдельности и в сумме, отношение гинсенозидов Rg_1 и Rb_1 .

По данным (таблица 6.25) показатели, полученные путем расчета методом ВС и КАМС, обладают хорошей сходимостью, более того, наблюдается хорошая сходимость и для показателей, полученных методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС. Как видно из таблицы 6.26, суммарные содержания гинсенозидов для свежего корня и сухого корня, полученные методом КАМС с учетом неизвестных гинсенозидов, практически в 2 раза превышают значения содержаний шести основных гинсенозидов, что подтверждает гипотезу о значительном занижении содержания гинсенозидов, оцененного согласно европейской или американской фармакопее.

Таблица 6.25 – Оценка контроля качества женьшеневой продукции фармакопейным показателем и разработанным способом КАМС

Образец	Концентрация, мг/г											
	Фармакопея Европы/США				Фармакопея США						Фармакопея Европы	
	Σ гинсенозидов Rb ₁ , Rb ₂ , Rc, Re, Rg ₁ , Rd				Rg ₁		Rb ₁		Rg ₁ /Rb ₁		Σ Rg ₁ , Rb ₁	
	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-УФ-КАМС	ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ-МС-КАМС	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-МС
Сухой корень (Дальний Восток)	9.0	9.0	11.1	11.2	3.7	3.7	2.7	2.4	1.3	1.5	6.4	6.1
Сухой корень (Брянская обл.)	7.9	8.1	13.1	13.2	2.2	2.4	4.7	4.1	0.5	0.6	6.9	6.5
Сухой корень (Сибирь)	12.7	12.6	15.7	15.9	3.1	3.2	4.5	3.8	0.7	0.8	7.7	7.0
Сухой экстракт корня женьшеня (Дальний Восток)	221.1	221.1	130.3	132.2	22.5	1.8	61.2	36.0	0.4	0.1	83.6	37.8
Добавка сухой экстракт женьшеня	45.1	45.2	40.1	35.7	3.1	3.2	15.2	9.5	0.2	0.3	18.3	12.7
Свежий корень (Дальний Восток)	4.2	4.2	4.7	4.8	0.3	0.3	1.0	1.2	0.4	0.3	1.3	1.5
Свежий корень (Дальний Восток. измельч.)	2.5	2.1	3.7	3.7	0.6	0.7	0.3	0.5	1.7	1.4	0.9	1.2
Женьшеневый чай (Корея)	2.7	2.6	5.7	5.9	0.2	0.45	0.8	1.6	0.3	0.3	1.0	2.0
Сухие кольца корней	23.1	23.1	17.7	17.4	0.5	0.4	13.5	8.9	0.037	0.045	14.0	9.3

Таблица 6.26 – Применение КАМС для уточнения суммарного содержания гинсенозидов

Образец	Σ гинсенозидов Rb ₁ , Rb ₂ , Rc, Re, Rg ₁ , Rd*		Σ по 16 стандартным гинсенозидам*		Σ всех гинсенозидов*
	BC	КАМС	BC	КАМС	КАМС
Сухой корень (Сибирь)	15.7	15.9	17.3	17.5	33.1
Свежий корень (измельч.)	3.7	3.7	4.9	5.0	6.9
Сухие кольца корней женьшеня	17.7	17.4	18.0	17.8	21.7

* в мг/г

Проверка применимости разработанного ВЭЖХ-МС подхода в межлабораторных условиях. Особую ценность метод КАМС представляет, если удастся использовать установленные в одной лаборатории ОФО при измерениях в других условиях. В таблице 6.17 большее сходство имели факторы отклика, полученные на приборах одного типа и одной фирмы-производителя. Полученные на разных приборах результаты измерения концентраций гинсенозидов в экстрактах из продуктов на основе женьшеня (таблица 6.27) свидетельствуют о том, что методы КАМС и BC хорошо сходятся между собой для полярных и среднеполярных гинсенозидов (ООМ<13%), несколько хуже совпадение значений для слабополярных гинсенозидов, содержание которых в образцах обычно невелико.

Таблица 6.27 – Содержание ($\mu\text{г}/\text{г}$) гинсенозидов в двух коммерческих продуктах на основе женьшеня, определенные по методу КАМС и ВС

Гинсено- зид	Метод расчёта	Корейский женьшеневый чай							Корейский красный женьшень						
		Прибор №1		Прибор №2		Прибор №3		ОСКО, %	Прибор №1		Прибор №2		Прибор №3		ОСКО, %
		С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %	С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %	С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %		С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %	С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %	С, $\mu\text{г}/\text{г}$	ООМ, %	
R ₁	BC	10.1	2.6	9.3	1.3	8.4	5.5	9.1	1.6	17.0	2.2	10.5	1.7	11.5	16.0
	КАМС	9.8		9.4		8.9		5.2	1.9		2.4		1.9		14.0
R _{g1}	BC	140	-	148	-	140	-	3.2	50	-	55	-	48	-	6.4
	КАМС	-		-		-		n/a	-		-		-		n/a
R _e	BC	314	3.0	323	3.6	278	1.3	7.9	23.0	1.5	21.3	1.6	20.9	5.7	5.3
	КАМС	305		311		274		6.8	22.9		20.9		19.7		7.1
F ₁₁	BC	7.7	-	8.5	-	7.6	-	5.7	< ПО	-	< ПО	-	< ПО	-	n/a
	КАМС	-		-		-		n/a	< ПО		< ПО		< ПО		n/a
R _f	BC	91	3.3	106	5.8	93	4.2	8.3	52	0.5	58	1.0	48	1.8	9.4
	КАМС	94		113		97		9.5	53		58		49		9.2
R _{h1}	BC	48	6.6	48	4.7	46	3.5	2.6	58	2.1	62	0.8	55	4.8	6.8
	КАМС	45		46		48		2.9	59		63		57		4.9
R _{g2}	BC	162	0.9	175	0.7	171	2.6	4.0	80	0.9	85	0.4	75	1.3	6.0
	КАМС	163		176		176		4.3	79		84		76		5.2
F ₁	BC	20.2	4.3	15.0	4.6	22	2.9	18.8	< ПО	-	< ПО	-	< ПО	-	n/a
	КАМС	19.1		14.3		21		19.6	< ПО		< ПО		< ПО		n/a
R _{b1}	BC	930	-	1089	-	884	-	11.1	100	-	114	-	94	-	10.0
	КАМС	-		-		-		n/a	-		-		-		n/a

Продолжение таблицы 6.27

Rc	BC	591	0.7	630	0.5	588	0.2	3.9	40	2.5	43	1.2	39	0.1	4.4
	KAMC	594		627		590		3.4	41		42		39		3.7
Ro*	BC	201	6.7	205	8.5	189	7.4	4.3	83	1.7	86	3.5	76	3.9	6.0
	KAMC	215		223		203		4.7	85		89		79		5.6
Rb ₂	BC	586	0.5	606	0.7	573	0.4	2.8	34	0.1	37	2.1	33	2.2	6.0
	KAMC	584		601		571		2.6	34		36		32		6.1
Rb ₃	BC	95	2.7	91	5.8	86	7.3	5.4	4.5	1.2	5.3	3.5	5.5	3.4	10.0
	KAMC	98		86		79		10.8	4.6		5.1		5.3		7.5
Rd	BC	477	2.7	464	0.6	447	0.3	3.2	15.8	2.3	17.5	0.6	14.8	0.02	8.5
	KAMC	490		461		446		4.8	16.1		17.4		14.8		8.0
F ₂	BC	13.8	0.1	16.2	3.9	15.9	2.3	8.4	< ПО	-	< ПО	-	< ПО	-	n/a
	KAMC	13.9		15.6		15.6		6.6	< ПО		< ПО		< ПО		n/a
Rg ₃	BC	146	2.1	147	13.2	162	.5	5.9	124	0.9	123	4.2	123	0.7	0.7
	KAMC	149		128		151		9.1	123		118		122		2.3
Rh ₂	BC	68	1.6	63	4.6	67	2.4	3.9	36	2.4	35	12.4	35	3.0	1.7
	KAMC	67		60		66		5.5	35		31		34		6.5

*Для расчёта ОК гинсенозида Ro был использован групповой реперный стандарт ППД гинсенозидов - Rb₁.

6.2 Выбор условий группового определения стероидных сапонинов якорцев стелющихся и диоскорей

В ходе экспериментов, описанных в п. 5.2.2, было установлено, что в выбранных условиях ЭРИ стероидных сапонинов в режиме регистрации положительных ионов наибольшей интенсивностью обладают фрагментные ионы с m/z 415 и 397, которые по аналогии с выбранным характеристичными сигналами ППТ и ППД гинсенозидов могут быть использованы для регистрации группы гликозидов с общим агликоном – диосгенином.

6.2.1 Выбор условий хроматографического разделения диосцина, протодиосцина и диосгенина

В качестве неподвижной фазы при определении протодиосцина, диосцина и диосгенина использовали колонку с обращенно-фазовым C18 сорбентом Acclaim RSLC. Для большей экспрессности проведения анализа использовали сокращенную программу градиентного элюирования (см. п. 2.2.7). При этом пики 25(R)- и 25(S)-форм исследованных гликозидов не разделяли. Приведенные факторы удерживания (k') протодиосцина, диосцина и диосгенина при этом оказались в диапазоне от 4 до 13 (таблица 6.28).

Таблица 6.28 – Хроматографические параметры при разделении протодиосцина, диосцина и диосгенина

Соединение	Время удерживания (t_R), мин	Приведенные факторы удерживания (k')	Эффективность (N), ТТ/м
Протодиосцин	5.12	4.57	17500
Диосцин	7.95	7.64	38100
Диосгенин	13.92	14.13	57400

На масс-хроматограммах стандартных смесей по выделенным диагностическим ионам с m/z 397 и 415 присутствовали мешающие пики с временами удерживания 1.0, 7.7, 10.6 и 13.2 мин, которые полностью отделялись от целевых пиков (рис. 6.19).

Кроме того, соотношение сигналов выбранных диагностических ионов стероидных сапонинов можно использовать для обеспечения достоверности их идентификации (см. п. 5.2.2).

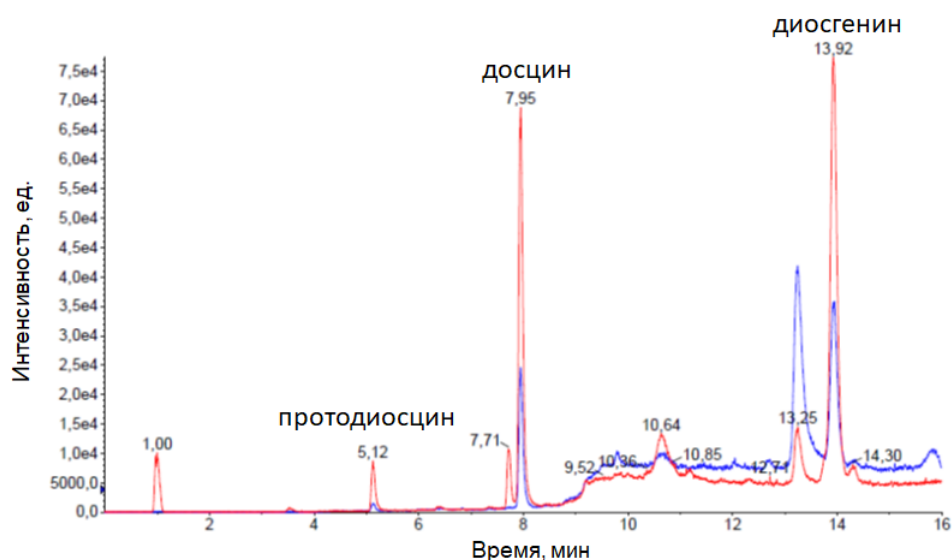


Рисунок 6.19 – Масс-хроматограмма стандартного водного раствора, содержащего по 1000 нг/мл протодиосцина, диосцина и диосгенина в режиме СИМ: m/z 415 (красный), m/z 397 (синий).

6.2.2 Расчет относительных факторов отклика для протодиосцина и диосгенина

Градуировочную зависимость для протодиосцина, диосцина и диосгенина строили в диапазоне содержаний 15-2000 нг/мл. Используя площади пиков по сигналам ионов с m/z 415, 397 и их сумме, рассчитывали факторы пересчета для протодиосцина и диосгенина по формулам (6.6), (6.7) и (6.8). В таблице 6.29 приведены значения ООМ (%) между методом ВС и тремя вариантами метода КАМС, рассчитанные для модельного раствора с концентрацией сапонинов на уровне 125 нг/мл.

Таблица 6.29 – Факторы пересчета и значения ООМ (%) для протодиосцина и диосгенина

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

*ООМ, % для метода КАМС и внешнего стандарта вычислены для одной точки градуировочной зависимости (125 нг/мл).

Из данных в таблице 6.29 следует, что значения ОФО, рассчитанные по сигналам m/z 415 и суммарному сигналу двух ионов, отличаются незначительно. Однако, из-за низкой интенсивности сигнала с m/z 397 значения ООМ были на уровне 15-20%, что неприемлемо для количественного анализа. Наименьшая ошибка вычисления концентрации, по сравнению с методом внешнего стандарта, оказалась при использовании суммарного сигнала двух ионов и способа расчета ОФО по отношению наклонов градуировочных графиков. Метрологические характеристики предложенного подхода при суммировании сигналов m/z 397 и m/z 415 представлены в таблице 6.30.

Таблица 6.30 – Метрологические характеристики предложенного подхода определения протодиосцина, диосцина и диосгенина

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	Ур-е градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r	ПО в водном растворе, нг/мл
Диосгенин	60—1000	$y = 938x - 208$	0.9982	20
Диосцин	15—1000	$y = 529x - 1765$	0.9976	5
Протодиосцин	30—1000	$y = 51x - 71$	0.9938	10

6.2.3 Апробация разработанного подхода определения стероидных сапонинов в надземных частях растения *T. terrestris*

Обработку данных количественного ВЭЖХ-МС анализа подготовленного водно-этанольного экстракта и исходного растительного материала *T. terrestris* (см. п. 2.2.7) проводили с применением метода внешних стандартов и КАМС. На рисунке 6.20 приведены хроматограммы образцов экстрактов из надземных частей растения *T. terrestris* смесью метанол : вода (1:1) (образец «№1») и сконцентрированной этанольной вытяжки (образец «№2»).

Можно отметить, что экстрагирование водно-метанольной смесью под воздействием ультразвука без нагревания привело к неполному извлечению менее полярного компонента – диосцина (таблица 6.31). Содержание протодиосцина в пересчете на исходное растительное сырье оказалось на уровне 0.3-0.4 мг/г. Диосгенин не был обнаружен в исследованных экстрактах.

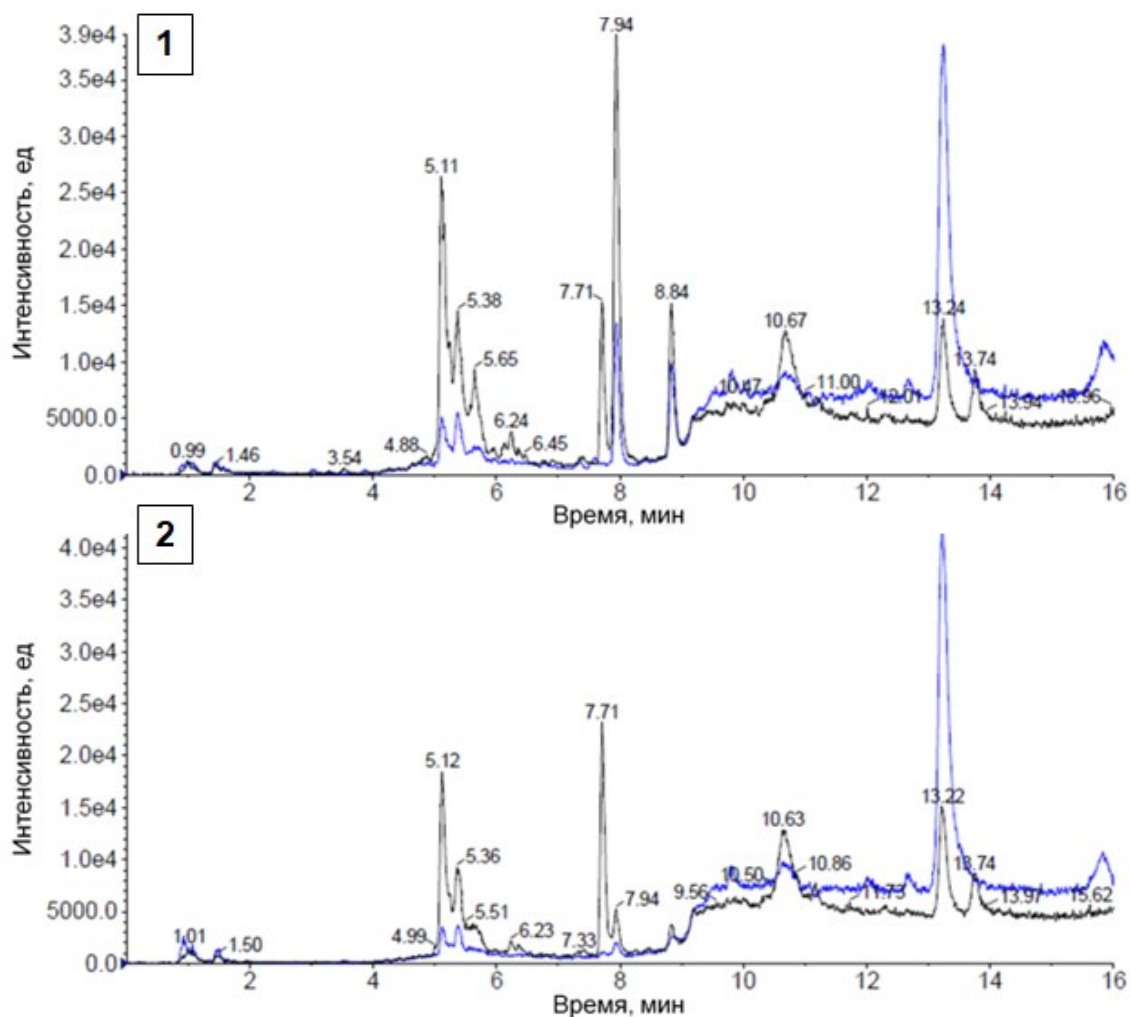


Рисунок 6.20 – Масс-хроматограммы экстрактов из образцов «№1» и «№2», разбавленных в 10 и 50 раз соответственно, в режиме СИМ: m/z 415(черный), m/z 397 (синий).

Таблица 6.31 – Содержание диосцина, протодиосцина и диосгенина в исследованных образцах ($n = 3$, $P = 0.95$)

Компонент	Образец «№1»			Образец «№2»		
	$C_{\text{град}}$, мг/г	$C_{\text{КАМС}}$, мг/г	ООМ, %	$C_{\text{град}}$, мг/г	$C_{\text{КАМС}}$, 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	-

Отличия рассчитанных содержаний протодиосцина, полученных с применением двух методов (ООМ, %), оказались менее 10 %, что сопоставимо с погрешностью измерений. Таким образом, метод КАМС может быть использован для определения стероидных сапонинов в растительных материалах.

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

При оценке группового состава исследуемого растительного экстракта входящие в его состав гликозиды естественным образом группируют по типу агликона. Ранее в п. 5.1 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). Если гидролиз проходит до конца и отсутствуют потери на стадии пробоподготовки, то из 1 моль любого гликозида должно образовываться 1 моль соответствующего агликона. В таком случае, вышеуказанное условие будет автоматически выполнено, поскольку площадь хроматографического пика одного и того же соединения (агликона) будет аналитическим сигналом и для одного стандартного (реперного) соединения, и для остальных гликозидов той же группы.

Для разработки и применения такого подхода к определению гинсенозидов женьшеня в растительных экстрактах необходимо исследовать протекание гидролиза в кислой и щелочной среде.

6.3.1 Кислотный гидролиз сапонинов женьшеня

Согласно результатам предыдущих исследований [368], в кислых условиях дигликозиды и 25,26-гидро-производные агликонов превалируют в качестве продуктов гидролиза ППТ и ППД гинсенозидов. Поэтому для оценки возможности прохождения кислотного гидролиза до конца было решено провести поиск наиболее подходящих условий его проведения и постараться достичь стабильных значений выхода реакции для трех гинсенозидов с различным типом агликона: Rg₁ (ППТ тип), Rb₁ (ППД тип) и RT₅ (ОТ тип). Гидролиз проводили в присутствии 0.12 М и 1.2 М соляной кислоты. После реакции пик гинсенозида Rg₁ отсутствовал на масс-

хроматограммах. Вместо этого наблюдали пики частично гидролизованных гинсенозидов ППТ типа и другие побочные продукты. В независимости от концентрации кислоты и времени проведения реакции среди конечных продуктов гидролиза наиболее интенсивным пиком был продукт с одновременным метилированием и гидратацией сапогенина с молекулярной формулой $C_{31}H_{56}O_5$ ($[M+H]^+$ m/z 509.4198, $\Delta = 0.5$ м.д.). Два других продукта соответствовали отдельно гидратации ($C_{30}H_{54}O_5$, $[M+H]^+$ m/z 495.4041, $\Delta = 0.5$ м.д.) и метилированию (m/z $C_{31}H_{54}O_4$, $[M+H]^+$ 491.4095, $\Delta = 0.03$ м.д.) агликона. В отсутствие этих реакций при кислотном гидролизе образовывался панаксатриол (ПТ), что было подтверждено путем хроматографирования его индивидуального стандартного образца в тех же условиях (рис. 6.21).

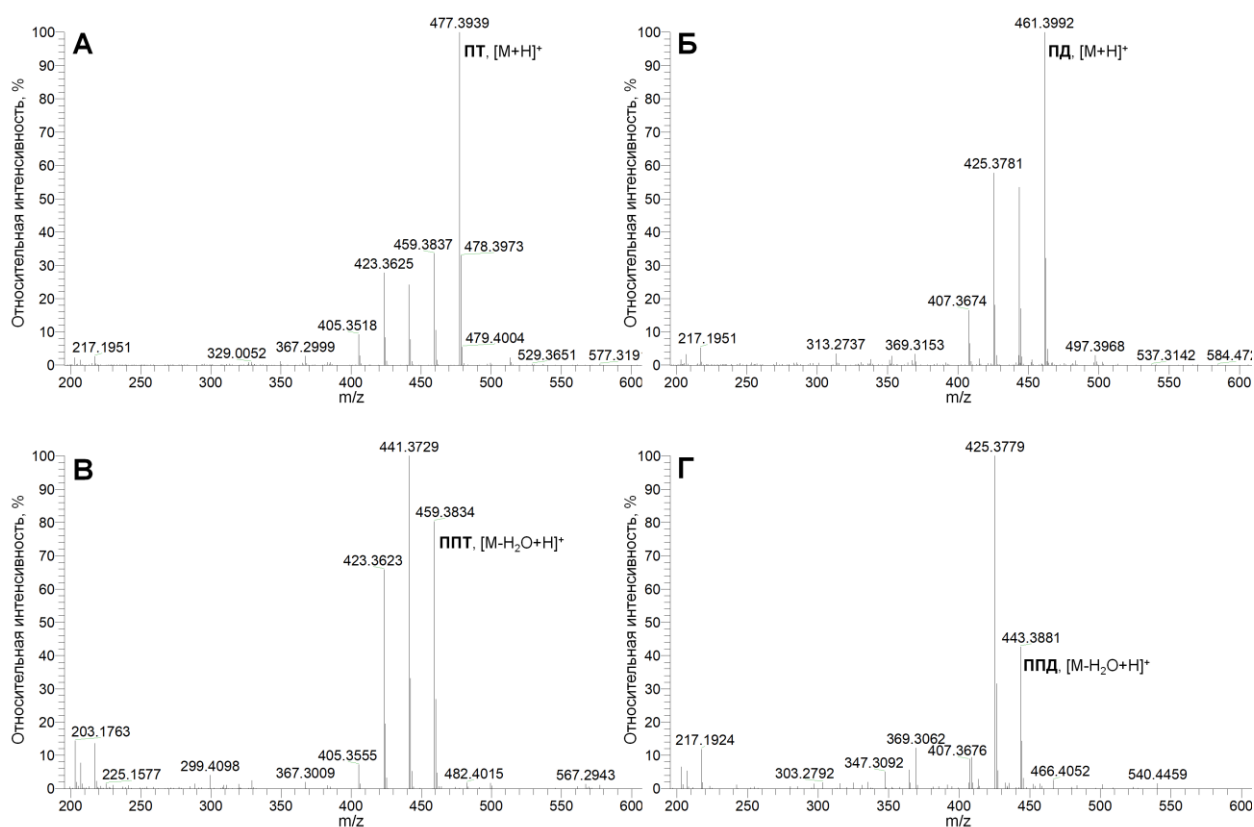


Рисунок 6.21 – Масс-спектры сапогенинов, полученных после кислотного (А,Б) и щелочного (В,Г) гидролиза сапонинов женьшеня.

Однако площадь пика ПТ, определенная по хроматограмме, построенной по полному ионному току была на уровне менее 1% (таблица 6.32). Продукты частичного гидролиза, которые были обнаружены только в присутствии более разбавленной соляной кислоты, соответствовали моногликозиду исследованного сапонины (m/z 638.4381, $C_{36}H_{62}O_9$, $\Delta = 1.2$ м.д.) и его метилированному аналогу (m/z 653.4620, $C_{37}H_{65}O_9$, $\Delta = 0.5$ м.д.).

Таблица 6.32. ВЭЖХ-МС данные, полученные при проведении кислотного гидролиза в течение 2 часов в присутствии 1.2 М соляной кислоты в метаноле

Гинсенозид	№ пика	t _R , мин	Площадь пика, %	Аннотация
Rg ₁	1	9.58	27.56	Гидратированный ПТ
	2	10.66	56.7	Гидратированный и метилированный ПТ
	3	11.53	15.15	Метилированный ПТ
	4	12.76	0.59	Панаксатриол (ПТ)
RT ₅	1	5.36	0.10	Псевдогинсенозид RT ₅
	2	10.76	93.95	Окотиллол (ОТ)
	3	11.12	2.09	Изомер ОТ
	4	13.17	3.71	Дегидро-ОТ
	5	16.28	0.08	Неизвестный субпродукт
Rb ₁	1	8.53	0.17	Моногдикозид ПД/ППД типа
	2	11.13	35.87	Дигидро-ПД
	3	12.14	37.94	Гидратированный и метилированный ПД
	4	13.20	24.21	Метилированный ПД
	5	17.51	1.44	Панаксадиол (ПД)

Гидролиз ППД гинсенозидов в кислых условиях также приводит к образованию нескольких субпродуктов. Также как и в случае с ППТ-гинсенозидами, основным продуктом гидролиза является производное ПД с гидратацией и метилированием одной из ОН-групп ($C_{31}H_{56}O_4$, $[M+H]^+$ m/z 493.4251, $\Delta = 0.07$ м.д.). Зарегистрированные пики других производных указаны в таблице 6.32. Аналогичные продукты наблюдали и в других исследованиях [368,369], где наблюдаемый выход реакции гидролиза был ниже 15%.

Кислотный гидролиз оказался гораздо более подходящим в случае гинсенозидов с ОТ агликоном. В следствие отсутствия двойной связи в боковой цепи не наблюдалось продуктов гидратации для исследованного псевдогинсенозида RT₅. Более того, проведение реакции в присутствии 1.2 М соляной кислоты позволило добиться количественного перехода псевдогинсенозида RT₅ в ОТ агликон при нагревании в течение 1.5 часа, а дальнейшее проведение реакции приводило лишь к увеличению хроматографического пика его (агликона) изомера (таблица 6.32).

Предположительно проходящая в ходе кислотного гидролиза эпимеризация является нежелательным побочным процессом, так как некоторые лекарственные

средства и продукты, содержащие женьшень, сами по себе уже содержат 20(R)-гинсенозиды [122], которые в идеальном случае следует определять отдельно от оригинальных сапонинов в виде отдельных соответствующих агликонов.

Таким образом, кислотный гидролиз, проходя практически до конца, приводит к образованию в случае ППТ и ППД гинсенозидов как минимум 3-х основных продуктов, соотношение которых может меняться от условий проведения реакции, следовательно стабильного аналитического сигнала в виде площади пика, однако конечного продукта реакции в этом случае добиться не удастся. Дальнейшую разработку методики количественного анализа проводили с использованием щелочного гидролиза.

6.3.2 Щелочной гидролиз сапонинов женьшеня

Известно, что щелочной гидролиз приводит к образованию целевых ППТ и ППД агликонов и меньшего числа побочных продуктов [336], однако существующие данные о проведении такого гидролиза для гинсенозидов женьшеня достаточно противоречивы.

Для разработки методики проведения щелочного гидролиза стандартные растворы гинсенозидов (R_{g1} , R_{b1} и RT_5) подвергали воздействию 5% водного раствора гидроксида калия. При этом, полного отщепления сахаридных остатков не наблюдалось даже после 24 ч при высокой температуре (100 °C). Увеличение концентрации гидроксида калия до 20% привело к увеличению выхода реакции, однако в реакционной смеси по-прежнему обнаруживались промежуточные продукты (моногликозиды). Более того, при этом наблюдалось появление разных неидентифицированных побочных продуктов.

На следующем этапе был использован метилат натрия. При этом ППТ и ППД агликоны оказались основными продуктами реакции для гинсенозидов R_{g1} , R_f , R_{h1} , R_e и R_{b1} , R_d , R_{b3} , соответственно (рис. 6.22). При этом ни эимеризации ни образования метилированных или гидратированных побочных продуктов 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 °C в течение 3 – 8 ч. При этом, только в присутствии ацетонитрила в качестве растворителя получалось добиться образования агликонов, свободных от побочных

продуктов и с высокими выходами. 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 (рис. 6.22).

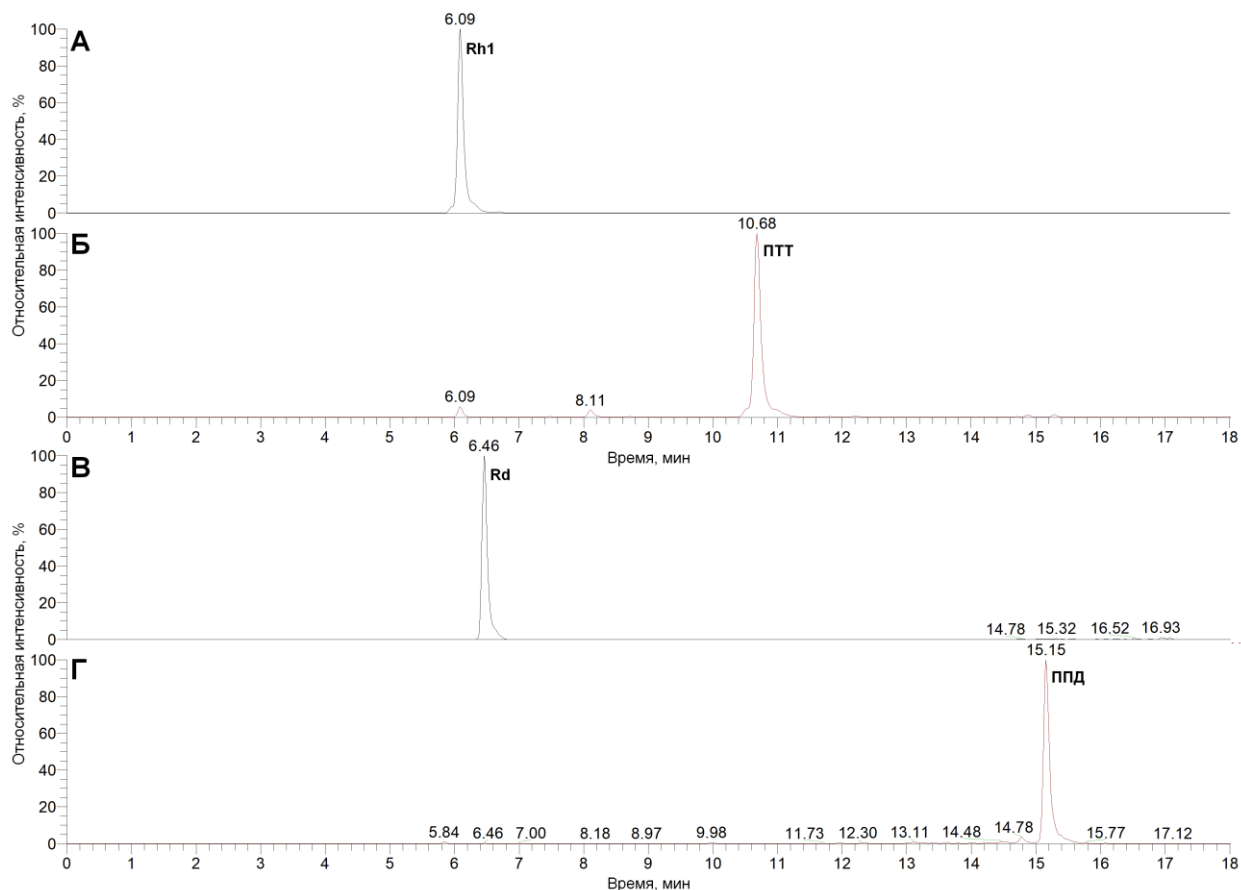


Рисунок 6.22 – Масс-хроматограммы стандартных растворов Rh₁ (А,Б) и Rd (В,Г) до и после проведения гидролиза с метилатом натрия в ацетонитриле в режиме СИМ:
 m/z 423.4 - ППТ, m/z 425.4 - ППД.

По результатам проведенных экспериментов было установлено, что оптимальными являются следующие условия: 8 мг метилата натрия, 3 ч, 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. Существенные содержания этих продуктов обнаруживались и при изменении соотношения реагентов (путем разбавления экстрактов и увеличения добавки метилата натрия до 12 мг), и при повышении температуры (до 120 °С), и при увеличении длительности проведения гидролиза (до 12 ч). Следует отметить, что 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 расходуется на их превращение в соответствующие целевые агликоны и вступает в реакцию с другими компонентами экстрактов. Чтобы устранить это мешающее влияние, разбавленные экстракты подвергали очистке на картриджах Oasis HLB, что позволило существенно повысить выходы для всех исследованных образцов. При этом пики моногликозидов практически исчезли с хроматограмм, а значительные пики побочных 20(R)-ППТ/ППД и их гидратированных/дегидратированных производных были обнаружены, только для образцов красного женьшеня и женьшеневого чая (рис. 6.23).

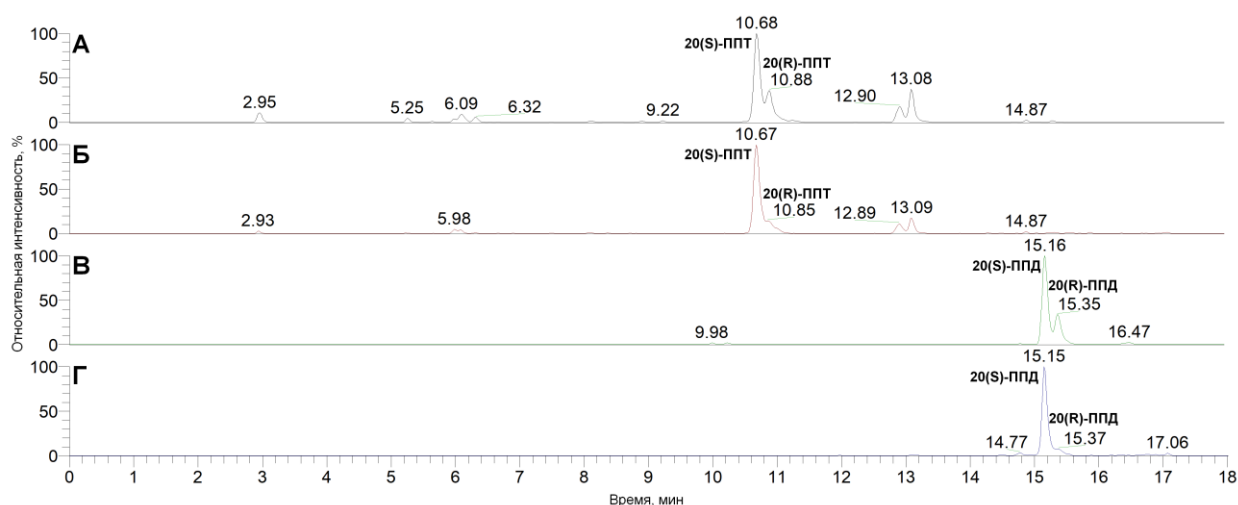


Рисунок 6.23 – Масс-хроматограммы гидролизатов красного корейского женьшеня (А,В) и корейского женьшеневого чая (Б,Г) в режиме СИМ: m/z 423.4 - ППТ, m/z 425.4 - ППД.

Данные пики образуются из уже присутствующих в составе этих объектов гинсенозидов с модифицированной C17 боковой цепью [122,336].

6.3.3 Оценка метрологических характеристик разработанного подхода к гидролизу женьшеневых сапонинов

Расчёт молярных факторов отклика для исследованных гинсенозидов.

Для того чтобы точно определять содержание ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов в растительных материалах и продуктах, необходимо соблюдение двух условий. Во-первых, выход реакции гидролиза для разных гинсенозидов должен быть одинаковым и близким к 100%. Во-вторых, при проведении пробоподготовки (включая гидролиз) и хроматографировании должна наблюдаться хорошая воспроизводимость. Расчет молярных факторов отклика проводили по формуле (6.11):

$$\text{Отклик} \left(\frac{\text{ед.}}{\text{нмоль/мл}} \right) = \frac{S \times M}{C \times 1000} \quad (6.11)$$

где, S – площадь пика соответствующего агликона, C – концентрация гинсенозида в стандартном растворе (5 мкг/мл), а M – молярная масса гинсенозида. Полученные результаты представлены в таблице 6.33.

Таблица 6.33 – Молярные факторы отклика для гинсенозидов с разной сахаридной цепью (n=3)

Гинсенозид	Фрагментарная формула	M _r , Да	C, нмоль/мл	Площадь пика, ×10 ⁸ , ед.	Отклик, ×10 ⁷ , ед. × мл/нмоль
Rg ₁	ППТ–20–Glc–6–Glc	801.01	6.24	2.47	3.84
Re	ППТ–20–Glc–6–GlcRha	947.15	5.28	2.11	3.99
Rf	ППТ–20–H–6–GlcGlc	801.01	6.24	2.54	4.07
Rh ₁	ППТ–20–H–6–Glc	638.87	7.83	2.99	3.82
Rb ₁	ППД–20–GlcGlc–3–GlcGlc	1109.29	4.51	2.44	5.41
Rb ₃	ППД–20–GlcXyl–3–GlcGlc	1079.27	4.63	2.44	5.27
Rd	ППД–20–Glc–3–GlcGlc	947.15	5.28	3.04	5.76
RT ₅	ОТ–6–Glc	654.87	7.64	0.13	0.17
F ₁₁	ОТ–6–GlcRha	801.01	6.24	0.94	0.15

Молярные факторы отклика были схожи для гинсенозидов с одинаковым агликоном, что дает возможность оценить валовые содержания ППТ, ППД и ОТ сапонинов, используя групповые реперные соединения (в роли которых могут выступать наиболее коммерчески доступные гинсенозиды) в качестве стандартов. При этом валовое содержание каждой группы гинсенозидов будет выражено в единицах молярной концентрации (например, ммоль/г), что не всегда удобно. Чтобы оценить содержание гинсенозидов в мг/г следует использовать ВЭЖХ-МС данные, полученные в режиме сканирования. Так, для ППТ гинсенозидов, одновременное присутствие малонил-производных для сапонинов с тремя сахаридными остатками (Re, R₁), и небольших моногликозидов (Rh₁, F₁) приводит к тому, что пересчет молярной концентрации на дигликозид (Rg₁), который и использован в качестве реперного соединения для гинсенозидов ППТ-типа, позволит приблизительно усреднить результаты и получить желаемую оценку массового содержания

гликозидов. В случае ППД гинсенозидов – очень большая доля приходится на Rb₁, Rb₂, Rb₃ и Rc, которые обладают практически одинаковым молекулярным весом. Псевдогинсенозид F₁₁ доминирует среди других представителей этой группы ОТ-гинсенозидов в американском женьшене [167]. Таким образом, можно порекомендовать использование гинсенозидов Rg₁, Rb₁ и F₁₁ в качестве групповых реперных стандартных соединений для определения группового состава сапонинов женьшеня.

Определение диапазонов линейности и пределов обнаружения, точности и воспроизводимости. 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. Полученные значения коэффициентов детерминации и аппроксимированные значения предела обнаружения представлены в таблице 6.34.

Таблица 6.34 – Аналитические характеристики разработанного подхода валового группового определения ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов

Сапогенин	Линейный диапазон (нг/мл)	Коэффициент детерминации, R ²	C _{min} , нг/мл	C _{lim} , нг/мл
ППТ	50-5000	0.9988	20	50
ППД	50-5000	0.9972	20	50
ОТ	250-5000	0.9970	80	250

Удовлетворительные значения коэффициентов детерминации (≥ 0.99) в широком диапазоне концентраций позволяют определять суммарное содержание гинсенозидов в смесях с концентрацией до 5 мкг/мл, что совпадает с концентрацией сапонинов на том уровне разбавления экстрактов, когда уже достигаются достаточно высокие выходы реакции гидролиза.

Для оценки точности и воспроизводимости разработанного способа определения, в трех повторностях проводили гидролиз стандартных смесей на трех уровнях концентрации (200, 500 и 2000 нг/мл). Полученные значения точности 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 (таблица 6.35).

Таблица 6.35 – Показатели точности и воспроизводимости при определении валового содержания гинсенозидов с разным типом агликона

Сапо- генин	Добавка, нг/мл	В течение одного дня (n=3, P=0.95)			В течение трех дней (n=9, P=0.95)		
		С, нг/мл	Точность, %	ОСКО, %	С, нг/мл	Точность, %	ОСКО, %
ППТ	200	206±16	103	7.7	200±17	100	8.3
	500	506±28	101	5.6	494±27	99	5.6
	2000	2017±73	101	3.6	1980±79	99	4.0
ППД	200	200±10	100	4.8	199±11	99	5.7
	500	515±36	103	7.1	503±36	101	7.1
	2000	2059±136	103	6.6	2021±123	101	6.1
ОТ	200	211±23	106	10.8	192±23	96	11.4
	500	527±33	105	6.3	501±37	100	7.3
	2000	2095±134	105	6.4	1956±162	98	8.3

Таким образом, метрологические характеристики предложенного подхода являются удовлетворительными и позволяют применять его для определения групповых содержаний гинсенозидов в различных объектах.

Апробация разработанного подхода при анализе продуктов и растительного сырья. Разработанный подход был протестирован при анализе разных типов растительных образцов и продуктов на основе женьшеня. Суммарные содержания ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов приведены в таблице 6.36.

Таблица 6.36 – Суммарные содержания ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов, определенные после проведения щелочного гидролиза (n= 3, p=0.95) и оцененные методом внешнего стандарта

Содержание гинсенозидов, мг/г		Добавка сух. экстракт женьшеня	Сухие кольца корня женьшеня	Корейский красный женьшень	Корейский женьшеневый чай
ППТ	Гидролиз	32 ± 4	17 ± 2	0.50 ± 0.06	1.2 ± 0.1
	ВС	11 ± 2	10 ± 2	0.27 ± 0.03	0.79 ± 0.08
ППД	Гидролиз	34 ± 4	52 ± 6	0.38 ± 0.05	2.4 ± 0.2
	ВС	38 ± 4	35 ± 4	0.36 ± 0.04	2.9 ± 0.3
ОТ	Гидролиз	< ПО	1.3 ± 0.1	< ПО	< ПО
	ВС	< ПО	1.2 ± 0.1	< ПО	≈ ПО

Для сравнения концентрации двух ОТ-гинсенозидов (RT_5 , F_{11}), девяти ППД-гинсенозидов (R_c , R_d , R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{g3} , $C-K$, R_{h2} , F_2), и семи ППТ-гинсенозидов (R_1 , R_{g1} , R_e , R_f , R_{h1} , R_{g2} , F_1) определенные в этих же объектах методом внешнего стандарта были просуммированы. Для ППТ гинсенозидов, валовые содержания, определенные после проведения гидролиза, 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, как отмечалось выше, доля нескольких основных гинсенозидов значительно превосходит вклад в суммарное содержание для других представителей этой группы. Таким образом, используя всего лишь три групповых стандартных образца реперных гинсенозидов удалось осуществить полную оценку качества женьшеневых продуктов по трем валовым показателям, что может позволить рассчитать адекватную дозировку при приеме таких средств [370].

6.4 Выводы к главе 6

Предложенная методология ВЭЖХ-МС-КАМС представляет собой новый групповой аналитический подход, который использует условия групповой селективной хроматографии и групповые эталонные (реперные) стандарты для определения сапонинов и потенциально может быть применена для других групп фитокомпонентов растений. RFP-колонка с обращенной фазой была успешно использована для разделения 19 гинсенозидов женьшеня. По сравнению с классической C18 фазой была достигнута более высокая селективность в отношении сапонинов ППТ и ППД типов. Применимость данного подхода была подтверждена при определении гинсенозидов на различных системах ВЭЖХ-ЭРИ-МС. Влияние хроматографических и МС-параметров на стабильность значений ОФО было детально исследовано, и наблюдалась достаточная воспроизводимость ОФО даже для широкого диапазона вариаций. Улучшенная стабильность ОФО для сапонинов с различной структурой агликона была достигнута за счет использования групповых эталонных стандартов. Соотношение интенсивностей в паттернах фрагментации сапогенинов сильно зависит от конструкции источника ионов и условий МС-детектирования, в том числе от ПД и ВП. Следовательно, путем суммирования сигналов это влияние уменьшается, и могут быть получены стабильные значения

ОФО. Тем не менее, по сравнению с подходом ВЭЖХ-УФ-КАМС, требуется повышенная согласованность условий проведения измерений. Разработанный метод был протестирован на небольшой партии различных растительных продуктов, проанализированных с использованием трех различных ВЭЖХ-МС инструментов в близких, но отличающихся (в виду разной конструкции приборов) условиях детектирования. Результаты показали хорошую корреляцию между предложенным методом КАМС и традиционной количественной оценкой методом ВС.

Разработан способ быстрого одновременного ВЭЖХ-МС/МС определения протодиосцина, диосцина и диосгенина в экстрактах из растительного сырья *T. terrestris*. Показано, что применение способа КАМС для количественной обработки МС-данных позволяет проводить адекватную оценку содержания определяемых соединений. Расхождение с результатами, полученными методом ВС, не превышает 10%. Пределы обнаружения составили 5, 10 и 20 нг/мл при определении диосцина, протодиосцина и диосгенина соответственно.

Определение суммарных (валовых) групповых концентраций гликозидов может быть осуществлено при проведении гидролиза для полного отщепления сахаридных заместителей. В случае гинсенозидов женьшеня кислотный гидролиз приводит к эимеризации и образованию других побочных продуктов реакции, что не происходит в случае проведения щелочного гидролиза с метилатом натрия в среде ацетонитрила. Таким образом, можно с высокой степенью достоверности обнаруживать присутствие 20(R)-ППТ и 20(R)-ППД и других модифицированных гинсенозидов в образцах, прошедших обработку, таких как красный женьшень и корейский женьшеневый чай. Гидролизаты образцов американского и азиатского женьшеней можно различать по присутствию пика агликона псевдогинсенозидов - ОТ. Таким образом, разработанный способ, включающий процедуры пробоподготовки, очистки и гидролиза с последующим ВЭЖХ-МС детектированием, позволяет быстро и селективно определять содержание разных групп женьшеневых сапонинов в исследуемых образцах растительного сырья и продуктов на его основе.

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 диоскореи, а также сахаров и сахароспиртов из различных видов хвой. Аналогичный подход был позднее применен другими авторами для оптимизации условий дериватизации для групп аналитов [371,372].

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.

ОБЩИЕ 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 листы 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.

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.х.н. Брауну Аркадию Владимировичу, к.м.н. Суханову Антону Евгеньевичу, 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.х.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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. Новосибирск: Наука, 2000. 534 с.
2. David B., Wolfender J.-L., Dias D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. // *Phytochem. Rev.* 2015. V. 14. P. 299–315.
3. Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1830, № 6. P. 3670–3695.
4. Yuan H., Ma Q., Ye L., Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. // *Molecules.* 2016. V. 21, № 5. Article 559.
5. Bottcher C., von Roepenack-Lahaye E., Willscher E., Scheel D., Clemens S. Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79, № 4. P. 1507–1513.
6. Alseekh S., Fernie A.R. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? // *Plant J.* 2018. V. 94, № 6. P. 933–942.
7. Hu D.D., Chen X.L., Xiao X.R., Wang Y.K., Liu F., Zhao Q., Li X., Yang X.-W., Li F. Comparative metabolism of tripolide and triptonide using metabolomics. // *Food Chem. Toxicol.* 2018. V. 115. P. 98–108.
8. Thirumurugan D., Cholarajan A., Raja S.S.S., Vijayakumar R. An Introductory chapter: secondary metabolites. // *Secondary metabolites - sources and applications:* eds. R. Vijayakumar, S.S.S. Raja. London: IntechOpen, 2018. 148 p.
9. Matsuda F., Yonekura-Sakakibara K., Niida R., Kuromori T., Shinozaki K., Saito K. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. // *Plant J.* 2009. V. 57, № 3. P. 555–577.
10. Patwardhan B. Traditional medicine-inspired evidence-based approaches to drug discovery. // *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine:* ed. P.K. Mukherjee. Amsterdam et al.: Elsevier, 2015. P. 259–272.
11. Choi Y.-H., Kinghorn A.D., Shi X., Zhang H., Teo B.K. Abrusoside A: a new type of highly sweet triterpene glycoside. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1989. V. 13. P. 887–888.

12. *Breton R.C., Reynolds W.F.* Using NMR to identify and characterize natural products. // *Nat. Prod. Rep.* 2013. V. 30. P. 501–524.
13. *Allwood J.W., Goodacre R.* An Introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. // *Phytochem. Anal.* 2010 V. 21, № 1. P. 33–47.
14. *Hubert J., Nuzillard J.-M., Renault J.-H.* Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? // *Phytochem. Rev.* 2017. V. 16. P. 55–95.
15. *Nikolić D., Gödecke T., Chen S.-N., White J., Lankin D.C., Pauli G.F., van Breemen R.B.* Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). // *Fitoterapia*. 2012. V. 83, № 3. P. 441–460.
16. *Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Beale M.H., Beger R., Daykin C.A., Fan T.W.-M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J.L.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. // *Metabolomics*. 2007. V. 3. P. 211–221.
17. *Christ B., Pluskal T., Aubry S., Weng J.-K.* Contribution of untargeted metabolomics for future assessment of biotech crops. // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23, № 12. P. 1047–1056.
18. *Qiu F., McAlpine J.B., Lankin D.C., Burton I., Karakach T., Chen S.-N., Pauli G.F.* 2D NMR barcoding and differential analysis of complex mixtures for chemical identification: The Actaea triterpenes. // *Anal Chem.* 2014. V. 86, № 8. P. 3964–3972.
19. *Potocki L., Depciuch J., Kuna E., Worek M., Lewinska A., Wnuk M.* FTIR and raman spectroscopy-based biochemical profiling reflects genomic diversity of clinical *Candida* isolates that may be useful for diagnosis and targeted therapy of Candidiasis. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20, № 4. Article 988.
20. *Airado-Rodriguez D., Galeano-Diaz T., Duran-Meras I., Wold J.P.* Usefulness of fluorescence excitation-emission matrices in combination with PARAFAC, as fingerprints of red wines. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57, № 5. P. 1711–1720.
21. *Korfmacher W.A.* Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. // *Drug Discov. Today*. 2005. V. 10, № 20. P. 1357–1367.
22. *Wolfender J.-L., Nuzillard J.-M., van der Hoof J.J.J., Renault J.-H., Bertrand S.* Accelerating metabolite identification in natural product research: Toward an ideal combination of liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry

- and NMR profiling, *in silico* databases, and chemometrics. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91, № 1. P. 704–742.
23. Kellogg J.J., Paine M.F., McCune J.S., Oberlies N.H., Cech N.B. 2019. Selection and characterization of botanical natural products for research studies: a NaPDI center recommended approach. // *Nat. Prod. Rep.* 2019. V. 36, № 8. P. 1196–1221.
 24. Stefanowicz P., Prasain J.K., Yeboah K.F., Konishi Y. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *Taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73, № 15. P. 3583–3589.
 25. Gao W., Liu X.-G., Ping L.L., Yang L.H. Targeted profiling and relative quantification of benzoyl diterpene alkaloids in *Aconitum* roots by using LC–MS/MS with precursor ion scan. // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41, № 18. P. 3515–3526.
 26. Tchoumtchoua J., Njamien D., Mbanya J.C., Skaltsounis A.-L., Halabalaki M. Structure-oriented UHPLC-LTQ Orbitrap-based approach as a dereplication strategy for the identification of isoflavonoids from *Amphimas pterocarpoides* crude extract. // *J. Mass Spectrom.* 2013. V. 48, № 5. P. 561–575.
 27. Le Ven J., Schmitz-Afonso I., Lewin G., Laprévote O., Brunelle A., Touboul D., Champy P. Comprehensive characterization of *Annonaceous acetogenins* within a complex extract by HPLC-ESI-LTQ-OrbitrapW using post-column lithium infusion. // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47, № 11. P. 1500–1509.
 28. Girardi C., Jullian V., Haddad M., Vansteelandt M., Cabanillas B.J., Kapanda C.N., Herent M.F., Quetin-Leclercq J., Fabre N. Analysis and fragmentation mechanisms of hirsutinolide-type sesquiterpene lactones by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016. V. 30, № 5. P. 569–580.
 29. Kouloura E., Skaltsounis A.-L., Michel S., Halabalaki M. Ion tree-based structure elucidation of acetophenone dimers (AtA) from *Acronychia pedunculata* and their identification in extracts by liquid chromatography electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry. // *J. Mass Spectrom.* 2015. V. 50, № 3. P. 495–512.
 30. Shi X.-J., Yang W.-Z., Qiu S., Yao C.-L., Shen Y., Pan H.-Q., Bi Q.-R., Yang M. Wu W.-U., Guo D. An in-source multiple collision-neutral loss filtering based nontargeted metabolomics approach for the comprehensive analysis of malonyl-

- ginsenosides from *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and *P. notoginseng*. // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 952. P. 59–70.
31. *Pan H.-Q., Yang W.-Z., Yao C.-L., Shen Y., Zhang Y.-B., Shi X.-J., Yao S., Wu W., Guo D.* Mass defect filtering-oriented classification and precursor ions list-triggered high-resolution mass spectrometry analysis for the discovery of indole alkaloids from *Uncaria sinensis*. // *J. Chromatogr. A*. 2017. V. 1516. P. 102–113.
 32. *Pan H.-Q., Yao C.-L., Yang W.-Z., Yao S., Huang Y., Zhang Y., Wua W., Guo D.* An enhanced strategy integrating offline two-dimensional separation and step-wise precursor ion list-based raster-mass defect filter: Characterization of indole alkaloids in five botanical origins of *Uncariae Ramulus Cum Unicis* as an exemplary application. // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1563. P. 124–134.
 33. *Shi X.-J., Yang W.-Z., Huang Y., Hou J.-J., Qiu S., Yao C.-L., Feng Z., Wei W., Wu W., Guo D.* Direct screening of malonylginsenosides from nine Ginseng extracts by an untargeted profiling strategy incorporating in-source collision-induced dissociation, mass tag, and neutral loss scan on a hybrid linear ion-trap/Orbitrap mass spectrometer coupled to ultra-high performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1571. P. 213–222.
 34. *Xia Y.-G., Gong F.-Q., Guo X.-D., Song Y., Li C.-X., Liang J., Yang B.-Y., Kuang H.-K.* Rapid screening and characterization of triterpene saponins in *Acanthopanax senticosus* leaves via untargeted MS^{All} and SWATH techniques on a quadrupole time of flight mass spectrometry. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 170. P. 68–82.
 35. *Ligor M., Ratiu I.-A., Kielbasa A., Al-Suod H., Buszewski B.* Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. // *Electrophoresis*. 2018. V. 39, № 15. P. 1860–1874.
 36. *Ambigaipalan P., de Camargo A.C., Shahidi F.* Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. // *Food Chem.* 2017. V. 221. P. 1883–1894.
 37. *Sharma S., Chattopadhyay S.K., Singh M., Bawankule D.U., Kumar S.* Novel chemical constituents with anti-inflammatory activity from the leaves of *Sesbania aculeata* // *Phytochemistry*. 2014. V. 100. P. 132–140.

38. Rafinska K., Pomastowski P., Wrona O., Gorecki R., Buszewski B. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. // *Phytochem. Lett.* 2017. V. 20. P. 520–539.
39. Al-Suod H., Ligor M., Ratiu I.A., Rafinska K., Gorecki R., Buszewski B. A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. // *Phytochem. Lett.* 2017. V. 20. P. 507–519.
40. Al-Suod H., Ratiu I.-A., Ligor M., Ligor T., Buszewski B. Determination of sugars and cyclitols isolated from various morphological parts of *Medicago sativa* L. // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 41, № 5. P. 1118–1128.
41. Hoffmann-Ostenhof O., Pittner F. The biosynthesis of myo-inositol and its isomers. // *Can. J. Chem.* 1982. V. 60, № 14. P. 1863–1871.
42. Manach C., Scalbert A., Morand Ch., Remesy Ch., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. V. 79, № 5. P. 727–247.
43. Cook N.C., Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. // *J. Nutr. Biochem.* 1996. V. 7, № 2. P. 66–77.
44. Pieta P.G. Flavonoids as antioxidants. // *J. Nat. Prod.* 2000. V. 63, № 7. P. 1035–1042.
45. Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. // *J. Plant Res.* 2000. V. 113. P. 287–299.
46. Forkmann G., Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. // *Cur. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12, № 2. P. 155–160.
47. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. // *Physiol Rev.* 2014. V. 94, № 2. P. 329–354.
48. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. // *Biochem.* 2003. V. 68, № 5. P. 514–519.
49. Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. V. 81, № 1S. P. 215S–217S.
50. Del Rio D., Steward A.J., Mullen W., Burns J., Lean M.E.J., Brighenti F., Crozier A. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52, № 10. P. 2807–2815

51. *Rusak G., Gutzeit H.O., Muller J. L.* Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. // *Nutr. Res.* 2005. V. 25, № 2. P. 143–153.
52. *Guclu-Ustundag O., Mazza G.* Saponins: properties, applications and processing. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007. V. 47, № 3. P. 231–258.
53. *Augustin J.M., Kuzina V., Anderson S.B., Bak S.* Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. // *Phytochem.* 2011. V. 72, № 6. P. 435–457.
54. *Tava A., Mella M., Avato P., Biazzi E., Pecetti L., Bialy Z., Jurzysta M.* New triterpenic saponins from the aerial parts of *Medicago arabica* (L.) Huds. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57, № 7. P. 2826–2835.
55. *Vincken J-P., Heng L., de Groot A., Gruppen H.* Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. // *Phytochem.* 2007. V. 68, № 3. P. 275–297.
56. *Verza S.G., Silveira F., Cibulski S., Kaiser S., Ferreira F., Gosmann G., Roehe P.M., Ortega G.G.* Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds. // *J. Agri. Food Chem.* 2012. V. 60, № 12. P. 3113–3118.
57. *Hassan S.M., Haq A.U., Byrd J.A., Berhow M.A., Cartwright A.L., Bailey C.A.* Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. // *Food Chem.* 2010. V. 119 № 2. P. 600–605.
58. *Chan K.W., Khong N.M.H., Iqbal S., Ismail M.* Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. // *J. Cereal Sci.* 2013. V. 5, № 3. P. 480–485.
59. *Cheng T.C., Lu J.F., Wang J.S., Lin L.J., Kuo H.I., Chen B.H.* Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. // *J. Agri. Food Chem.* 2011. V. 59, № 20. P. 11319–11329.
60. *Joseph B., Jini D.* Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. // *Asia Pac. J. Trop. Dis.* 2013. V. 3, № 2. P. 93–102.
61. *Yun J.W.* Possible anti-obesity therapeutics from nature -- a review. // *Phytochem.* 2010. V. 71, № 14-15. P. 1625–1641.
62. *Chauhan P.S., Gupta K.K., Bani S.* The immunosuppressive effects of *Agyrolobium roseum* and pinitol in experimental animals. // *Int. Immunopharmacol.* 2011. V. 11, № 2. P. 286–291.

63. McDonald IV L.W., Goheen S.C., Donald P. A., Campbell J.A. Identification and quantitation of various inositols and o-methylinositols present in plant roots related to soybean cyst nematode host status. // *Nematropica*. 2012. V. 42, №1. P. 1–8.
64. Skot L., Egsgaard H. Identification of ononitol and O-methyl-scylo-inositol in pea root nodules. // *Planta*. 184. V. 161, № 1. P. 32–36.
65. De Assis Galotta A.L.Q., Koolen H.H.F., De Souza A.D.L., Da Silva F.M.A., Pinheiro M.L.B., Da Rocha A.F.I. Chemical constituents from the leaves of *Mucoa duckei* (markgraf) Zarucchi (apocynaceae) a medicinal plant from the amazon region. // *J. Pharm. Sci.* 2012. V. 4, № 2. P. 470–472.
66. Soria A.C., Sanz M.L., Villamiel M. Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC-MS. // *Food Chem.* 2009. V. 114, № 2. P. 758–762.
67. Mirali M., Ambrose S.J., Wood S.A., Vandenberg A., Purves R.W. Development of a fast extraction method and optimization of liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of phenolic compounds in lentil seed coats. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014. V. 969. P. 149–161.
68. Jeon D.B., Hong Y.S., Lee G.H., Park Y.M., Lee C.M., Nho E.Y., Choi J.Y., Jamila N., Khan N., Kim K.S. Determination of volatile organic compounds, catechins, caffeine and theanine in Jukro tea at three growth stages by chromatographic and spectrometric methods. // *Food Chem.* 2017. V. 219. P. 443–452.
69. Belda M., Sanchez D., Bover E., Prieto B., Padron C., Cejalvo D., Lloris J.M. Extraction of polyphenols in *Himanthalia elongata* and determination by high performance liquid chromatography with diode array detector prior to its potential use against oxidative stress. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life.* 2016. V. 15. P. 334–341.
70. Li X.E., Wang Y.X., Sun P., Liao D.Q. Determination of saponin content in Hang maidong and Chuan maidong via HPLC-ELSD analysis. // *J. Anal. Methods Chem.* 2016. V. 2016. Article 7214607.
71. Zhang X.F., Yang S.L., Han Y.Y., Zhao L., Lu G.L., Xia T., Gao L.P. Qualitative and quantitative analysis of triterpene saponins from tea seed pomace (*Camellia oleifera* Abel) and their activities against bacteria and fungi. // *Molecules* 2014. V. 19, № 6. P. 7568–7580.

72. Zhang X.-F., Han Y.-Y., Bao G.-H., Ling T.-J., Zhang L., Gao L.-P., Xia T. A new saponin from tea seed pomace (*Camellia oleifera* Abel) and its protective effect on PC12 Cells. // *Molecules*. 2012 V. 17, № 10. P. 11721–11728.
73. Adao C.R., da Silva B.P., Parente J.P. A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. porrum with antiinflammatory and gastroprotective effects. // *Phytochem. Lett.* 2011. V. 4, № 3. P. 306–310.
74. Sadeghi M., Zolfaghari B., Senatore M., Lanzotti V. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity. // *Food Chem.* 2013. V. 141. P. 1512–1521.
75. Baumgartner S., Genner-Ritzmann R., Haas J., Amado R., Neukom H. Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). // *J. Agric. Food. Chem.* 1986. V. 34, № 5. P. 827–829.
76. Lee S.O., Choi S.Z., Lee J.H., Chung S.H., Park S.H., Kang H.C., Yang E.Y., Cho H.J., Lee K.R. Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*. // *Arch. Pharm. Res.* 2004. V. 27, № 12. P. 1207–1210.
77. Dewangan P., Verma A., Kesharwani D. Isolation of D-pinitol: A bioactive carbohydrate from the leaves of *Bauhinia variegata* L. // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2014. V. 24, № 1. P. 43–45.
78. Duquesnoy E., Castola V., Casanova J. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy. // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343, № 5. P. 893–902.
79. Autor E., Cornejo A., Bimbela F., Maisterra M., Gandia L.M., Martinez-Merino V. Extraction of phenolic compounds from *Populus salicaceae* bark. // *Biomolecules*. 2022. V. 12, № 4. Article 539.
80. Pecetti L., Biazzi E., Tava A. Variation in saponin content during the growing season of spotted medic [*Medicago arabica* (L.) Huds.]. // *J. Sci. Food Agric.* 2010. V. 90, № 14. P. 2405–2410.
81. Carelli M., Biazzi E., Tava A., Losini I., Abbruscato P., Depedro C., Scotti C. Sapogenin content variation in *Medicago* inter-specific hybrid derivatives highlights some aspects of saponin synthesis and control. // *New Phytol.* 2015. V. 206, № 1. P. 303–314.
82. Li T., Zhang Z., Zhang L., Huang X., Lin J., Chen G. An improved facile method for extraction and determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by focused

- microwave-assisted extraction coupled with GC–MS. // J. Sep. Sci. 2009. V. 32, № 23-24. P. 4167–4175.
83. Wang L., Weller C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. // Trends Food Sci. Technol. 2006. V. 17, № 6. P. 300–312.
 84. Chafer A., Berna A. Study of kinetics of the D-pinitol extraction from carob pods using supercritical CO₂. // J. Supercrit. Fluids, 2014. V. 94. P. 212–215.
 85. Alanon M.E., Ruiz-Matute A.I., Martinez-Castro I., Diaz-Maroto M.C., Perez Coello M.S. Optimisation of pressurised liquid extraction for the determination of monosaccharides and polyalcohols in woods used in wine aging. // J. Sci. Food Agric. 2009. V. 89, № 15. P. 2558–2564.
 86. Rodriguez-Solana R., Salgado J.M., Dominguez J.M., Cortes-Diequez S. Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC–MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC–ESI/MS/MS) from Lamiaceae species. // Phytochem. Anal. 2015. V. 26, № 1. P. 61–71.
 87. Rajha H.N., Ziegler W., Louka N., Hobaike Z., Vorobiev E., Boechzelt H.G., Maroun R.G. Effect of the drying process on the intensification of phenolic compounds recovery from grape pomace using accelerated solvent extraction. // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15, № 10. P. 18640–18658.
 88. Lama-Munoz A., del Mar Contreras M., Espinola F., Moya M., Romero I., Castro E. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. // Food Chem. 2020. V. 320. Article 126626.
 89. Zhang Y., Liu C., Qi Y., Li S., Wang J. Separation and purification of steroidal saponins from *Paris polyphylla* by microwave-assisted extraction coupled with countercurrent chromatography using evaporative light scattering detection. // Sep. Purif. Technol. 2013. V. 106, № 6. P. 82–89.
 90. Yang Y.-Y., Tang Y.-Z., Fan C.-L., Luo H.-T., Guo P.-R., Chen J.-X. Identification and determination of the saikosaponins in *Radix bupleuri* by accelerated solvent extraction combined with rapid-resolution LC-MS. // J. Sep. Sci. 2010. V. 33, № 13. P. 1933–1945.
 91. Chen J., Li W., Yang B., Guo X., Lee F.S., Wang X. Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge using accelerated solvent

- extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta* 2007. V. 596, № 2. P. 273–280.
92. *Kielbasa A., Krakowska A., Rafinska K., Buszewski B.* Isolation and determination of saponin hydrolysis products from *Medicago sativa* using supercritical fluid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography with evaporative light scattering detection. // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42, № 2. P. 465–474.
 93. *Sun Y., Wei L., Wang J., Bi J., Liu Z., Wang Y., Guo Z.* Optimization of supercritical fluid extraction of saikosaponins from *Bupleurum falcatum* with orthogonal array design. // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33, № 8. P. 1161–1166.
 94. *Tava A., Mella M., Avato P., Biazzi E., Pecetti L., Bialy Z., Jurzysta M.* New triterpenic saponins from the aerial parts of *Medicago arabica* (L.) Huds. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57, № 7. P. 2826–2835.
 95. *Ruiz-Aceituno L., Rodriguez-Sanchez S., Sanz J., Sanz M.L., Ramos L.* Optimization of pressurized liquid extraction of inositols from pine nuts (*Pinus pinea* L.) // *Food Chem.* 2014. V. 153. P. 450–456.
 96. *Krakowska A., Rafinka K., Walczak J., Kowalkowski T., Buszewski B.* pH-Gradient liquid chromatography: Fundamentals and examples. // *J. AOAC Int.* 2017. V. 100, № 6. P. 1590–1598.
 97. *Klein-Junior L.C., de Souza M.R., Viaene J., Bresolin T.M.B., de Gasper A.L., Henriques A.T., Vander Heyden Y.* Quality control of herbal medicines: From traditional techniques to state-of-the-art approaches. // *Planta Med.* 2021. V. 87, № 12-13. P. 964–988.
 98. *Tetik N., Yuksel E.* Ultrasound-assisted extraction of d-pinitol from carob pods using response surface methodology. // *Ultrason. Sonochem.* 2014. V. 21, № 2. P. 860–865.
 99. *Gomez-Gonzalez S., Ruiz-Jimenez J., Priego-Capote F., De Castro M.D.L.* Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching. // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58, № 23. P. 12292–12299.
 100. *Ruiz-Aceituno L., Garcia-Sarrio M.J., Alonso-Rodriguez B., Ramos L., Sanz M.L.* Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. // *Food Chem.* 2016. V. 196. P. 1156–1162.

101. Yang J., Ou X., Zhang X., Zhou Z., Ma L. Effect of different solvents on the measurement of phenolics and the antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) with accelerated solvent extraction. // J. Food Sci. 2017. V. 82, № 3. P. 605–612.
102. Hofmann T., Nebehaj E., Albert L. The high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometric investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols. // J. Chromatogr. A. 2015. V.1393. P. 96–105.
103. Bai X.L., Yue T.L., Yuan Y.H., Zhang H.W. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. // J. Sep. Sci. 2010. V. 33, № 23-24. P. 3751–3758.
104. Budrat P., Shotipruk A. Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. // Sep. Purif. Technol. 2009. V. 66, № 1. P. 125–129.
105. Casazza A.A., Aliakbarian B., Mantegna S., Cravotto G., Perego P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. // J. Food Eng. 2010. V. 100, № 1. P. 50–55.
106. Prodanov M., Garrido I., Vacas V., Lebron-Aguila R., Duenas M., Gomez Cordoves C., Bartolome B. Ultrafiltration as alternative purification procedure for the characterization of low and high molecular-mass phenolics from almond skins. // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 609, № 2. P. 241–251.
107. Proestos C., Komaitis M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. // LWT-Food Sci Tech. 2008. V. 41, № 4. P. 652–659.
108. Saleri F.D., Chen G., Li X., Guo M. Comparative analysis of saponins from different Phytolaccaceae species and their antiproliferative activities. // Molecules. 2017. V. 22, № 7. Article 1077.
109. Engelberth A.S., Clausen E.C., Carrier D.J. Comparing extraction methods to recover ginseng saponins from American ginseng (*Panax quinquefolium*), followed by purification using fast centrifugal partition chromatography with HPLC verification. // Sep. Purif. Technol. 2010. V. 72, № 1. P. 1–6.

110. *Liu L.* Microwave-assisted three-liquid-phase extraction of diosgenin and steroidal saponins from fermentation broth of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. // *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.* 2016. V. 23, № 1. P. 101–114.
111. *Xu H., Shi X., Ji X., Du Y., Zhu H., Zhang L.* A rapid method for simultaneous determination of triterpenoid saponins in *Pulsatilla turczaninovii* using microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2012. V. 135, № 1. P. 251–258.
112. *Preethi S., Saral A. M.* GC-MS Analysis of microwave assisted ethanolic extract of *Pithecellobium dulce*. // *Malaya J. BioSci.* 2014. V. 1, № 4. P. 242–247.
113. *Cook N.C., Samman S.* Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. // *J. Nutr. Biochem.* 1996. V. 7, № 2. P. 66–77.
114. *Ong E.S.* Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004. V. 812, № 1-2. P. 23–33.
115. *Yang W.-Z., Ye M., Qiao X., Liu C.-F., Miao W.-J., Bo T., Tao H.-Y., Guo D.* A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 739. P. 56–66.
116. *Kukula-Koch W., Koch W., Angelis A., Halabalaki M., Aligiannis N.* Application of pH-zone refining hydrostatic countercurrent chromatography (HCCC) for the recovery of antioxidant phenolics and the isolation of alkaloids from Siberian barberry herb. // *Food Chem.* 2016. V. 203. P. 394–401.
117. *Abbet C., Slacanin I., Hamburger M., Potterat O.* Comprehensive analysis of *Phyteuma orbiculare* L., a wild Alpine food plant. // *Food Chem.* 2013. V. 136. P. 595–603.
118. *Kind T., Fiehn O.* Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. Article 105.
119. *Tchoumtchoua J., Njamien D., Mbanya J.C., Skaltsounis A.-L., Halabalaki M.* Structure-oriented UHPLC-LTQ Orbitrap-based approach as a dereplication strategy

for the identification of isoflavonoids from *Amphimas pterocarpoides* crude extract. // J. Mass Spectrom. 2013. V. 48, № 5. P. 561–575.

120. Pan H.-Q., Yao C.-L., Yang W.-Z., Yao S., Huang Y., Zhang Y., Wu W., Guo D. An enhanced strategy integrating offline two-dimensional separation and step-wise precursor ion list-based raster-mass defect filter: Characterization of indole alkaloids in five botanical origins of *Uncariae Ramulus Cum Unicis* as an exemplary application. // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1563. P. 124–134.
121. Echavarri-Bravo V., Tinzl M., Kew W., Cruickshank F., Mackay C.L., Clarke D.J., Horsfall L.E. High resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) for the characterisation of enzymatic processing of commercial lignin. // New BIOTECHNOL. 2019. V. 52. P. 1–8.
122. Lee S.M., Kim S.C., Oh J., Kim J.H., Na M.K. 20(R)-Ginsenoside Rf: A new ginsenoside from red ginseng extract. // Phytochem. Lett. 2013. V. 6, № 4. P. 620–624.
123. Ganzera M., Sturm S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis-An update covering 2011-2016. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. V. 147. P. 211–233.
124. Emhofer L., Himmelsbach M., Buchberger W., Klampfl C.W. High-performance liquid chromatography drift-tube ion-mobility quadrupole time-of-flight/mass spectrometry for the identity confirmation and characterization of metabolites from three statins (lipid-lowering drugs) in the model plant cress (*Lepidium sativum*) after uptake from water. // J. Chromatogr. A. 2019. V. 1592. P. 122–132.
125. Stark T.D., Ranner J., Stiglbauer B., Weiss P., Stark S., Balemba O.B., Hofmann T. Construction and application of a database for a five-dimensional identification of natural compounds in *Garcinia* species by means of UPLC-ESI-TWIMS-TOF-MS: Introducing gas phase polyphenol conformer drift time distribution intensity ratios. // J. Agric. Food Chem. 2019. V. 673, № 3. P. 975–985.
126. Ridder L., van der Hoof J.J.J., Verhoeven S., de Vos R.C.H., Bino R.J., Vervoort J. Automatic chemical structure annotation of an LC-MSn based metabolic profile from green tea. // Anal. Chem. 2013. V. 85, № 12. P. 6033–6040.
127. Gymez-Romero M., Zurek G., Schneider B., Baessmann C., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. // Food Chem. 2011. V. 124. P. 379–386.

128. *Pitzer E., Masselot A., Colinge J.* Assessing peptide de novo sequencing algorithms performance on large and diverse data sets. // *Proteomics*. 2007. V. 7, № 17. P. 3051–3054.
129. *Chen T., Kao M.Y., Tepel M., Rush J., Church G.M.* A dynamic programming approach to de novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. // *J. Comput. Biol.* 2001. V. 8, № 3. P. 325–337.
130. *Böcker S., Rasche F.* Towards de novo identification of metabolites by analyzing tandem mass spectra. // *Bioinformatics*. 2008. V. 24, № 16. P. i49–i55.
131. *Rojas-Cherto M., Peironcelly J.E., Kasper P.T., van der Hooft J.J.J., de Vos R.C.H., Vreeken R., Hankemeier T., Reijmers T.* Metabolite identification using automated comparison of high-resolution multistage mass spectral trees. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84, № 13. P. 5524–5534.
132. *Ju F., Zhang J., Bu D., Li Y., Zhou J., Wang H., Wang Y., Huang C., Sun S.* De novo glycan structural identification from mass spectra using tree merging strategy. // *Comput. Biol. Chem.* 2019. V. 80. P. 217–224.
133. *Zanatta A.C., Mari A., Masullo M., Carlos I.Z., Vilegas W., Piacente S., Campaner dos Santos L.* Chemical metabolome assay by high-resolution Orbitrap mass spectrometry and assessment of associated antitumoral activity of *Actinocephalus divaricatus*. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018. V. 32, № 3. P. 241–250.
134. *Nikolic D.* CASMI 2016: A manual approach for dereplication of natural products using tandem mass spectrometry. // *Phytochem. Lett.* 2017. V. 21. P. 292–296.
135. *Smallcombe S.H., Patt S.L., Keiffer P.A.* Wet solvent suppression and its application to LC-NMR and high-resolution NMR spectroscopy. // *J. Magn. Reson., Ser. A.* 1995. V. 117, № 2. P. 295–303.
136. *Constant H.L., Slowing K., Graham J.G., Pezzuto J.M., Cordell G.A., Beecher C.W.W.* A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis. // *Phytochem. Anal.* 1997. V. 8, № 4. P. 176–180.
137. *Tatsis E.C., Boeren S., Exarchou V., Troganis A.N., Vervoort J., Gerothanassis I.P.* Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. // *Phytochemistry*. 2007. V. 68, № 3. P. 383–393.

138. Zhou Y., Han Q.-B., Song J.-Z., Qiao C.-F., Xu H.-X. Characterization of polyprenylated xanthenes in *Garcinia xipshuanbannaensis* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1206. P. 131–139.
139. Gobbo-Neto L., Lopes N.P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian *Arnica Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56, № 4. P. 1193–1204.
140. O'Donnell F., Ramachandran V.N., Smyth T.J.P., Smyth W.F., Brooks P. An investigation of bioactive phytochemicals in the leaves of *Melicope vitiflora* by electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 634, № 1. P. 115–120.
141. Smyth T.J.P., Ramachandran V., Brooks P., Smyth W.F. Investigation of antibacterial phytochemicals in the bark and leaves of *Ficus coronata* by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (HPLC-ESI-MSn) and ESI-MSn. // Electrophoresis. 2012. V. 33, № 4. P. 713–718.
142. Cakova V., Urbain A., Antheaume C., Rimlinger N., Wehrung P., Bonte F., Lobstein A. Identification of phenanthrene derivatives in *Aerides rosea* (Orchidaceae) using the combined systems HPLC-ESI-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV-NMR. // Phytochem. Anal. 2015. V. 26, № 1. P. 34–39.
143. Qiu S., Yang W.-Z., Shi X.-J., Yao C.-L., Yang M., Liu X., Jiang B.-H., Wu W.-Y., Guo D. A green protocol for efficient discovery of novel natural compounds: Characterization of new ginsenosides from the stems and leaves of *Panax ginseng* as a case study. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 893. P. 65–76.
144. Shan J., Zhao X., Shen C., Ji J., Xu J., Wang S., Xie T., Tong W. Liquid chromatography coupled with linear ion trap hybrid Orbitrap mass spectrometry for determination of alkaloids in *Sinomenium acutum*. // Molecules. 2018. V. 23, № 7. Article 1634.
145. Yao C.-L., Pan H.-Q., Wang H., Yao S., Yang W.-Z., Hou J.-J., Jin Q.-H., Wu W.-Y., Guo D. Global profiling combined with predicted metabolites screening for discovery

- of natural compounds: Characterization of ginsenosides in the leaves of *Panax notoginseng* as a case study. // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1538. P. 34–44.
146. Zhang H., Jiang J.-M., Zheng D., Yuan M., Wang Z.-Y., Zhang H.-M., Zheng C.-W., Xia L.-B., Xu H.-X. A multidimensional analytical approach based on time-decoupled online comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of ginsenosides from white and red ginsengs. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 163. P. 24–33.
 147. Wang Z.-Z., Jones A.D. Profiling of stable isotope enrichment in specialized metabolites using liquid chromatography and multiplexed nonselective collision-induced dissociation. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86, № 21. P. 10600–10607.
 148. Song F., Liu Z., Liu S., Cai Z. Differentiation and identification of ginsenoside isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 531. P. 69–77.
 149. Andrews G., Dean R., Hawkrigde A., Muddiman D. Improving proteome coverage on a LTQ-orbitrap using design of experiments. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011. V. 22, № 1. P. 773–783.
 150. Awad H., Das U., Dimmock J., El-Aneed A. Establishment of tandem mass spectrometric fingerprint of novel antineoplastic curcumin analogues using electrospray ionization. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2015. V. 29, № 14. P. 1307–1316.
 151. Braunberger C., Zehl M., Conrad J., Fischer S., Adhami H.-R., Beifuss U., Krenn L. LC-NMR, NMR, and LC-MS identification and LC-DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltate*. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2013. V. 932. P. 111–116.
 152. Wolfender J.-L., Ndjoko K., Hostettmann K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1000. P. 437–455.
 153. Seger C., Sturm S., Stuppner H. Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques - state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations. // *Nat. Prod. Rep.* 2013. V. 30, № 7. P. 970–987.

154. *Exarchou V., Godejohann M., van Beek T.A., Gerothanassis I.P., Vervoort J.* LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. // *Anal. Chem.* 2003. V. 75, № 22. P. 6288–6294.
155. *McAlpine J.B., Chen S.-N., Kutateladze A., MacMillan J.B., Appendino G., Barison A., Beniddir M.A., Biavatti M.W., Bluml S., Boufridi A., Butler M.S., et al.* The value of universally available raw NMR data for transparency, reproducibility, and integrity in natural product research. // *Nat. Prod. Rep.* 2019. V. 36, № 1. P. 35–107.
156. *Pereira F., Aires-de-Sousa J.* Computational methodologies in the exploration of marine natural product leads. // *Mar. Drugs.* 2018. V. 16, № 7. Article 236.
157. *Mathon C., Duret M., Kohler M., Edder P., Bieri S., Christen P.* Multi-targeted screening of botanicals in food supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. // *Food Chem.* 2013. V. 138. P. 709–717.
158. *Cheng Q., Shou L., Chen C., Shi S., Zhou M.* Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry for identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated weight-loss drugs in plant dietary supplements. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017. V. 1064. P. 92–99.
159. *Zhu C.S., Li X.P., Zhang B., Lin Z.-J.* Quantitative analysis of multi-components by single marker—a rational method for the internal quality of Chinese herbal medicine. // *Integr. Med. Res.* 2017. V. 6, № 1. P. 1–11.
160. *Lai C.-J.-S., Tan T., Zeng S.-L., Dong X., Liu E.-H., Li P.* Relative quantification of multi-components in *Panax notoginseng* (Sanqi) by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry using mobile phase compensation. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 150–156.
161. *Ning Z., Liu Z., Song Z., Zhao S., Dong Y., Zeng H., Shu Y., Lu C., Liu Y., Lu A.* A single marker choice strategy in simultaneous characterization and quantification of multiple components by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry (RRLC-QqQ-MS). // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. V. 124. P. 174–188.
162. *Lee D.-Y., Kim J.K., Shrestha S., Seo K.-H., Lee Y.-H., Noh H.-J., Kim G.-S., Kim Y.-B., Kim S.-Y., Baek N.-I.* Quality evaluation of *Panax ginseng* roots using a rapid

- resolution LC-QTOF/MS-based metabolomics approach. // *Molecules*. 2013. V. 18, № 12. P. 14849–14861.
163. *Lee J.W., Choi B.-R., Kim Y.-C., Choi D.J., Lee Y.-S., Kim G.-S., Baek N.-I., S.-Y. Kim, Lee D.Y.* Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS. // *Molecules*. 2017. V. 22, № 12. Article 2147.
 164. *Liao D., Jia C., Sun P., Qi J., Li X.* Quality evaluation of *Panax quinquefolium* from different cultivation regions based on their ginsenoside content and radioprotective effects on irradiated mice. // *Sci. Rep-UK*. 2019. V. 9. P. 1079.
 165. *Xia P., Bai Z., Liang T., Yang D., Liang Z., Yan X., Liu Y.* High-performance liquid chromatography based chemical fingerprint analysis and chemometric approaches for the identification and distinction of three endangered *Panax* plants in Southeast Asia. // *J. Sep. Sci.* 2016. V. 39, № 20. P. 3880–3888.
 166. *Huang B.-M., Chen T.-B., Xiao S.-Y., Zha Q.-L., Luo P., Wang Y.-P., Cui X.-M., Liu L., Zhou H.* A new approach for authentication of four ginseng herbs and their related products based on the simultaneous quantification of 19 ginseng saponins by UHPLC-TOF/MS coupled with OPLS-DA. // *RSC Adv.* 2017. V. 7, № 74. P. 46839–46851.
 167. *Li W.-K., Gu C.-A., Zhang H.-J., Awang D.V.C., Fitzloff J.F., Fong H.H.S., van Breemen R.B.* Use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to distinguish *Panax ginseng* C. A. Meyer (Asian Ginseng) and *Panax quinquefolius* L. (North American Ginseng). // *Anal. Chem.* 2000. V. 72, № 21. P. 5417–5422.
 168. *De Vos R.C.H., Moco S., Lommen A., Keurentjes J.J.B., Bino R.J., Hall R.D.* Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 778–791.
 169. *El-Elmat T., Figueroa M., Ehrmann B.M., Cech N.B., Pearce C.J., Oberlies N.H.* A high-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. // *J. Nat. Prod.* 2013. V. 76, № 9. P. 1709–1716.
 170. *Yang J., Liang Q., Wang M., Jeffries C., Smithson D., Tu Y., Boulos N., Jacob M.R., Shelat A.A., Wu Y., et al.* UPLC-MS-ELSD-PDA as a powerful dereplication tool to

- facilitate compound identification from small molecule natural product libraries. // *J. Nat. Prod.* 2014. V. 77, № 4. P. 902–909.
171. *Tu Y., Jeffries C., Ruan H., Nelson C., Smithson D., Shelat A.A., Brown K.M., Li X.-C., Hester J.P., Smillie T., et al.* Automated high-throughput system to fractionate plant natural products for drug discovery. // *J. Nat. Prod.* 2010. V. 73, № 4. P. 751–754.
 172. *Moco S., Bino R.J., Vorst O., Verhoeven H.A., de Groot J., van Beek T.A., Vervoort J., de Vos C.H.R.* Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. // *Plant Physiol.* 2006. V. 141, № 4. P. 1205–1218.
 173. *Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G.* XCMS: processing, mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78, № 3. P. 779–787.
 174. *Zhang T., Omar R., Siheri W., Al Mutairi S., Clements C., Fearnley J., Edrada-Ebela R., Watson D.* Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. // *Talanta.* 2014. V. 120. P. 181–190.
 175. *Balogh M.P.* Spectral interpretation, part II: Tools of the trade. // *LCGC North America.* 2006. V. 24, № 8. P. 762–769.
 176. *Chen W., Gong L., Guo Z., Wang W., Zhang H., Liu X., Yu S., Xiong L., Luo J.* A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics. // *Mol. Plant.* 2013. V. 6, № 6. P. 1769–1780.
 177. *von Roepenack-Lahaye E., Degenkolb T., Zerjeski M., Franz M., Roth U., Wessjohann L., Schmidt J., Scheel D., Clemens S.* Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. // *Plant Physiol.* 2004. V. 134, № 2. P. 548–559.
 178. *Funari C.S., Eugster P.J., Martel S., Carrupt P.-A., Wolfender J.-L., Silva D.H.S.* High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian Lippia species. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1259. P. 167–178.

179. *Johnson S.R., Lange B.M.* Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. V. 3. Article 22.
180. *Barbosa A.J.M., Roque A.C.A.* Free Marine natural products databases for biotechnology and bioengineering. // *Biotechnol. J.* 2019. V. 14, № 11. P. 1800607.
181. *Arji G., Safdari R., Rezaeizadeh H., Abbassian A., Mokhtaran M., Hossein Ayati M.* A systematic literature review and classification of knowledge discovery in traditional medicine. // *Comput. Meth. Programs Biomed.* 2019. V. 168. P. 39–57.
182. *Tsugawa H.* Advances in computational metabolomics and databases deepen the understanding of metabolisms. // *Curr. Opin. Biotech.* 2018. V. 54. P. 10–17.
183. *Hartmann T.* From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. // *Phytochemistry.* 2007. V. 68, № 22-24. P. 2831–2846.
184. *Dictionary of Natural Products 27.2: Электронный ресурс.* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, an Informa Group company, – Режим доступа: <http://dnp.chemnetbase.com/> (дата обращения 01.01.2023).
185. *Shinbo Y., Nakamura Y., Altaf-Ul-Amin M., et al.* KNApSACk: a comprehensive species–metabolite relationship database. // *Plant metabolomics biotechnology in agriculture and forestry plant metabolomics: eds. K. Saito, R.A. Dixon, L. Willmitzer.* Berlin: Springer, 2006. P. 165–181.
186. *Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42, № D1. P. D199–D205.
187. *Tolstikov V.V., Lommen A., Nakanishi K., Tanaka N., Fiehn O.* Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. // *Anal. Chem.* 2003. V. 75, № 23. P. 6737–6740.
188. *Vorsta O., de Vos C.H.R., Lommen A., Staps R.V., Visser R.G.F., Bino R.J., Hall R.D.* A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC–MS-derived metabolic profiles. // *Metabolomics.* 2005. V. 1. P. 169–180.
189. *Sawada Y., Akiyama K., Sakata A., Kuwahara A., Otsuki H., Sakurai T., Saito K., Hirai M.Y.* Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for

- elucidating metabolite accumulation patterns in plants. // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50, № 1. P. 37–47.
190. *Nielsen K.F., Smedsgaard J.* Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1002. P. 111–136.
 191. *Zeng Z.D., Liu X.Y., Dai W.D., Yin P.Y., Zhou L.N., Huang Q., Lin X., Xu G.* Ion fusion of high-resolution LC–MS-based metabolomics data to discover more reliable biomarkers. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86, № 8. P. 3793–3800.
 192. *Qiu S., Yang W.-Z., Yao C.-L., Qiu Z.-D., Shi X.-J., Zhang J.-X., Hou J.-J, Wang Q.-R., Wu W.-Y., Guo D.* Nontargeted metabolomic analysis and “commercial-homophyletic” comparison-induced biomarkers verification for the systematic chemical differentiation of five different parts of *Panax ginseng*. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1453. P. 78–87.
 193. *Lehner S.M., Neumann N.K.N., Sulyok M., Lemmens M., Krska R., Schuhmacher R.* Evaluation of LC-high-resolution FT-Orbitrap MS for the quantification of selected mycotoxins and the simultaneous screening of fungal metabolites in food. // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2011. V. 28, № 10. P. 1457–1468.
 194. *Wu S., Tohge T., Cuadros-Inostroza A., Tong H., Tenenboim H., Kooke R., Meret M., Keurentjes J.B., Nikoloski Z., Fernie A.R., Willmitzer L., Brotman Y.* Mapping the Arabidopsis metabolic landscape by untargeted metabolomics at different environmental conditions. // *Mol. Plant.* 2018. V. 11, № 1. P. 118–134.
 195. *Giavalisco P., Li Y., Matthes A., Eckhardt A., Hubberten H.-M., Hesse H., Segu S., Hummel J., Köhl K., Willmitzer L.* Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. // *Plant J.* 2011. V. 68, № 2. P. 364–376.
 196. *Cao W., Yi L., Cao J., Hu S.S., Li P.* Recent advances in the methodology and application for the metabolism of phytochemical compounds - An update covering the period of 2009-2014. // *Curr. Drug. Metab.* 2014. V. 15, № 10. P. 966–87.
 197. *Causon T.J., Hann S.* Review of sample preparation strategies for MS-based metabolomic studies in industrial biotechnology. // *Analyt. Chim. Acta.* 2016. V. 938. P. 18–32.

198. *Mansson M., Phipps R.K., Gram L., Munro M.H., Larsen T.O., Nielsen K.F.J.* Explorative solid-phase extraction (E-SPE) for accelerated microbial natural product discovery, dereplication, and purification. // *Nat. Prod.* 2010. V. 73, № 6. P. 1126–1132.
199. *Chetwynd A.J., David A.* A review of nanoscale LC-ESI for metabolomics and its potential to enhance the metabolome coverage. // *Talanta.* 2018. V. 182. P. 380–390.
200. *Izumi Y., Okazawa A., Bamba T., Kobayashi A., Fukusaki E.* Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 648, № 2. P. 215–225.
201. *t'Kindt R., Storme M., Deforce D., van Bocxlaer J.* Evaluation of hydrophilic interaction chromatography versus reversed-phase chromatography in a plant metabolomics perspective. // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31, № 9. P. 1609–1614.
202. *Tolstikov V.V., Fiehn O.* Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. // *Anal. Biochem.* 2002. V. 301, № 2. P. 298–307.
203. *Last R.L., Jones A.D., Shachar-Hill Y.* Towards the plant metabolome and beyond. // *Nat. Rev.* 2007. V. 8. P. 167–174.
204. *Goodacre R., York E.V., Heald J.K., Scott I.M.* Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry, // *Phytochemistry.* 2003. V. 62, № 6. P. 859–863.
205. *Sawaya A.C.H.F., Tomazela D.M., Cunha I.B.S., Bankova V.S., Marcucci M.C., Custodio A.R., Eberlin M.N.* Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. // *Analyst.* 2004. V. 129. P. 739–744.
206. *Dieckmann R., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., von Döhren H.* Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V.67. P. 539–548.
207. *Zeng S., Wang L., Chen T., Wang Y., Mo H., Qu H.* Direct analysis in real time mass spectrometry and multivariate data analysis: A novel approach to rapid identification of analytical markers for quality control of traditional Chinese medicine preparation.// *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 733. P. 38–47.

208. *Shan S.-M., Luo J.-G., Huang F., Kong L.-Y.* Chemical characteristics combined with bioactivity for comprehensive evaluation of *Panax ginseng* C.A. Meyer in different ages and seasons based on HPLC-DAD and chemometric methods. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. V. 89. P. 76–82.
209. *Nazarenko D.V., Kharyuk P.V., Oseledets I.V., Rodin I.A., Shpigun O.A.* Machine learning for LC–MS medicinal plants identification. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2016. V. 156. P. 174–180.
210. *Kharyuk P., Nazarenko D., Oseledets I., Rodin I., Shpigun O., Tsitsilin A., Lavrentyev M.* Employing fingerprinting of medicinal plants by means of LC-MS and machine learning for species identification task. // *Sci. Rep-UK.* 2018. V. 8. Article 17053.
211. *Ducruix C., Vailhen D., Werner E., Fievet J.B., Bourguignon J., Tabet J.-C., Ezan E., Junot C.* Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2008. V. 91, № 1. P. 67–77.
212. *He Z., Qi R.Z., Yu W.* Bioinformatic analysis of data generated from MALDI mass spectrometry for biomarker discovery. // *Top. Curr. Chem.* 2013. V. 331. P. 193–210.
213. *Ng K.-M., Liang Z., Lu W., Tang H.-W., Zhao Z., Che C.-M., Cheng Y.-C.* In vivo analysis and spatial profiling of phytochemicals in herbal tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79, № 7. P. 2745–2755.
214. *Wang Y., Li C., Huang L., Liu L., Guo Y., Mac L., Liu S.* Rapid identification of traditional Chinese herbal medicine by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 845. P. 3 70–76.
215. *Aranibar N., Singh B.K., Stockton G.W., Ott K.-H.* Automated mode-of-action detection by metabolic profiling. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2001. V. 286, № 1. P. 150–155.
216. *Johnson H.E., Gilbert R.J., Winson M.K., Goodacre R., Smith A.R., Rowland J.J., Hall M.A., Kell D.B.* Explanatory analysis of the metabolome using genetic programming of simple, interpretable rules. // *Genet. Prog. Evol. Mach.* 2000. V. 1. P. 243–258.
217. *Mazina J., Vaher M., Kuhtinskaja M., Poryvkina L., Kaljurand M.* Fluorescence, electrophoretic and chromatographic fingerprints of herbal medicines and their comparative chemometric analysis. // *Talanta.* 2015. V. 139. P. 233–246.

218. Bro R. PARAFAC. Tutorial and applications. // Chemom. Intell. Lab. Syst. 1997. V. 38, № 2. P. 149–171.
219. Idborg H., Edlund P.-O., Jacobsson S.P. Multivariate approaches for efficient detection of potential metabolites from liquid chromatography/mass spectrometry data. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004. V. 18, № 9. P. 944–954.
220. Ceulemans E., van Mechelen I., Leenen I. Tucker3 hierarchical classes analysis. // Psychometrika. 2003. V. 68. P. 413–433.
221. Rudnev V.A., Boichenko A.P., Karnozhytskiy P.V. Classification of gasoline by octane number and light gas condensate fractions by origin with using dielectric or gas-chromatographic data and chemometrics tools. // Talanta. 2011. V. 84, № 3. P. 963–970.
222. Kerr G., Ruskin H.J., Crane M., Doolan P. Techniques for clustering gene expression data. // Comput. Biol. Med. 2008. V. 38. P. 283–293.
223. D'Auria J.C., Gershenzon J. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8, № 3. P. 308–316.
224. Springfield E.P., Eagles P.K.F., Scott G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. // J. Ethnopharmacol. 2005. V. 101, № 1-3. P. 75–83.
225. World Health Organization (WHO). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicines. Geneva: World Health Organization, 2000. 74 p.
226. Bourcier S., Hoppilliard Y. Use of diagnostic neutral losses for structural information on unknown aromatic metabolites: an experimental and theoretical study. // Rapid. Commun. Mass Spectrom. 2009. V. 23, № 1. P. 93–103.
227. Mohamed R., Gremaud E., Tabet J.-C., Guy P.A. Mass spectral characterization of ergot alkaloids by electrospray ionization, hydrogen/deuterium exchange, and multiple stage mass spectrometry: usefulness of precursor ion scan experiments. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20, № 19. P. 2787–2799.
228. Rochfort S.J., Trenerry V.C., Imsic M., Panozzo J., Jones R. Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSⁿ fragmentation. // Phytochemistry. 2008. V. 69, № 8. P. 1671–1679.

229. Zhu M., Ma L., Zhang D., Ray K., Zhao W., Humphreys W.G., Skiles G., Sanders M. Zhang H. Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data. // *Drug Metab. Dispos.* 2006. V. 34, № 10. P. 1722–1733.
230. Bateman K.P., Castro-Perez J., Wrona M., Shockcor J.P., Yu K., Oballa R., Nicoll-Griffith D.A. MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. V. 21, № 9. P. 1485–1496.
231. Xie T., Liang Y., Hao H., A J., Xie L., Gong P., Dai C., Liu L, Kang A., Zheng X., Wang G. Rapid identification of ophiopogonins and ophiopogonones in *Ophiopogon japonicus* extract with a practical technique of mass defect filtering based on high resolution mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1227. P. 234–244.
232. Prabodha Ekanayaka E.A., Celiz M.D., Jones A.D. Relative mass defect filtering of mass spectra: A path to discovery of plant specialized metabolites. // *Plant Physiol.* 2015. V. 167, № 4. P. 1221–1232.
233. Xu H., Niu H., He B., Cui C., Li Q., Bi K. Comprehensive qualitative ingredient profiling of Chinese herbal formula Wu-Zhu-Yu decoction via a mass defect and fragment filtering approach using high resolution mass spectrometry. // *Molecules.* 2016. V. 21, № 5. Article 664.
234. Paguigan N.D., El-Elimat T., Kao D., Raja H.A., Pearce C.J., Oberlies N.H. Enhanced dereplication of fungal cultures via use of mass defect filtering. // *J. Antibiot.* 2017. V. 70. P. 553–561.
235. Chen J., Shi Z., Song Y., Guo X., Zhao M., Tu P., Jiang Y. Source attribution and structure classification-assisted strategy for comprehensively profiling Chinese herbal formula: Ganmaoling granule as a case. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1464. P. 102–114
236. Tian J.-X., Tian Y., Xu L., Zhang J., Lua T., Zhang Z.-J. Characterisation and identification of dihydroindole-type alkaloids from processed Semen *Strychni* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation ion trap time-of-flight mass spectrometry. // *Phytochem. Anal.* 2014. V. 25, № 1. P. 36–44.
237. Zhang J.-Y., Wang F., Zhang H., Lu J.-Q., Qiao Y.-J. Rapid identification of polymethoxylated flavonoids in traditional chinese medicines with a practical

- strategy of stepwise mass defect filtering coupled to diagnostic product ions analysis based on a hybrid LTQ-Orbitrap mass spectrometer. // *Phytochem. Anal.* 2014. V. 25, № 5. P. 405–414.
238. *Li C.-Y., Song H.-T., Liu S.-J., Wang Q., Dai G.-L., Ding X.-S., Ju W.Z.* Systematic screening and characterization of astragalosides in an oral solution of *Radix Astragali* by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and Peakview software. // *J. Sep. Sci.* 2016. V. 39, № 6. P. 1099–1109.
 239. *Geng P., Sun J., Zhang M., Li X., Harnly J.M., Chen P.* Comprehensive characterization of C-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMSn and mass defect filtering. // *J. Mass. Spectrom.* 2016. V. 51, № 10. P. 914–930.
 240. *Ren D., Ran L., Yang C., Xu M., Yi L.* Integrated strategy for identifying minor components in complex samples combining mass defect, diagnostic ions and neutral loss information based on ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry platform: *Folium Artemisiae Argyi* as a case study. // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1550. P. 35–44.
 241. *Zhou W., Shan J., Meng M.* A two-step ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry with mass defect filtering method for rapid identification of analogues from known components of different chemical structure types in *Fructus Gardeniae*-*Fructus Forsythiae* herb pair extract and in rat's blood. // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1563. P. 99–123.
 242. *Lai C.-J.-S., Tan T., Zeng S.-L., Qi L.-W., Liu X.-G., Dong X., Li P., Liu E.-H.* An integrated high resolution mass spectrometric data acquisition method for rapid screening of saponins in *Panax notoginseng* (Sanqi). // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 109. P. 184–191.
 243. *Pan H.-Q., Yang W.-Z., Zhang Y.-B., Yang M., Feng R.-H., Wu W.-Y., Guo D.-A.* An integrated strategy for the systematic characterization and discovery of new indole alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* by UHPLC/DAD/LTQ-Orbitrap-MS. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 6057–6070.
 244. *Watrous J., Roach P., Alexandrov T., Heath B.S., Yang J.Y., Kersten R.D., van der Voort M., Pogliano K., Gross H., Raaijmakers J.M. et al.* Mass spectral molecular

- networking of living microbial colonies. // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 2012. V. 109, № 26. P. E1743–E1752.
245. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.K. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 828–837.
 246. Gaudencio S.P., Pereira F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. // *Nat. Prod. Rep.* 2015. V. 32, № 6. P. 779–810.
 247. Olivon F., Allard P.-M., Koval A., Righi D., Genta-Jouve G., Neyts J., Apel C., Pannecouque C., Nothias L.F., et al. Bioactive natural products prioritization using massive multiinformational molecular networks. // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12, № 10. P. 2644–2651.
 248. Allard P.-M., Peresse T., Bisson J., Gindro K., Marcourt L., Pham V.C., Roussi F., Litaudon M., Wolfender J.C. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88, № 6. P. 3317–3323.
 249. Crusemann M., O'Neill E.C., Larson C.B., Melnik A.V., Floros D.J., da Silva R.R., Jensen P.R., Dorrestein P.C., Moore B.S. Prioritizing natural product diversity in a collection of 146 bacterial strains based on growth and extraction protocols. // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80, № 3. P. 588–597.
 250. Floros D.J., Jensen P.R., Dorrestein P.C., Koyama N. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. // *Metabolomics*. 2016. V. 12. P. 145–156.
 251. Naman C.B., Rattan R., Nikoulina S.E., Lee J., Miller B.W., Moss N.A., Boudreau P.D., Debonsi H.M., Valeriote F.A., et al. Integrating molecular networking and biological assays to target the isolation of a cytotoxic cyclic octapeptide, samoamide A, from an American Samoan marine cyanobacterium. // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80, № 3. P. 625–633.
 252. Garg N., Kapono C.A., Lim Y.W., Koyama N., Vermeij M.J.A., Conrad D., Rohwer F., Dorrestein D.C. Mass spectral similarity for untargeted metabolomics data analysis of complex mixtures. // *Int. J. Mass. Spec.* 2015. V. 377. P. 719–727.

253. Yang J.Y., Sanchez L.M., Rath C.M., Liu X., Boudreau P.D., Bruns N., Glukhov E., Wodtke A. de Felicio R., et al. Molecular networking as a dereplication strategy. // J. Nat. Prod. 2013. V. 76, № 9. P. 1686–1699.
254. Klitgaard A., Nielsen J.B., Frandsen R.J.N., Andersen M.R., Nielsen K.F. Combining stable isotope labeling and molecular networking for biosynthetic pathway characterization. // Anal. Chem. 2015. V. 87, № 13. P. 6520–6526.
255. Voss R.F. Fractals in nature: From characterization to simulation. // The science of fractal images: eds. H.-O. Peitgen, D. Saupe. New York: Springer-Verlag Inc., 1988. P. 21–70.
256. Periat A., Guillarme D., Veuthey J.-L., Boccard J., Moco S., Barron D., Grand-Guillaume Perrenoud A.J. Optimized selection of liquid chromatography conditions for wide range analysis of natural compounds. // J. Chromatogr. A. 2017. V. 1504. P. 91–104.
257. Feng G.-F., Zheng Y., Sun Y., Liu S., Pi Z.-F., Song F.-R., Liu Z.-Q. A targeted strategy for analyzing untargeted mass spectral data to identify lanostane-type triterpene acids in *Poria cocos* by integrating a scientific information system and liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with ion mobility spectrometry. // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1033. P. 87–99.
258. Chen Y.-H., Liu Y.-H., Wu Y.-J., Chen C.-C. Metabolomic studies using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry to discover quality markers for Oriental Beauty (Dongfang Meiren) tea. // Food Nutr. Sci. 2014. V. 5, № 9. P. 823–834.
259. Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M. Features of respiration and formation of steroidal glycosides in *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture grown in flasks and bioreactors. // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 557–563.
260. Kochkin D.V., Khandy M.T., Zaitsev G.P., Tolkacheva N.V., Shashkov A.S., Titova M.V., Chirva V.Ya., Nosov A.M. Protodioscin in *Dioscorea deltoidea* suspension cell culture. // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52, № 4. P. 664–668.
261. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211309> (дата обращения 06.11.2022)

262. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211325> (дата обращения 06.11.2022)
263. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211418> (дата обращения 06.11.2022)
264. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211435> (дата обращения 06.11.2022)
265. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0155987> (дата обращения 06.11.2022)
266. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0001043> (дата обращения 06.11.2022)
267. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211154> (дата обращения 06.11.2022)
268. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0211217> (дата обращения 06.11.2022)
269. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0001209> (дата обращения 06.11.2022)
270. Серегин А. П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. М.: МГУ, 2022. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/public/item/MW0159653> (дата обращения 06.11.2022)
271. Liu X., Ye W., Mo Z., Yu B., Zhao S., Wu H., Che C., Jiang R., Mak T.C., Hsiao W.L. Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67, № 7. P. 1147–1151.
272. Ky P.T., Huong P.T., My T.K., Anh P.T., Kiem P.V., Minh C.V., Cuong N.X., Thao N.P., Nhiem N.X., Hyun J.H. et al. Phytochemistry dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. // Phytochemistry. 2010. V. 71, № 8–9. P. 994–1001.

273. *Woldemichael G.M., Wink M.* Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49, № 5. P. 2327–2332.
274. *Chen Y., Nose M. O.Y.* Alkaline cleavage of ginsenosides. // *Chem. Pharm. Bull.* 1987. V. 20, № 4. P. 1653–1655.
275. *Cui J.F., Garle M., Lund E., Bjorkhem I., Eneroth P.* Analysis of ginsenosides by Chromatography and mass spectrometry: release of 20 S-protopanaxadiol and 20 S-protopanaxatriol for quantitation. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 210, № 2. P. 411–417.
276. *Cui J.F.* Alkaline cleavage of gypenosides and characterization of dammarane-type aglycones by gas chromatography-mass spectrometry. // *Phytochem. Anal.* 1998. V. 9, № 3. P. 128–133.
277. *Vorst O., Vos C.H.R. de, Lommen A., Staps R. v., Visser R.G.F., Bino R.J., Hall R.D.* A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC–MS-derived metabolic profiles. // *Metabolomics.* 2005. Vol. 1, № 2. P. 169–180.
278. Council of Europe. European Pharmacopoeia 5th edn. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2004. P. 2739–2740.
279. The United States Pharmacopeia 30th edn., Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.
280. Родиолы розовой корневика и корни. // Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 4. Под ред. С.В. Емшанова, О.Г. Потанина, Е.В. Буданова [и др.]. Москва, 2018. С. 6383-6393. ФС 2.5.0036.15. – Режим доступа: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/1201/> (дата обращения 01.01.2023).
281. *Glazowska J., Kaminski M.M., Kaminski M.* Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*). // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41, № 23. P. 4304–4314.
282. *Ganzera M., Yayla Y., Khan I.A.* Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2001. V. 49, № 4. P. 465–467.
283. *Apers S., Naessens T., Van Miert S., Pieters L., Vlietinck A.* Quality control of roots of *Eleutherococcus senticosus* by HPLC. // *Phytochem. Anal.* 2005. V. 16, № 1. P. 55–60.

284. *van Beek T.A., Wintermans M.S.* Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. // J. Chromatogr. A. 2001. V. 930, № 1–2. P. 109–117.
285. *Wang R, Luo J, Kong L.* Screening of radical scavengers in *Scutellaria baicalensis* using HPLC with diode array and chemiluminescence detection. // J. Sep. Sci. 2012. V. 35, № 17. P. 2223–2227.
286. *Serebryanaya F., Imachueva D.* Hedysarum species from Caucasus. // Legume Crops - Prospects, Production and Uses: ed. M. Hasanuzzaman. London: IntechOpen, 2020. 182 p.
287. *Zhu L., Li B., Liu X., Huang G., Meng X.* Isolation and purification of schisandrol A from the stems of *Schisandra chinensis* and cytotoxicity against human hepatocarcinoma cell lines. // Pharmacogn. Mag. 2015. V. 11, № 41. P. 131–135.
288. *Yang B., Liu P.* Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. // J. Sci. Food Agric. 2012. V. 92, № 8. P. 1578–1590.
289. *Skala E., Kicel A., Olszewska M.A., Kiss A.K., Wysokinska H.* Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. // Biomed. Res. Int. 2015. V. 2015. P. 1–11.
290. *Lech K., Witkos K., Jarosz M.* HPLC–UV–ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort (*Serratula tinctoria* L.). // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406, № 15. P. 3703–3708.
291. *Oboh G., Adebayo A.A., Ademosun A.O.* Phenolic-rich extracts of *Eurycoma longifolia* and *Cylicodiscus gabunensis* inhibit enzymes responsible for the development of erectile dysfunction and are antioxidants. // J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 2018. V. 29, № 6. P. 689–696.
292. *Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A.* Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. // Food Chem. 2004. V. 85, № 2. P. 231–237.
293. *Cáceres S., Zambrano G., Montenegro M., Cáceres A.* Extraction of natural colors with potential industrial application from *Smilax domingensis* rhizome. // Acta Hort. 2014. № 1030. P. 71–75.

294. *Pelozo M.I. de G., Cardoso M.L.C., Mello J.C.P. de.* Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008. V. 51, № 3. P. 447–451.
295. *Uehara A., Akiyama S., Iwashina T.* Foliar flavonoids from *Tanacetum vulgare* var. *boreale* and their geographical variation. // *Nat. Prod. Commun.* 2015. V. 10, № 3. Article 1934578X1501000.
296. *Abou El-Kassem L., Hawas U., Awad H., Taie H.* Flavonoids from the aerial parts of *Eryngium campestre* L. with antioxidant and anti-alzheimer activities. // *Planta Med.* 2013. V. 79, № 13. Article PJ2.
297. *Wu T.-S., Shi L.-S., Kuo S.-C.* Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. // *Phytochemistry.* 1999. V. 50, № 8. P. 1411–1415.
298. *Ali B.H., Wabel N., Blunden G.* Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. // *Phytotherapy Res.* 2005. V. 19, № 5. P. 369–375.
299. *Petrul'ova-Poracka V., Repcak M., Vilkovala M., Imrich J.* Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. // *Food Chem.* 2013. V. 141, № 1. P. 54–59.
300. *Zhu L., Liang Z.-T., Yi T., Ma Y., Zhao Z.-Z., Guo B.-L., Zhang J.-Y., Chen H.-B.* Comparison of chemical profiles between the root and aerial parts from three *Bupleurum* species based on a UHPLC-QTOF-MS metabolomics approach. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2017. V. 17, № 1. Article 305.
301. *Avallone R., Zanolini P., Puia G., Kleinschnitz M., Schreier P., Baraldi M.* Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 59, № 11. P. 1387–1394.
302. *Kaurinovic B., Popovic M., Vlasisavljevic S., Schwartzova H., Vojinovic-Miloradov M.* Antioxidant profile of *Trifolium pratense* L. // *Molecules.* 2012. V. 17, № 9. P. 11156–11172.
303. *Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Romani A.* Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. // *Food Chem.* 2009. V. 114, № 3. P. 765–770.
304. *Vlase L., Benedec D., Hanganu D., Damian G., Csillag I., Sevastre B., Mot A., Silaghi-Dumitrescu R., Tilea I.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities

- and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. // *Molecules*. 2014. V. 19, № 5. P. 5490–5507.
305. Zhang X.-L., Guo Y.-S., Wang C.-H., Li G.-Q., Xu J.-J., Chung H.Y., Ye W.-C., Li Y.-L., Wang G.-C. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. // *Food Chem.* 2014. V. 152. P. 300–306.
 306. Zhang Y., Smuts J.P., Dodbiba E., Rangarajan R., Lang J.C., Armstrong D.W. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60, № 36. P. 9305–9314.
 307. Southwell I.A., Bourke C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 56. № 5. P. 437–441.
 308. Privalova E.G. A few representatives of Asteroidae (Asteraceae) subfamily and Geranium (Geraniaceae) genus in the baikal region (review). // *Pharmacol. Pharm.* 2021. V. 9, № 6. P. 426–440.
 309. Zanolì P., Avallone R., Baraldi M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. // *Fitoterapia*. 2000. V. 71, № S1. P. S117–S123.
 310. Pirvu L., Neagu G., Terchescu I., Albu B., Stefaniu A. Comparative studies of two vegetal extracts from *Stokesia laevis* and *Geranium pratense*: polyphenol profile, cytotoxic effect and antiproliferative activity. // *Open Chem.* 2020. V. 18, № 1. P. 488–502.
 311. Alonso-Esteban J.I., Pinela J., Barros L., Ciric A., Sokovic M., Calhella R.C., Torija-Isasa E., de Cortes Sanchez-Mata M., Ferreira I.C.F.R. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. // *Ind. Crops Prod.* 2019. V. 134. P. 154–159.
 312. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effects in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. // *Anal Chem.* 2003. V. 75, № 13. P. 3019–3030.
 313. De Nicolo A., Cantu M., D'Avolio A. Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. // *Bioanalysis*. 2017. V. 9, № 14. P. 1093–1105.
 314. United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of Compendial Procedures. Volume 34. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2007. p. 794. USP32–NF27.

315. *Mason T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P.* The uses of ultrasound in food technology. // *Ultrason. Sonochem.* 1996. V. 3, № 3. P. 253–260.
316. *Wang M., Tadmor Y., Wu Q.L., Chin C.K., Garrison S.A., Simon J.E.* Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51, № 21. P. 6132–6136.
317. *Chemat F., Grivotto C.* Microwaved-assisted extraction for bioactive compounds. Theory and practice. New York, NY: Springer Science, 2013. 238 p.
318. *Wang L., Weller C.L.* Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. // *Trends Food. Sci. Technol.* 2006. V. 17, № 6. P. 300–312.
319. *Kostova I., Dinchev D.* Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. // *Phytochem. Rev.* 2005 V. 4. P. 111–137.
320. *Hetrick E.M., Kramer T.T., Risley D.S.* Evaluation of a hydrophilic interaction liquid chromatography design space for sugars and sugar alcohols. // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1489. P. 65–74.
321. *Hu X., Fang C., Lu L., Hu Z., Shao Y., Zhu Z.* Determination of soluble sugar profile in rice. // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017. V. 1058. P. 19–23.
322. *Koh D.-W., Park J.-W., Lim J.-H., Yea M.-J., Bang D.-Y.* A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD. // *Food Chem.* 2018. V. 240. P. 694–700.
323. *Karlsson G.* Development and application of methods for separation of carbohydrates by hydrophilic interaction liquid chromatography. // *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications*: eds. P.G. Wang, W. He. Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 491–522.
324. *Little J.L., Cleven C.D., Brown S.D.* Identification of “Known Unknowns” utilizing accurate mass data and chemical abstracts service databases. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011. V. 22, № 2. P. 348–359.
325. *Вершинин В.И., Дерендяев Б.Г., Лебедев К.С.* Компьютерная идентификация органических соединений. М.: Наука, 2002. 182 с.
326. *Киршанский С.П., Молодцов С.Г., Лебедев К.С.* Извлечение структурной информации из масс-спектров с помощью ЭВМ. XII. Генерирование структурных гипотез и их ранжирование на основе результатов работы ИПС. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук.* 1989. № 5. С. 3–10.

327. Choi Y.H., Kinghorn A.D., Shi X., Zhang H., Teo B.K. Abrusoside A: a new type of highly sweet triterpene glycoside. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1989. № 13. P. 887–888.
328. Choi Y.H., Hussain R.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Morton J.F. Abrusosides A-D, four novel sweet-tasting triterpene glycosides from the leaves of *Abrus precatorius*. // J. Nat. Prod. 1989. V. 52, № 5. P. 1118–1127.
329. Kennelly EJ, Cai L, Kim NC, Kinghorn AD. Abrusoside E, a further sweet-tasting cycloartane glycoside from the leaves of *Abrus Precatorius*. // Phytochemistry. 1996. V. 41, № 5. P. 1381–1383.
330. Ставрианиди А.Н. Новые подходы к обнаружению физиологически активных компонентов женьшеня методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата наук / Ставрианиди Андрей Николаевич ; Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. – Москва, 2014. – 179 с.
331. Lau A.J., Seo B.H., Woo S.O., Koh H.L. High-performance liquid chromatographic method with quantitative comparisons of whole chromatograms of raw and steamed *Panax notoginseng*. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1057. P. 141–149.
332. Li L., Zhang J.L., Sheng Y.X., Guo D.A., Wang Q., Guo H.Z. Simultaneous quantification of six major active saponins of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography-UV method. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. V. 38. P. 45–51.
333. In G., Seo H.K., Park H.-W., Jang K.H. A metabolomic approach for the discrimination of red ginseng root parts and targeted validation. // Molecules. 2017. V. 22, № 3. Article 471.
334. Song H.-H., Kim D.-Y., Woo S., Lee H.-K., Oh S.-R. An approach for simultaneous determination for geographical origins of Korean *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS coupled with OPLS-DA models. // J. Ginseng Res. 2013. V. 37, № 3. P. 341–348.
335. Liu J., Liu Y., Zhao L., Zhang Z.-H., Tang Z.-H. Profiling of ginsenosides in the two medicinal *Panax* herbs based on ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization–mass spectrometry. // SpringerPlus. 2016. V. 5, № 1. P. 1770

336. Cui J.F. Identification and quantification of ginsenosides in various commercial ginseng preparations. // Eur. J. Pharm. Sci. 199. V. 3, № 2. P. 77–85.
337. Si W., Yang W., Guo D., Wu J., Zhang J., Qiu S., Yao C., Cui Y., Wu W. Selective ion monitoring of quinochalcone C-glycoside markers for the simultaneous identification of *Carthamus tinctorius* L. in eleven Chinese patent medicines by UHPLC/QTOF MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. V. 2016. V. 117. P. 510–521.
338. Khandy M.T., Titova M.V., Konstantinova S.V., Kochkin D.V., Ivanov I.M., Nosov A.M. Formation of protodioscin and deltoside isomers in suspension cultures of Nepal Yam (*Dioscorea deltoidea* Wall.) cells. // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52, № 6. P. 657–662.
339. Falev D.I., Ulyanovskii N.V., Ovchinnikov D.V., Faleva A.V., Kosyakov D.S. Screening and semi-quantitative determination of pentacyclic triterpenoids in plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in precursor ion scan mode. // *Phytochem Anal.* 2020. V. 32, № 3. P. 252–261.
340. Montoro P., Maldini M., Russo M., Postorino S., Piacente S., Pizza C. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. V. 54, № 3. P. 535–544.
341. Liu Y., Yang J., Cai Z. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs *Panax ginseng* and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 41, № 5. P. 1642–1647.
342. Ye M., Liu S.H., Jiang Z.L., Lee Y.S., Tilton R., Cheng Y.C. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007. V. 21, № 22. P. 3593–3607.
343. Jo E.H., Kim S.H., Ra J.C., Kim S.R., Cho S.D., Jung J.W., Yang S.R., Park J.S., Hwang J.W., Aruoma O.I., et al. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: Induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. // Cancer Lett. 2005. V. 230, № 2. P. 239–247.
344. Zhang Q., Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). // J Chromatogr. A. 2009. V. 1216. P. 1954–1969.

345. Montoro P., Maldini M., Russo M., Postorino S., Piacente S., Pizza C. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. V. 54. P. 535–544.
346. Li F., Liu B., Li T., Wu Q., Xu Z., Gu Y., Li W., Wang P., Ma T., Lei H. Review of constituents and biological activities of triterpene saponins from *Glycyrrhizae radix et rhizoma* and Its solubilization characteristics. // Molecules. 2020. V. 25, № 17. Article 3904.
347. Woldegiorgis A.Z., Abate D., Haki G.D., Ziegler G.R. LC-MS/MS Based Metabolomics to Identify Biomarkers Unique to *Laetiporus sulphureus*. // Int. J. Nut. Food Sci. 2015. V. 4, №. 2. P. 142–153.
348. Zhou W., Xie M.-F., Zhang X.-Y., Liu T.-T., Yu Y.-J., Duan G.-L. Improved liquid chromatography fingerprint of fat-soluble *Radix isatidis* extract using multi-wavelength combination technique. // J. Sep. Sci. 2011. V. 34. P. 1123–1132.
349. Wang Y., Li B.H., Ni Y.N., Kokot S. Multi-wavelength high-performance liquid chromatography: An improved method for analysis of complex substances such as *Radix Paeoniae* herbs. // Chemom. Intell. Lab. Syst. 2014. V. 130. P. 159–165.
350. Li W., Deng Y., Dai R., Yu Y., Saeed M.K., Li L., Meng W., Zhang X. Chromatographic fingerprint analysis of *Cephalotaxus sinensis* from various sources by high-performance liquid chromatography–diodearray detection–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. V. 45. P. 38–46.
351. Zhang L., Zhang Z., Luo Q., Lu H., Liang Y. Evaluation and prediction of the antioxidant activity of *Epimedium* from multi-wavelength chromatographic fingerprints and chemometrics. Anal. Methods. 2014. V. 6. P. 1036–1043.
352. Guizellinia F.C., Marcheafave G.G., Rakocovic M., Bruns R.E., Scarminio I.S., Soares P.K. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. // Food Res. Int. 2018. V. 113. P. 9–17.
353. Soares P.K., Marcheafave G.G., Gomes A.A., Scarminio I.S., Bruns R.E. Mixture design PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprints of fractionated organic and basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. // Chromatographia. 2018. V. 81. P. 1189–1200.
354. Khakimov B., Amigo J.M., Bak S., Engelsen S.B. Plant metabolomics: Resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography–mass spectrometry profiles

- of complex plant extracts using multi-way decomposition methods. // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1266. P. 84–94.
355. *Amigo J.M., Popielarz M.J., Callejón R.M., Morales M.L., Troncoso A.N., Petersen M.A., Toldam-Andersen T.B.* Comprehensive analysis of chromatographic data by using PARAFAC2 and principal components analysis. // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. P. 4422–4429.
 356. Bro R. Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1999. V. 46. P. 133–147.
 357. *Gong F., Wang B.-T., Chau F.-T., Liang Y.-Z.* Data preprocessing for chromatographic fingerprint of herbal medicine with chemometric approaches. // *Analyt. Let.* 2005. V. 38, № 14. P. 2475–2492.
 358. Bro R. Kiers H.A.L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. // *J. Chemometrics*. 2003. V. 17, № 5. P. 274–286.
 359. *Wagstaff K., Cardie C., Rogers S., Schroedl S.* Constrained k-means clustering with background knowledge. // *Proc. Int. Conf. Mach. Learn.* 2001. V. 2001. P. 577–584.
 360. *Li S.P., Qiao C.F., Chen Y.W., Zhao J., Cui X.M., Zhang Q.W., Liu X.M., Hu D.J.* A novel strategy with standardized reference extract qualification and single compound quantitative evaluation for quality control of *Panax notoginseng* used as a functional food. // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1313. P. 302–307.
 361. *Wang Z.M., Gao H.M., Fu X.T., Wang W.H.* Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine. // *Zhong. Zhong Yao Za Zhi*. 2006. V. 31. P. 1925–1928.
 362. *Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Z.* Phytochemical analysis of *Panax* species: a review. // *J. Ginseng Res.* 2021. V. 45, № 1. P. 1–21.
 363. *Snyder L.R.* Classification of the solvent properties of common liquids. // *J. Chromatogr. Sci.* 1978. V. 16, № 6. P. 223–234.
 364. *Wang C.Q., Jia X.H., Zhu S., Komatsu K., Wang X., Cai S.Q.* A systematic study on the influencing parameters and improvement of quantitative analysis of multi-component with single marker method using notoginseng as research subject. // *Talanta*. 2015. V. 134. P. 587–595.
 365. *Hou J.J., Wu W.Y., Da J., Yao S., Long H.L., Yang Z., Cai L.Y., Yang M., Liu X., Jiang B.H., Guo D.A.* Ruggedness and robustness of conversion factors in method

- of simultaneous determination of multi-components with single reference standard. // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 5618–5627.
366. Yao C., Wang J., Li Z., Qu H., Pan H., Li J., Wei W., Zhang J., Bi Q., Guo D. Characteristic malonyl ginsenosides from the leaves of *Panax notoginseng* as potential quality markers for adulteration detection. // J. Agric. Food Chem. 2021. V. 69, № 16. P. 4849–4857.
367. Health Canada: Электронный ресурс. Monograph: Ginseng, Panax. 2018. – Режим доступа: <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/monoReq.do?id=146> (дата обращения 01.01.2023)
368. Zhang X., Song F., Cui M., Liu Z., Liu S. Investigation of the hydrolysis of ginsenosides by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. // Planta Med. 2007. V. 73, № 11. P. 1225–1229.
369. Zhu S., Zheng Z., Peng H., Sun J., Zhao X.E., Liu H. Quadruplex stable isotope derivatization strategy for the determination of panaxadiol and panaxatriol in foodstuffs and medicinal materials using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. A. 2020. V. 1616. Article 460794.
370. Li C., Wang Z., Li G., Wang Z., Yang J., Li Y., Wang H., Jin H., Qiao J., Wang H., et al. Acute and repeated dose 26-week oral toxicity study of 20(S)-ginsenoside Rg3 in Kunming mice and Sprague-Dawley rats. // J. Ginseng Res. 2018. V. 44, № 2. P. 222–228.
371. Байгильдиев Т.М., Вокуев М.Ф., Орешкин Д.В., Браун А.В., Годовиков И.А., Рыбальченко И.В., Родин И.А. n-Метоксифенацилбромид – универсальный реагент для определения алкилфосфоновых и алкилметилфосфоновых кислот методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектрометрия. 2019. Т. 16, № 3. С. 180–190.
372. Новикова И.В., Новиков Р.И., Смирнова Ж.В., Алексенко С.С., Кондратьев В.Б. Определение аминоспиртов в виде силильных производных с тремя дериватизирующими реагентами методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77, № 12. С. 1102–1111.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Данные ЯМР-спектроскопии.

Таблица П1 – Данные спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C для абрусогенина (10) в пиридине – d_5 ($SF=500.13$ МГц для ^1H , 125.76 МГц for ^{13}C , J в Гц)

Положение	δ_{H} (J в Гц)	δ_{C}	Положение	δ_{H} (J в Гц)	δ_{C}
1	1.97	25.85	15	1.23	35.37
	1.13			1.17	
2	2.09	30.72	16	1.93	27.34
	1.99			1.71	
3	4.76 (1H, дд, $J = 11.97, 4.50$)	75.18	17	2.20 (1H, м)	47.91
4	-	55.25	18	0.95 (3H, с)	18.02
5	2.41 (1H, м)	44.46	19	0.64 (д, $J = 3.97$)	29.74
6	1.64	23.30		0.34 (д, $J = 4.09$)	
	1.11		20	1.49 (1H, м)	39.95
7	1.60	25.50	21	1.02 (3H, д, $J=6.67$)	12.87
	1.22		22	4.49 (1H, дд, $J = 13.27, 3.15$)	80.41
8	1.52 (1H, м)	47.79	23	2.44 (1H, м)	27.76
9	-	26.37		1.98 (1H, м)	
10	-	32.02	24	6.49 (1H, уш. с)	140.63
11	0.84	19.61	25	-	128.00
	0.79		26	-	166.31
12	1.60	32.81	27	1.92 (3H, с)	17.03
	1.56		28	1.69 (3H, с)	10.32
13	-	45.21	29	-	179.8
14	-	48.82	30	0.82 (3H, с)	19.50

Таблица П2 – Данные спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C для ацетилабрусозидов С (9) в ДМСО – d_6 ($SF=500.13$ МГц для ^1H , 125.76 МГц для ^{13}C , J в Гц)

Положение	δ_{H} (J в Гц)	δ_{C}	Положение	δ_{H} (J в Гц)	δ_{C}
1	1.53	29.95	20	1.52	39.9 пер.
	1.23		21	0.91 (3H, c)	13.09
2	1.98	26.15	22	4.41 (1H, дд, $J = 13.32, 2.74$)	80.35
	1.21		23	2.21	27.23
3	3.98	84.47		1.76	
4	-	53.38	24	6.74 (1H, уш. c)	141.63
5	1.72 (дд, $J = 12.2, 3.7$)	44.39	25	-	127.00
6	1.23	22.51	26	-	166.19
	0.87		27	1.77 (3H, c)	17.04
7	1.92	25.15	28	1.04 (3H, c)	10.37
	1.24		29	-	177.80
8	1.52	47.39	30	0.89 (3H, c)	19.47
9	-	19.79	1'	4.32 (д, $J = 7.45$ Гц)	102.47
10	-	32.85	2'	3.24	81.95
11	1.51	25.47	3'	3.36	76.35
	1.19		4'	3.07	70.10
12	1.60	33.04	5'	3.34	73.57
	1.54		6'	4.22 (д, $J = 11.23$ Гц)	63.85
13	-	45.17		4.08 (уш. д, $J = 8.09$ Гц)	
14	-	48.81	1''	4.35 (д, $J = 7.45$ Гц)	104.50
15	1.36	35.51	2''	3.05	75.74
	1.20		3''	3.22	76.83
16	1.85	27.55	4''	3.11	70.40
	1.24		5''	3.14	76.67
17	1.92	47.95	6''	3.75 (д, $J = 11.99$ Гц)	61.50
18	0.94 (3H, c)	17.99		3.49(уш. д, $J = 12.29$ Гц)	
19	0.55 (уш. c)	28.75	1'''	-	170.58
	0.35 (уш. c)		2'''	1.98 (3H, c)	21.02

Chemical shifts (ppm): 179.67, 165.98, 148.98, 140.20, 135.96, 129.16, 127.60, 125.53, 123.56, 116.71, 35.34, 32.78, 31.98, 30.67, 29.74, 27.67, 27.30, 26.33, 25.82, 25.51, 23.32, 55.22, 49.81, 47.85, 45.15, 44.44, 39.80, 35.34, 32.78, 31.98, 30.67, 29.74, 27.67, 27.30, 26.33, 25.82, 25.51, 23.32, 19.60, 19.29, 17.94, 17.04, 12.88, 10.29.

Рисунок П2 – Спектр ^{13}C абрусогенина в ДМСО – d_6 . Bruker Avance – IIIHD – 500, SF=125.75 МГц.

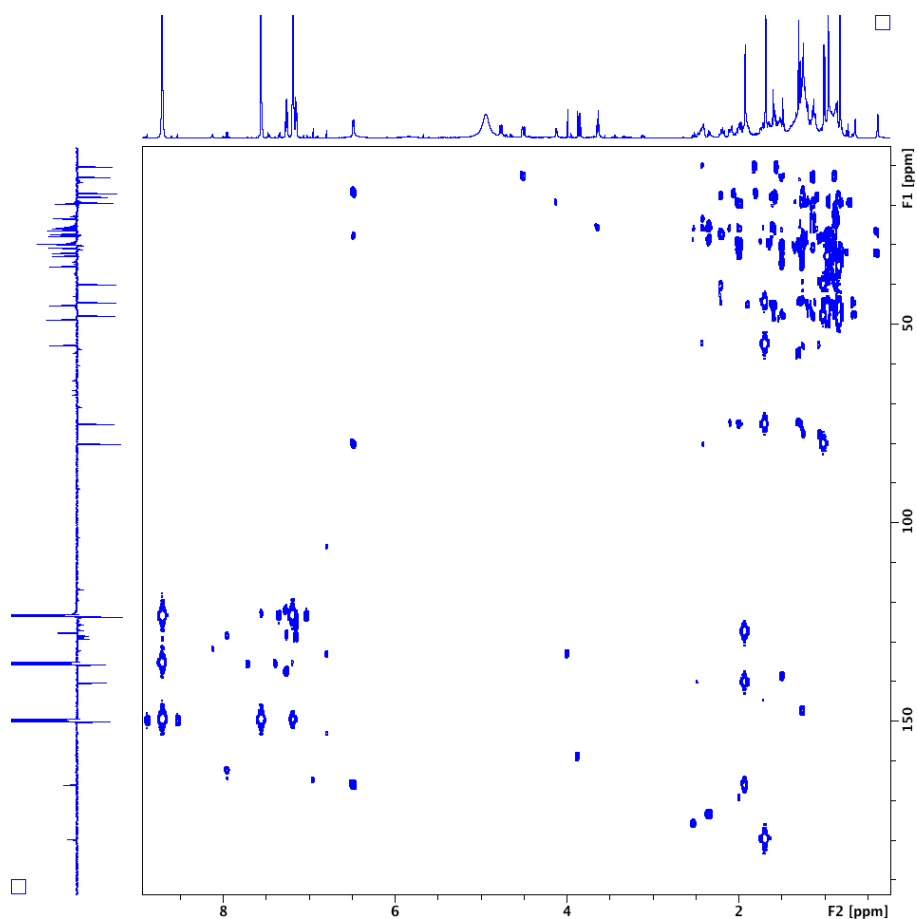


Рисунок ПЗ – НМВС кореляция для абрусогенина в пиридине – d₅. Bruker Avance – ПИИД – 500.

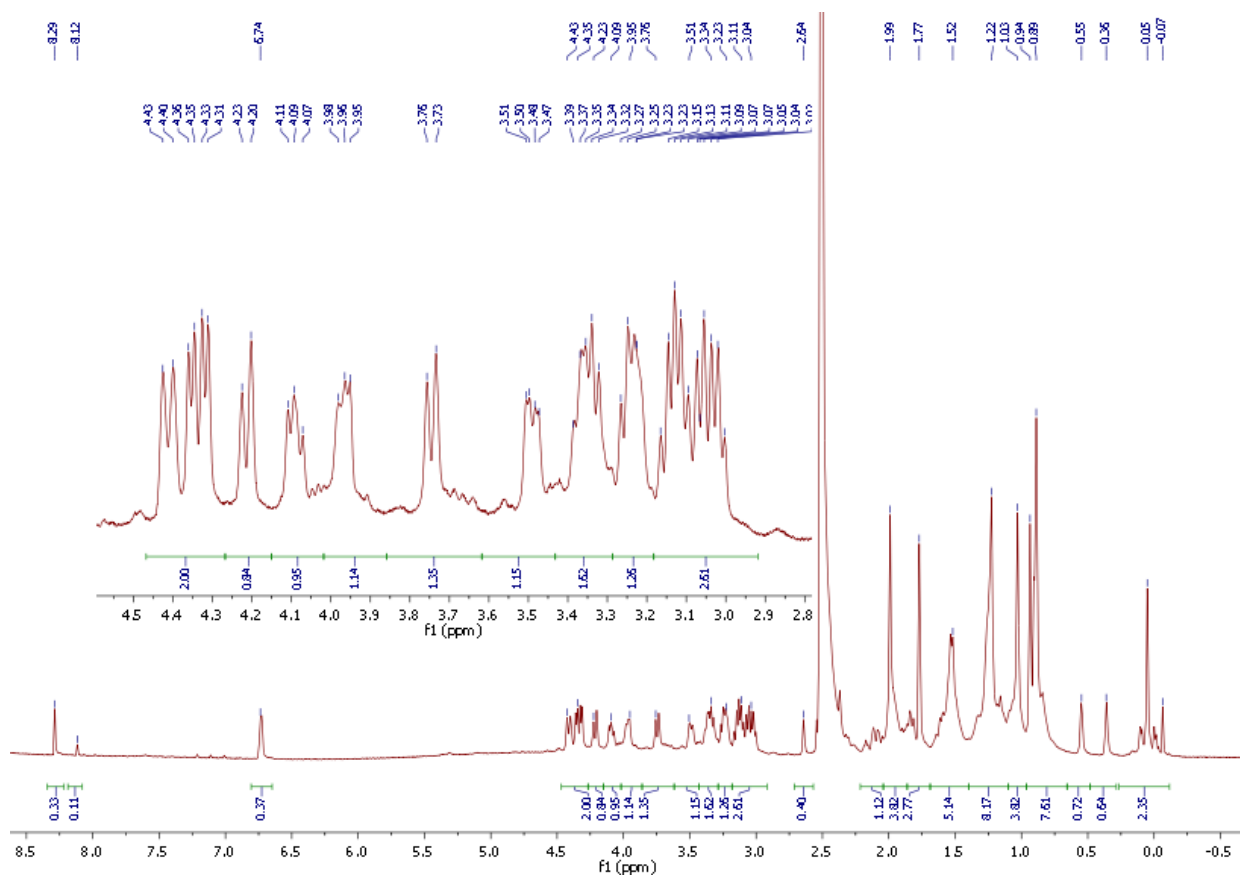


Рисунок П4 – Спектр ПМР ацетилабрусозида С в ДМСО – d₆, Bruker Avance – ПИИД – 500, SF=500.13 МГц.

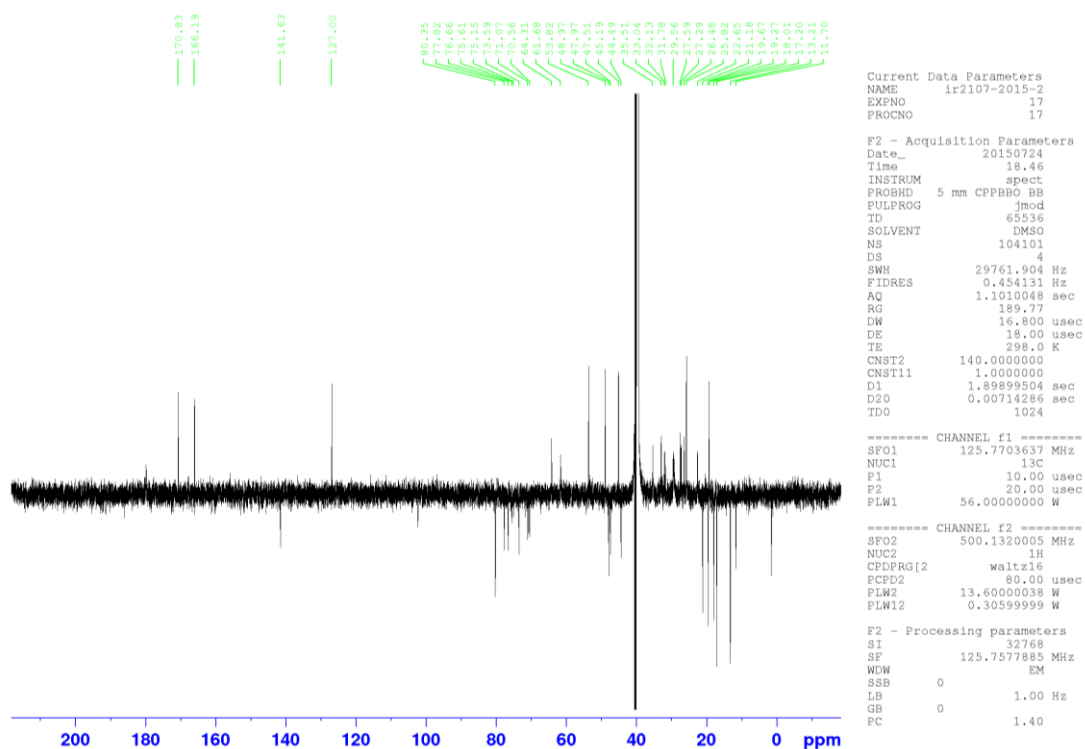


Рисунок П5 – Спектр ЯМР ^{13}C ацетилабрусозид С в ДМСО – d_6 , Bruker Avance – IIIHD – 500, SF=125.75 МГц.

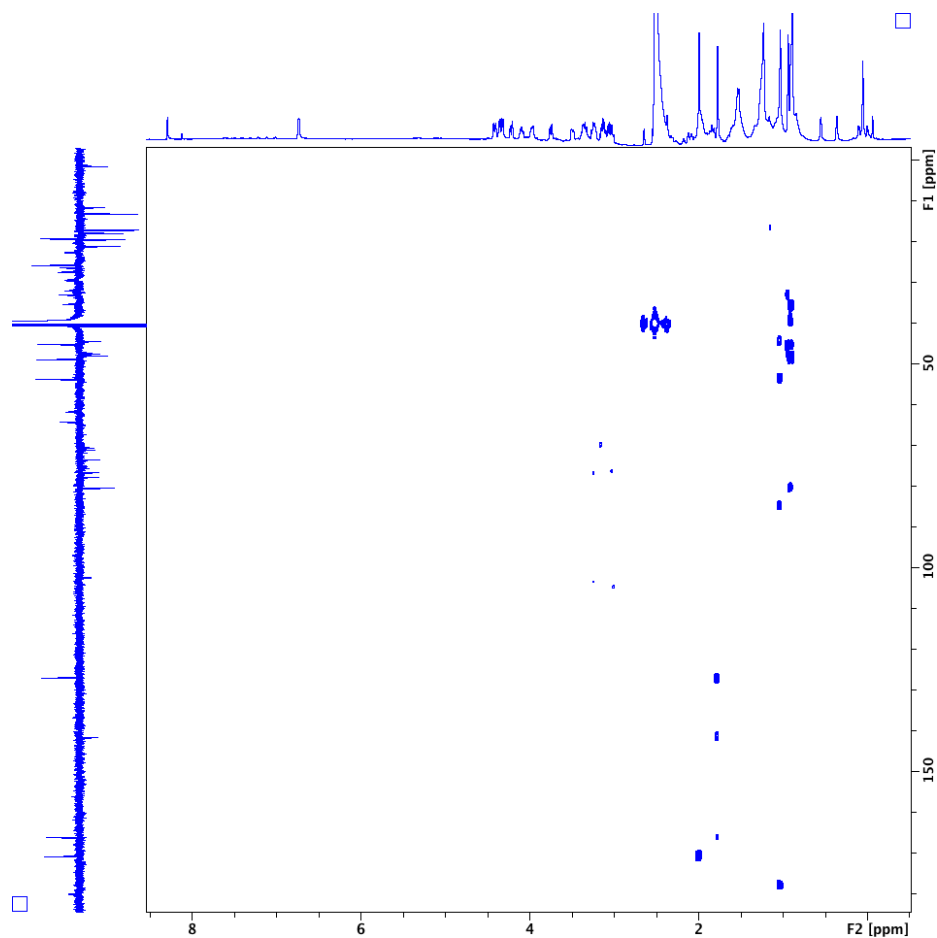


Рисунок П6 – HMBC корреляция ацетилабрусозид С в ДМСО – d_6 , Bruker Avance – IIIHD – 500.

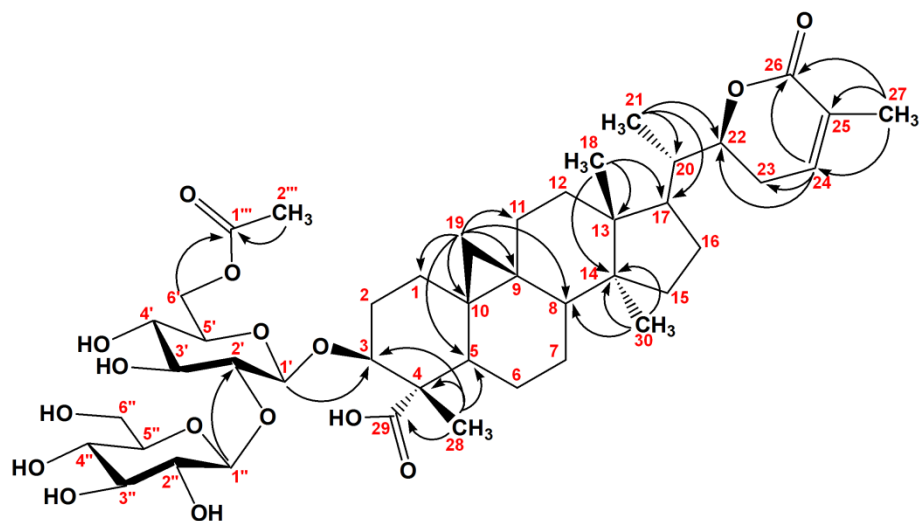


Рисунок П7 – Ключевые HMBC корреляции ацетилабрусозида С.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Паттерны фрагментации сапогенинов.

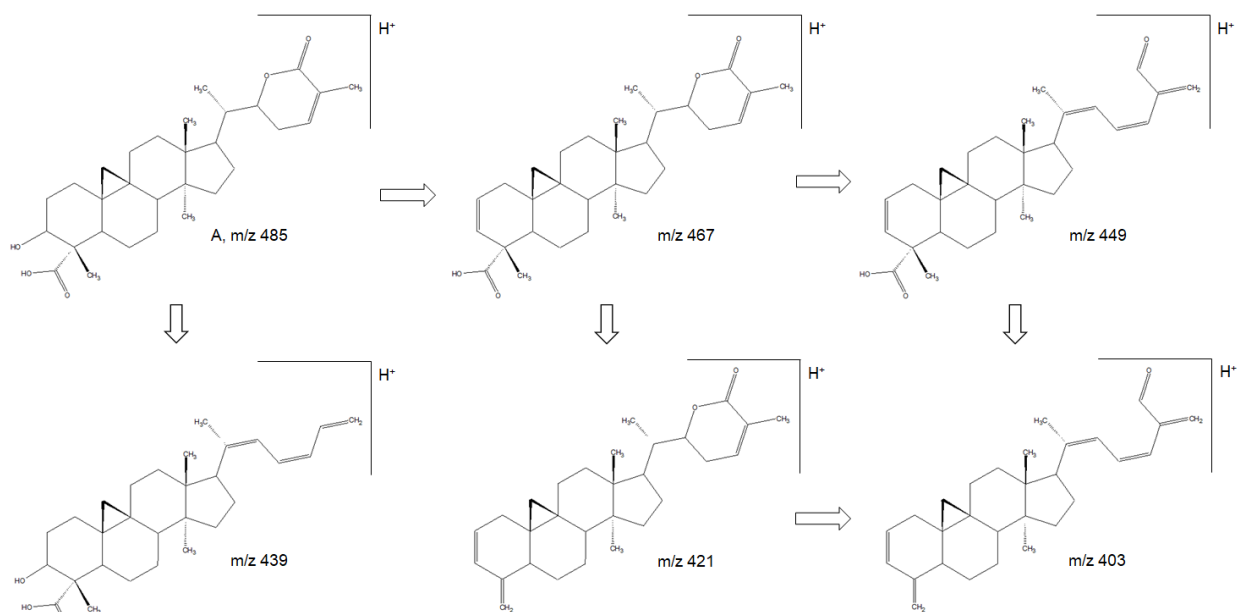


Рисунок П8 – Основные сигналы паттерна фрагментации абрусогенина.

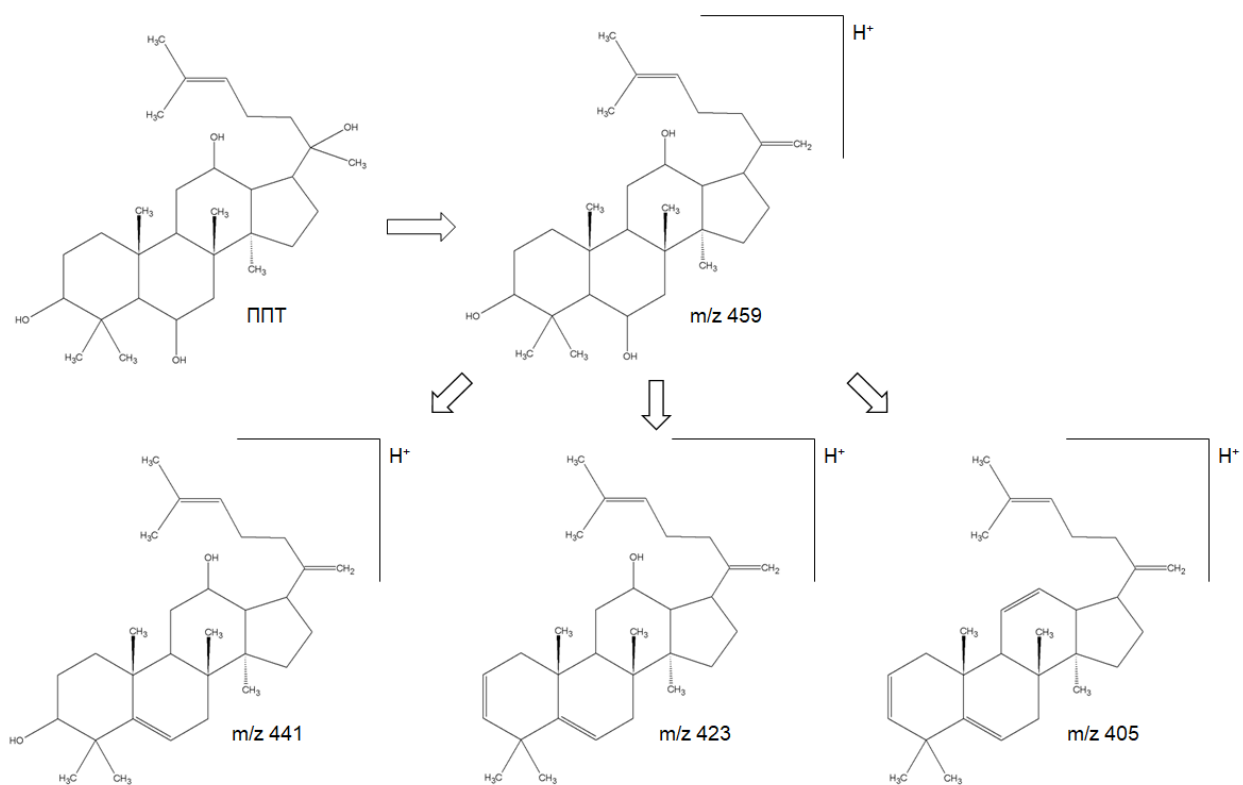


Рисунок П9 – Основные сигналы паттерна фрагментации ППТ сапогенина.

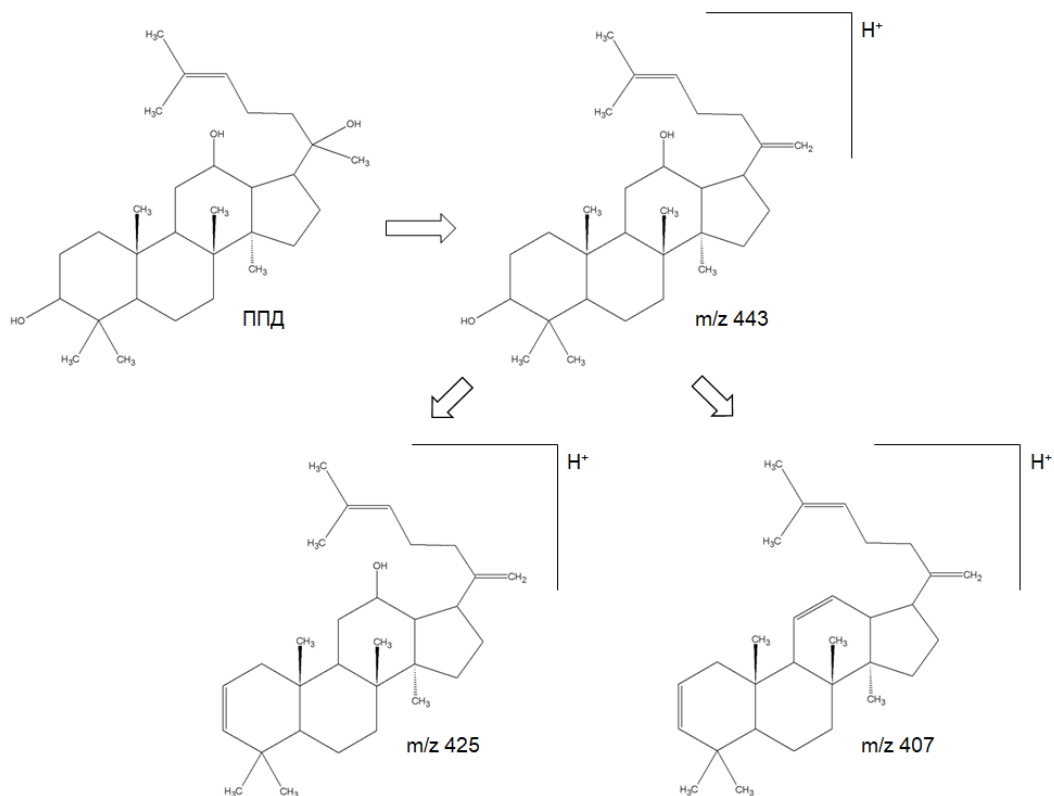


Рисунок П10 – Основные сигналы паттерна фрагментации ППД сапогенина.

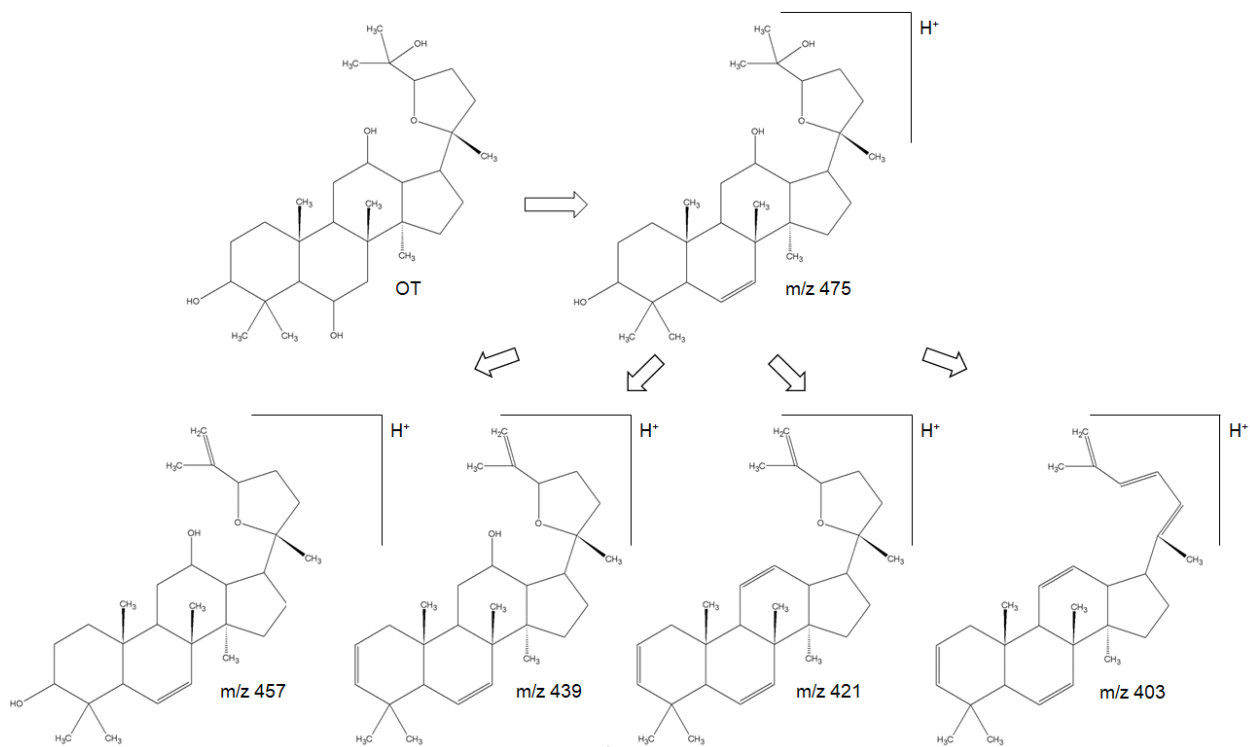


Рисунок П11 – Основные сигналы паттерна фрагментации ОТ сапогенина.

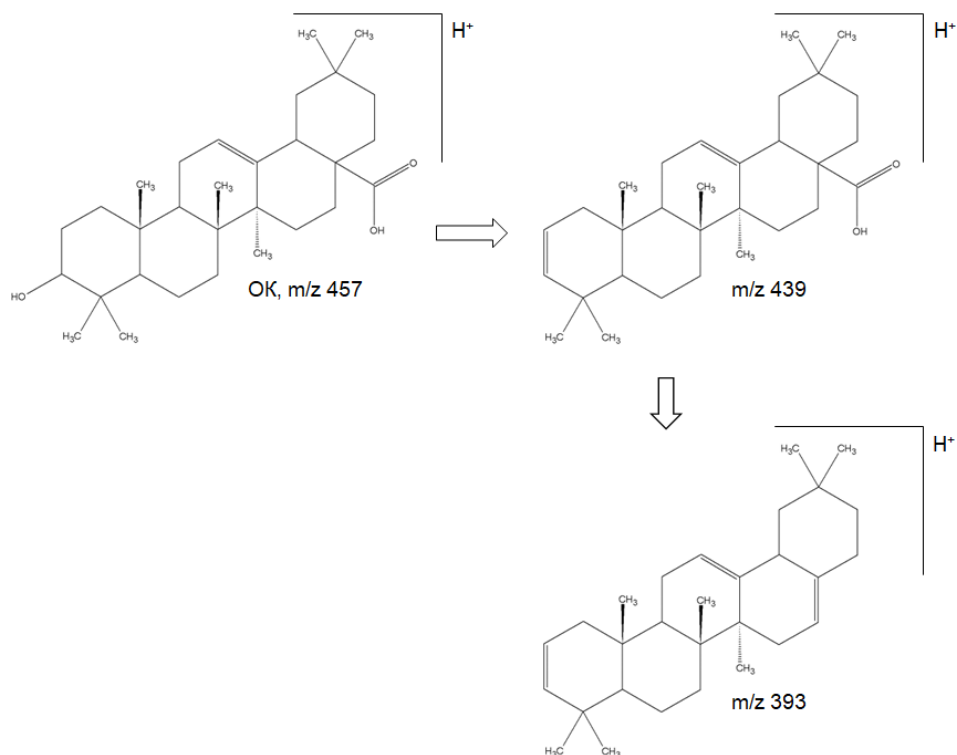


Рисунок П12 – Основные сигналы паттерна фрагментации ОК сапогенина.

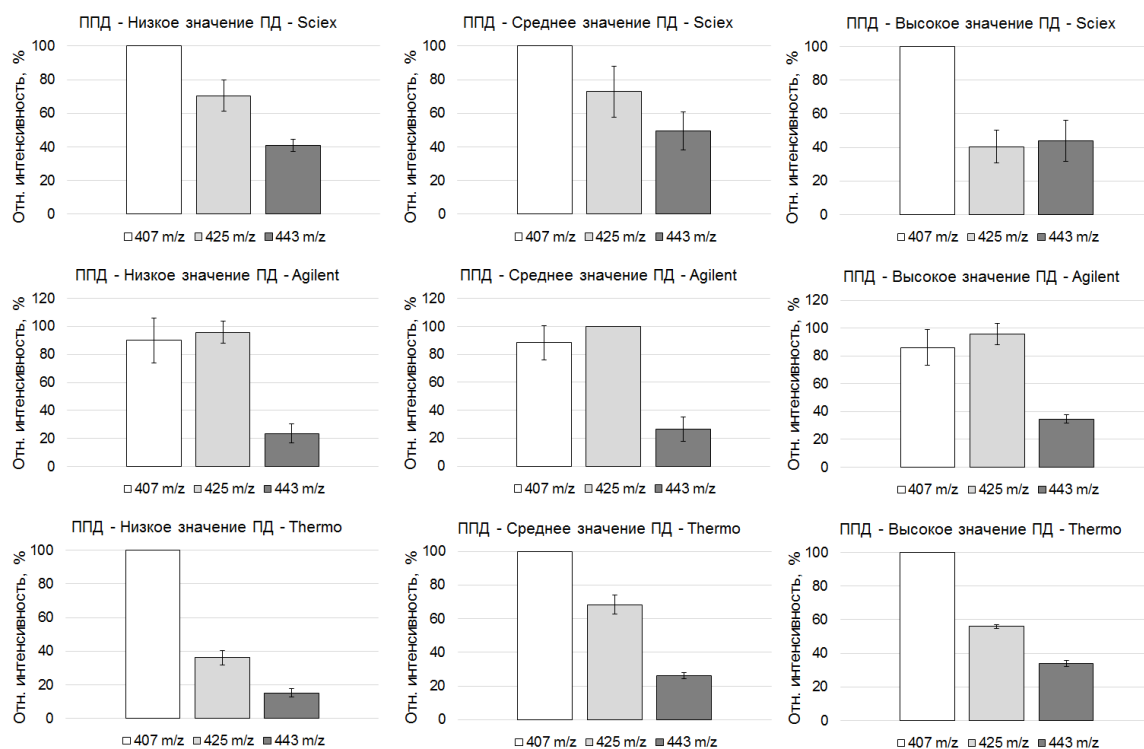


Рисунок П13 – Соотношение сигналов фрагментных ионов сапогенина ППД – типа (белый — m/z 407, серый — m/z 425, чёрный — m/z 443) при низком, среднем и высоком значении величины потенциала декластеризации.

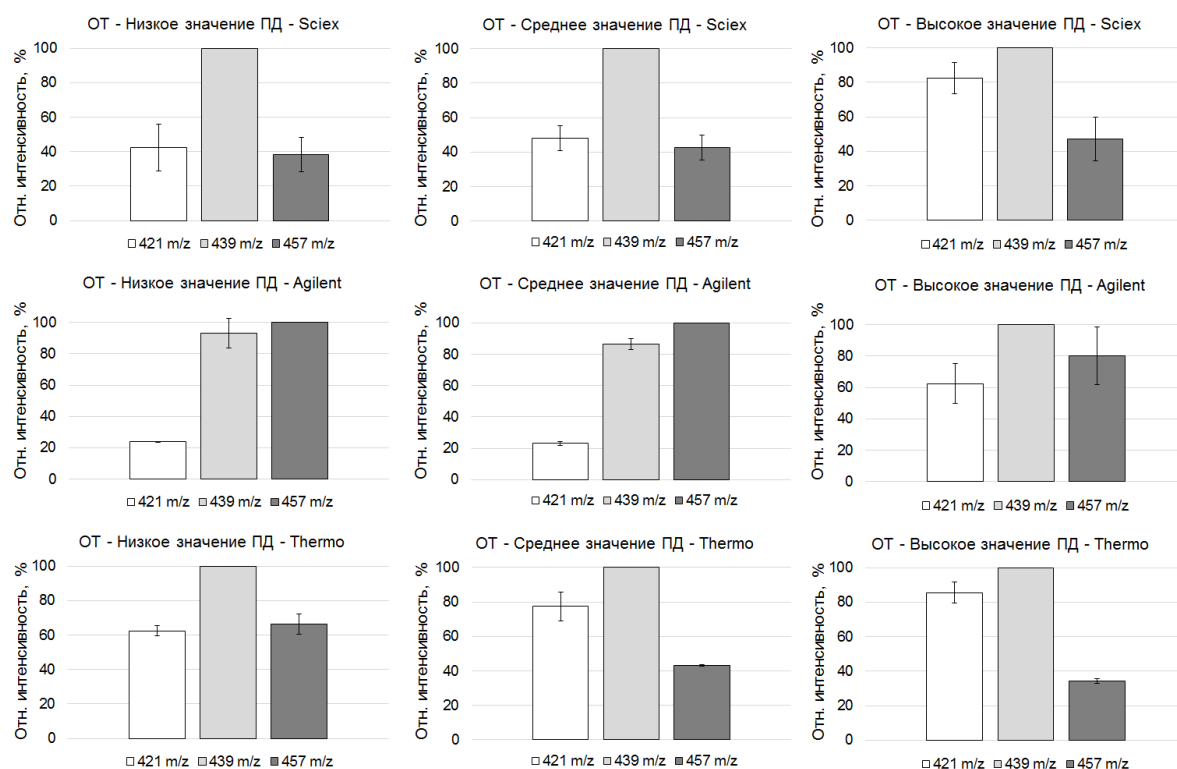


Рисунок П14 – Соотношение сигналов фрагментных ионов сапогенина ОТ – типа (белый — m/z 421, серый — m/z 439, чёрный — m/z 457) при низком, среднем и высоком значении величины потенциала декластеризации.

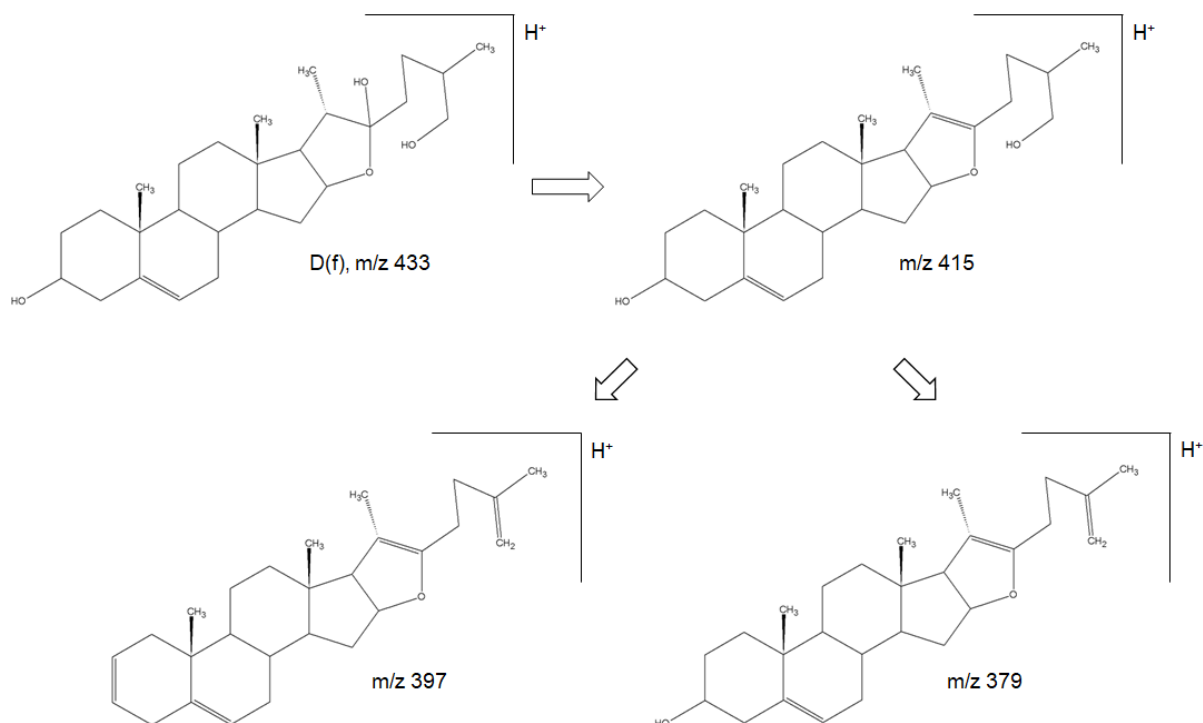


Рисунок П15 – Основные сигналы паттерна фрагментации D(f) сапогенина.

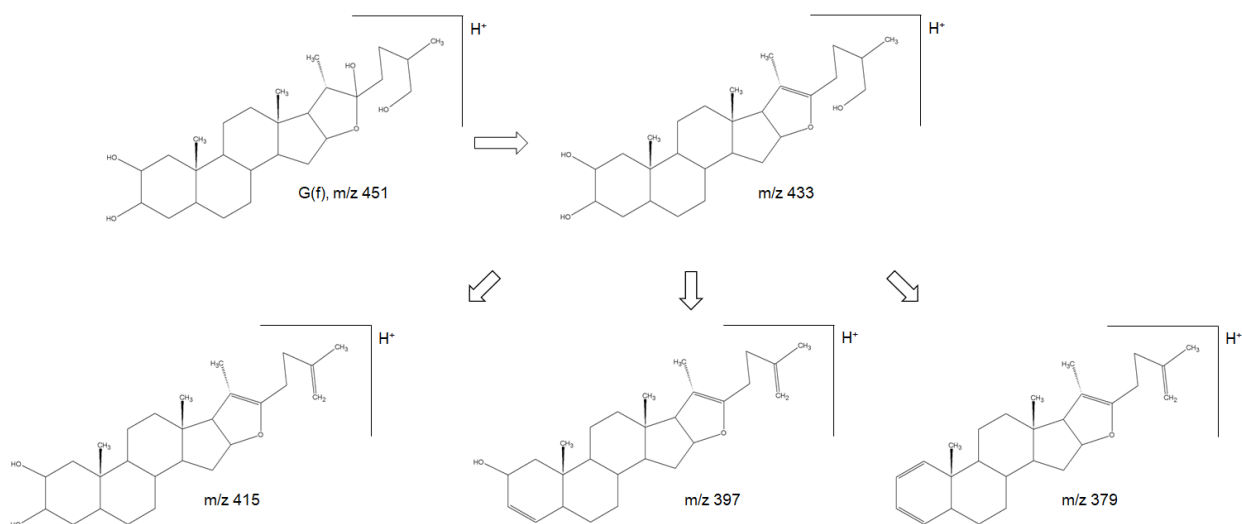


Рисунок П16 – Основные сигналы паттерна фрагментации G(f) сапогенина.

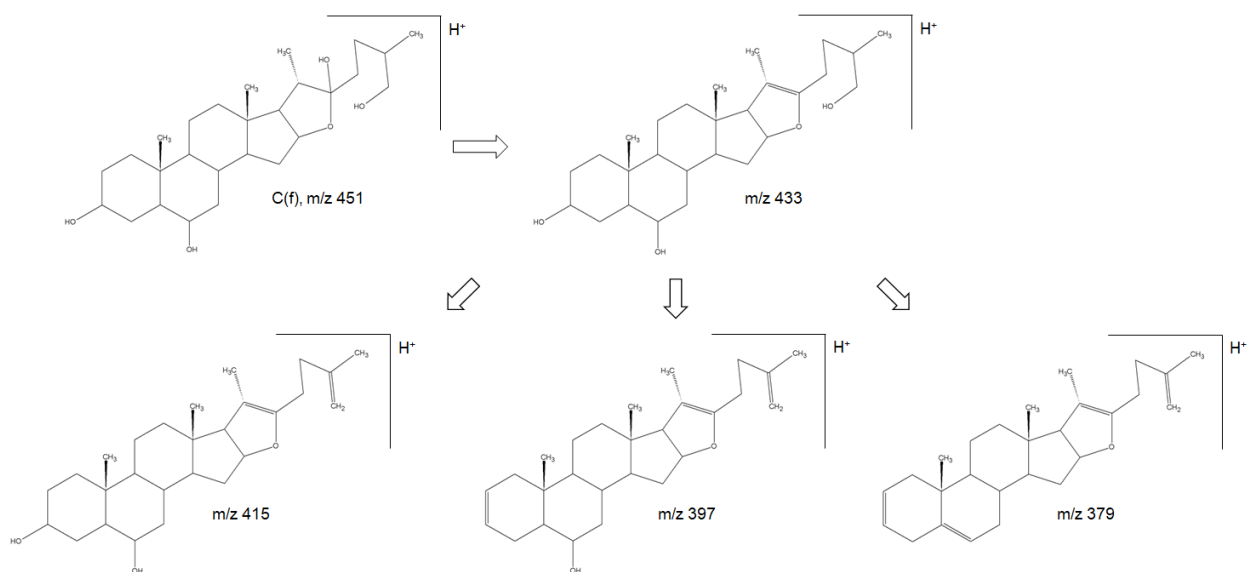


Рисунок П17 – Основные сигналы паттерна фрагментации C(f) сапогенина.

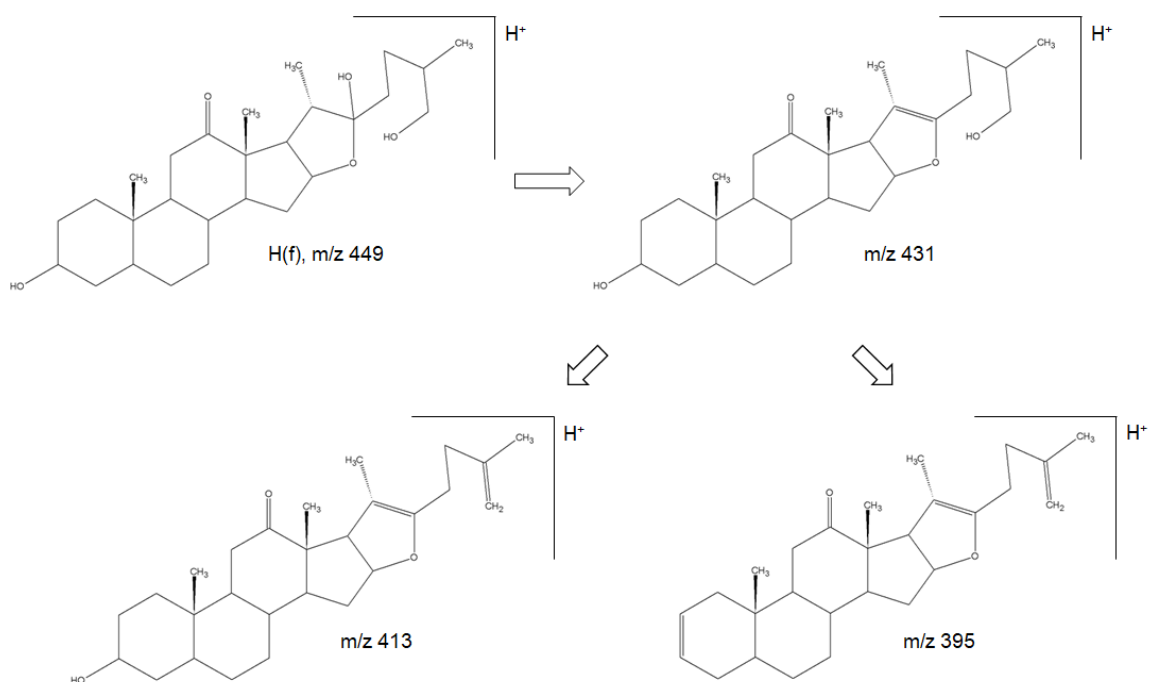


Рисунок П18 – Основные сигналы паттерна фрагментации H(f) сапогенина.

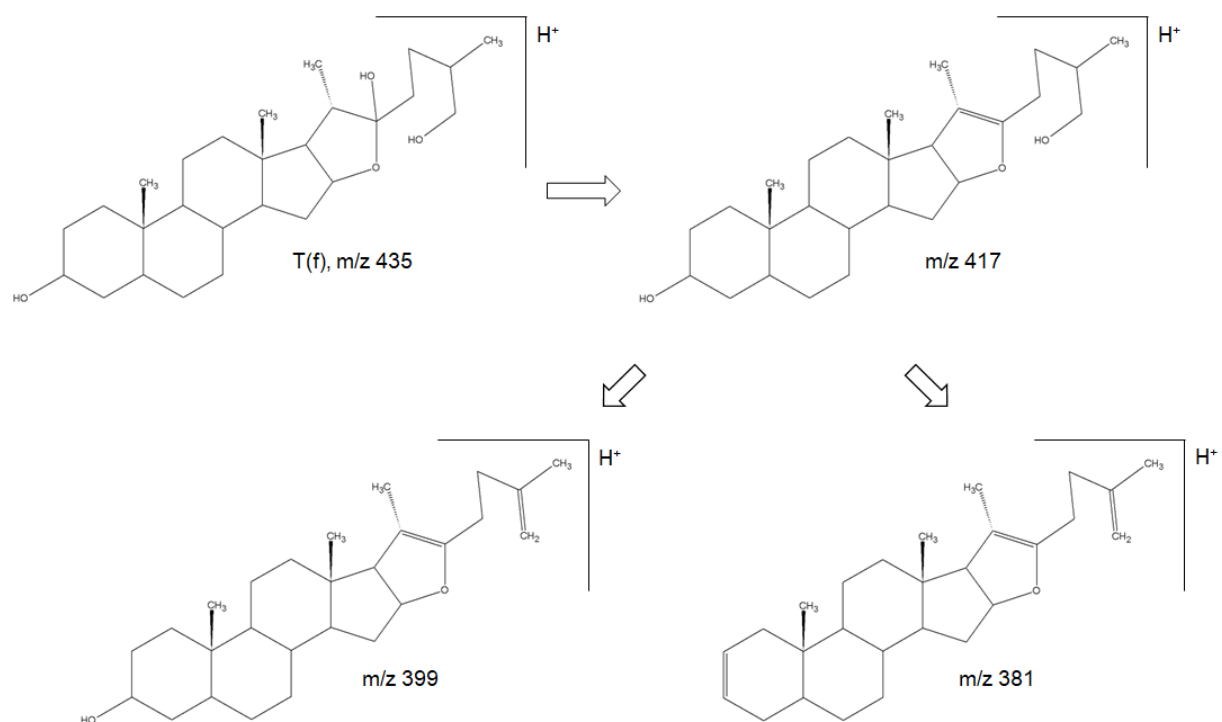


Рисунок П19 – Основные сигналы паттерна фрагментации T(f) сапогенина.

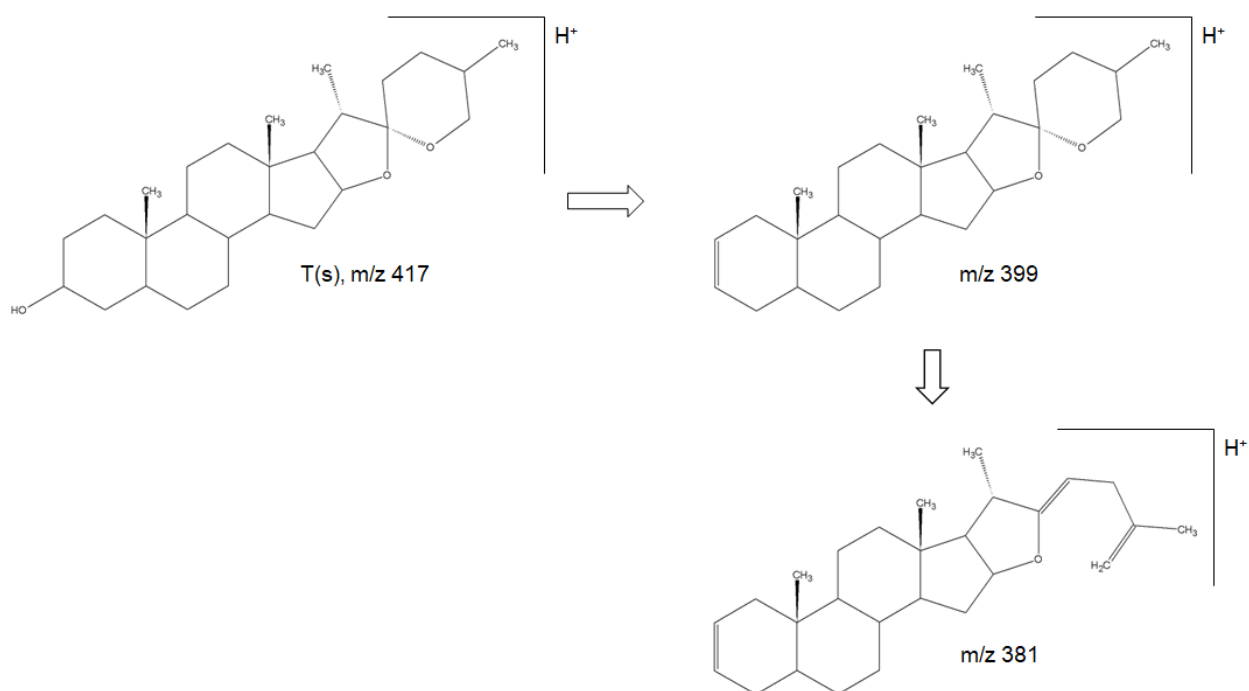


Рисунок П20 – Основные сигналы паттерна фрагментации T(s) сапогенина.

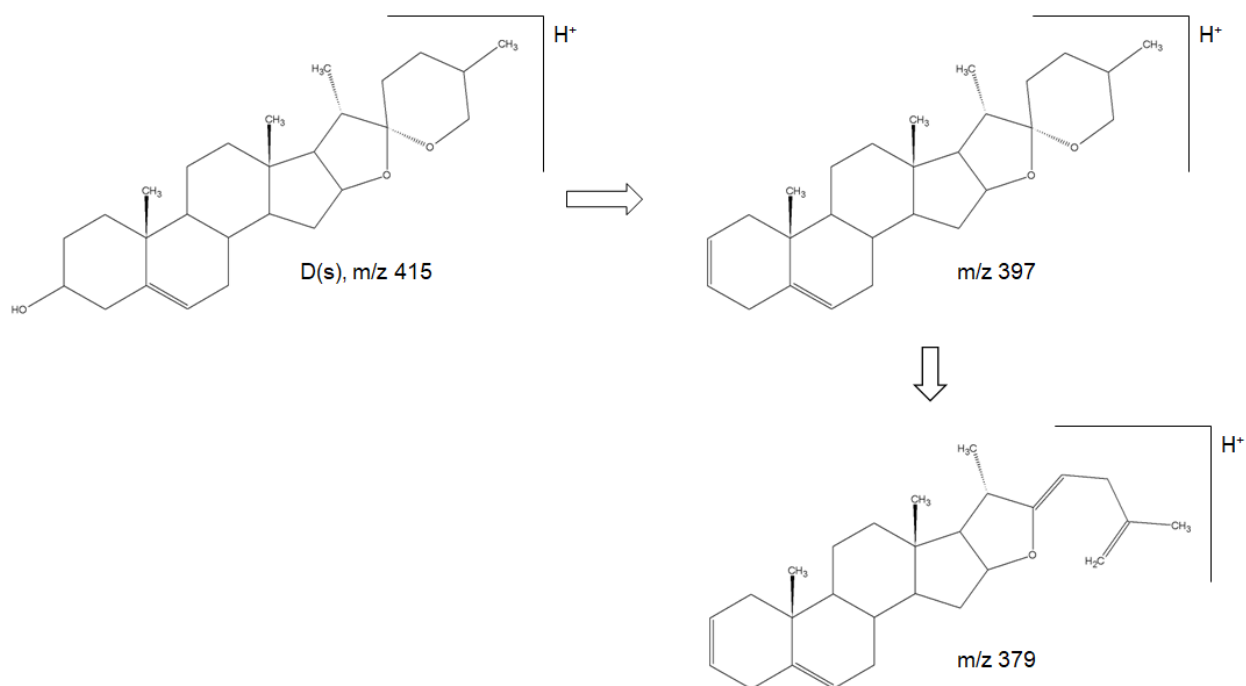


Рисунок П21 – Основные сигналы паттерна фрагментации D(s) сапогенина.

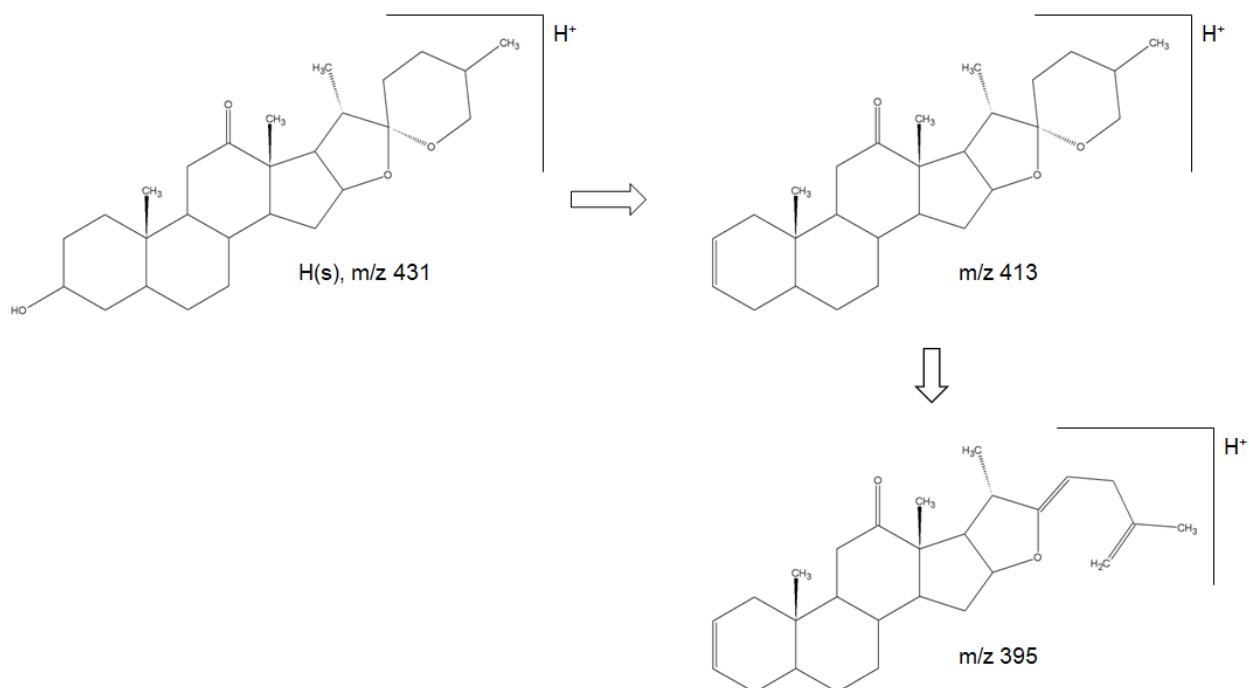


Рисунок П22 – Основные сигналы паттерна фрагментации H(s) сапогенина.

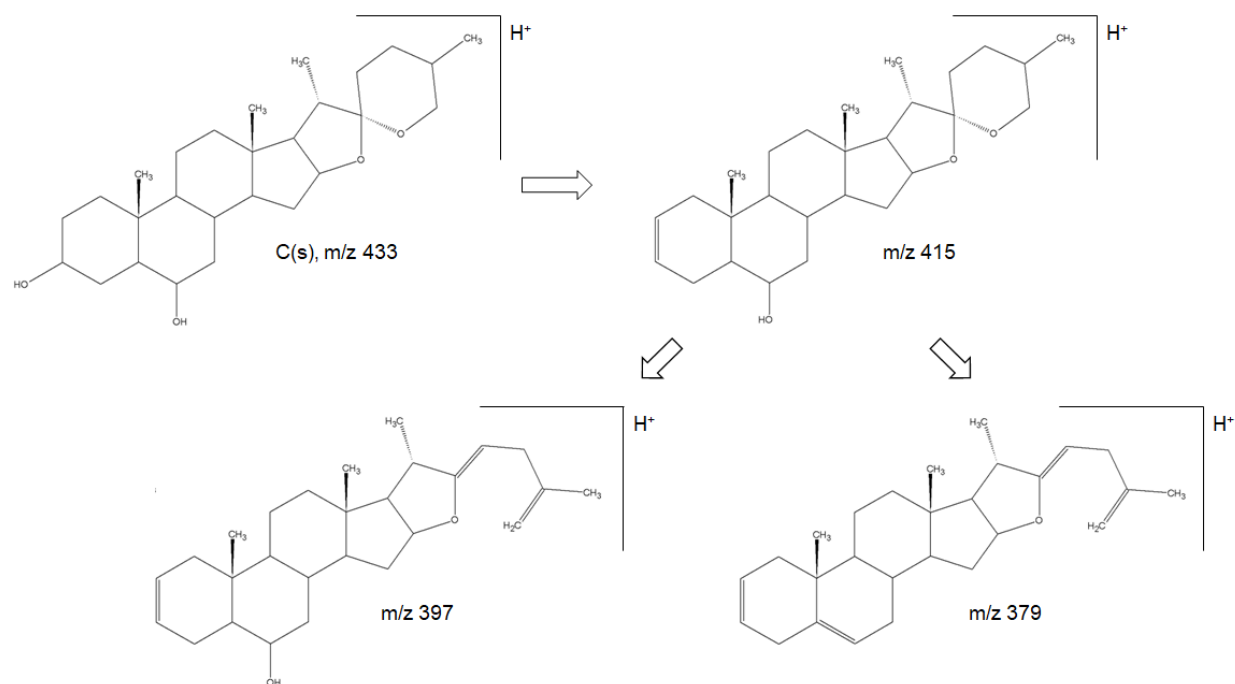


Рисунок П23 – Основные сигналы паттерна фрагментации C(s) сапогенина.

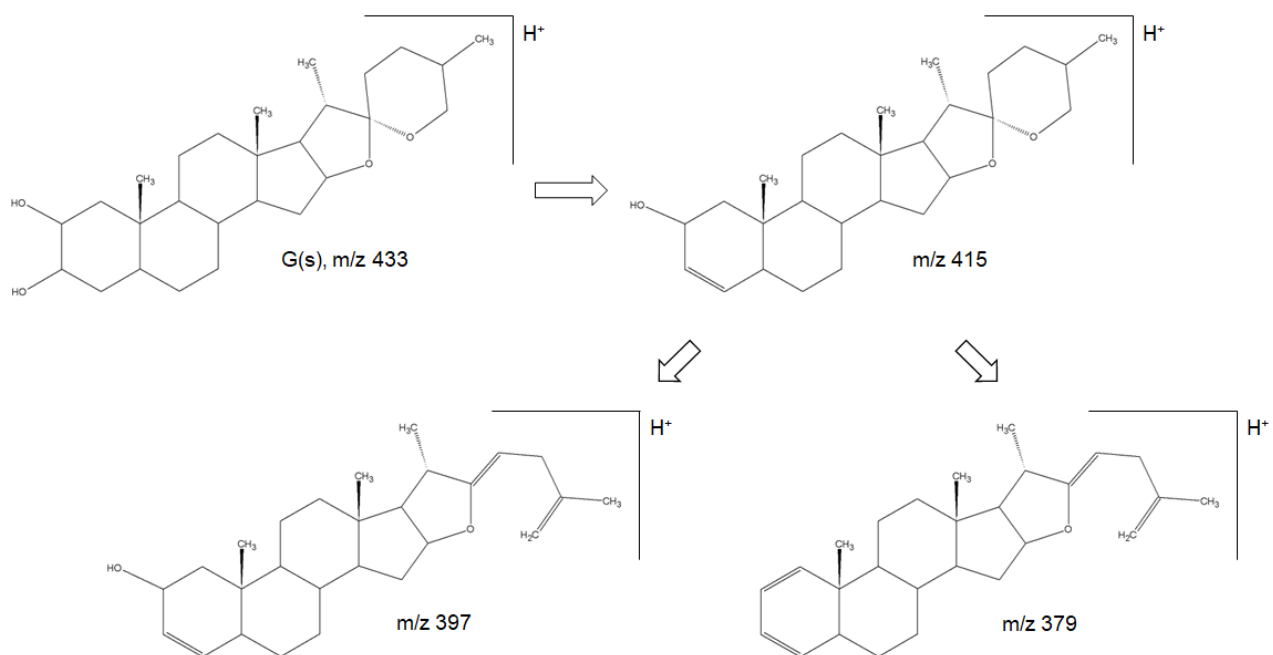


Рисунок П24 – Основные сигналы паттерна фрагментации G(s) сапогенина.

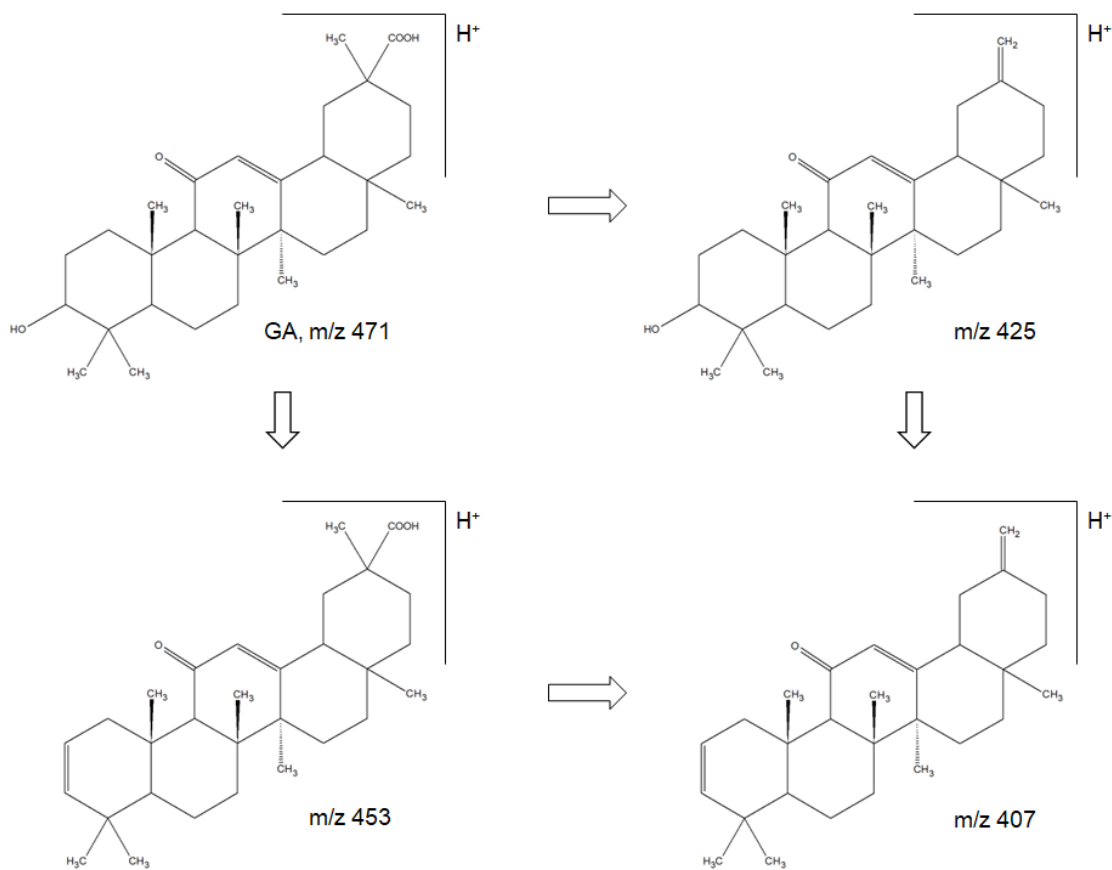


Рисунок П25 – Основные сигналы паттерна фрагментации GA сапогенина.

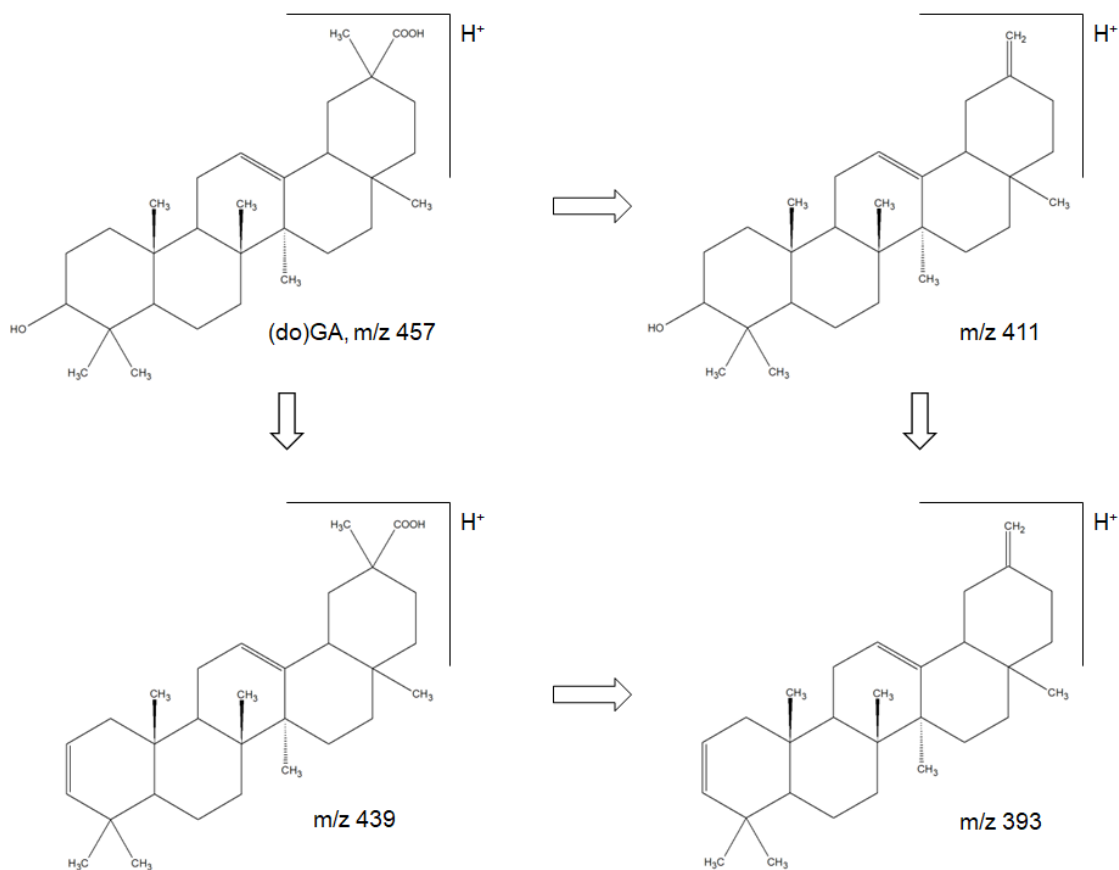


Рисунок П26 – Основные сигналы паттерна фрагментации (do)GA сапогенина.

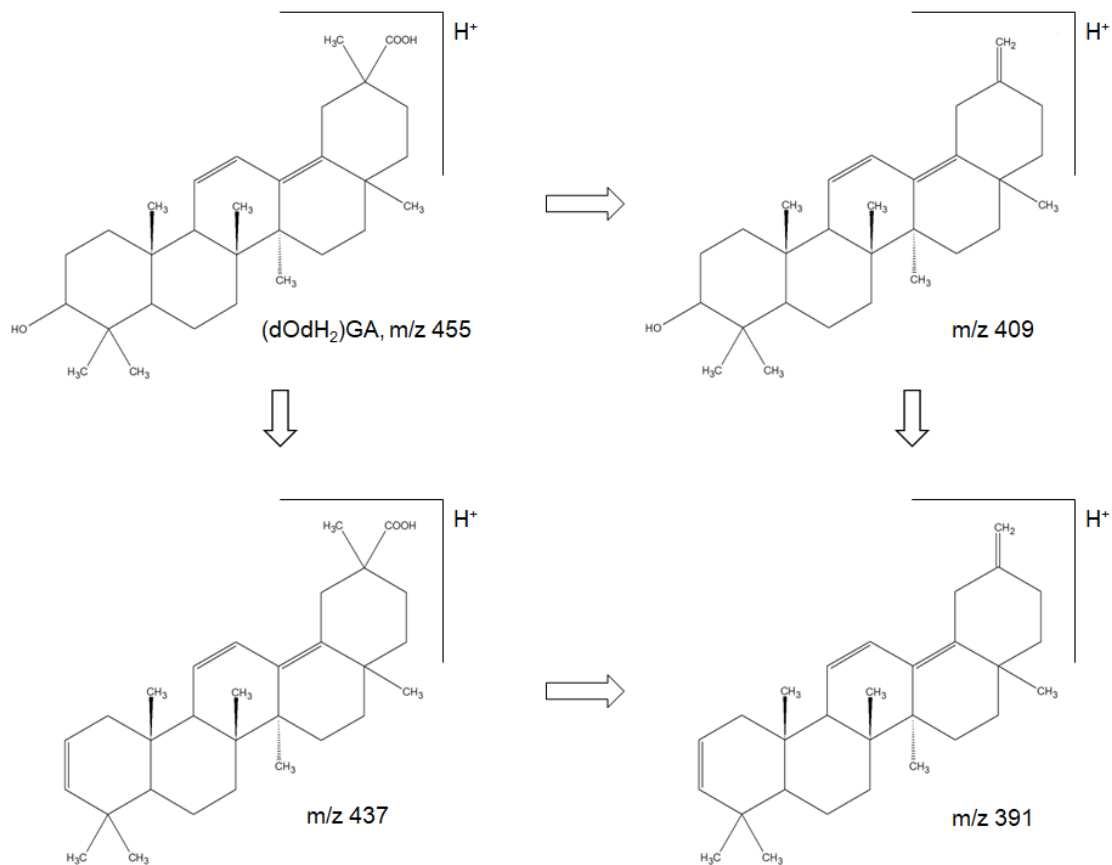


Рисунок П27 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dOdH₂)GA сапогенина.

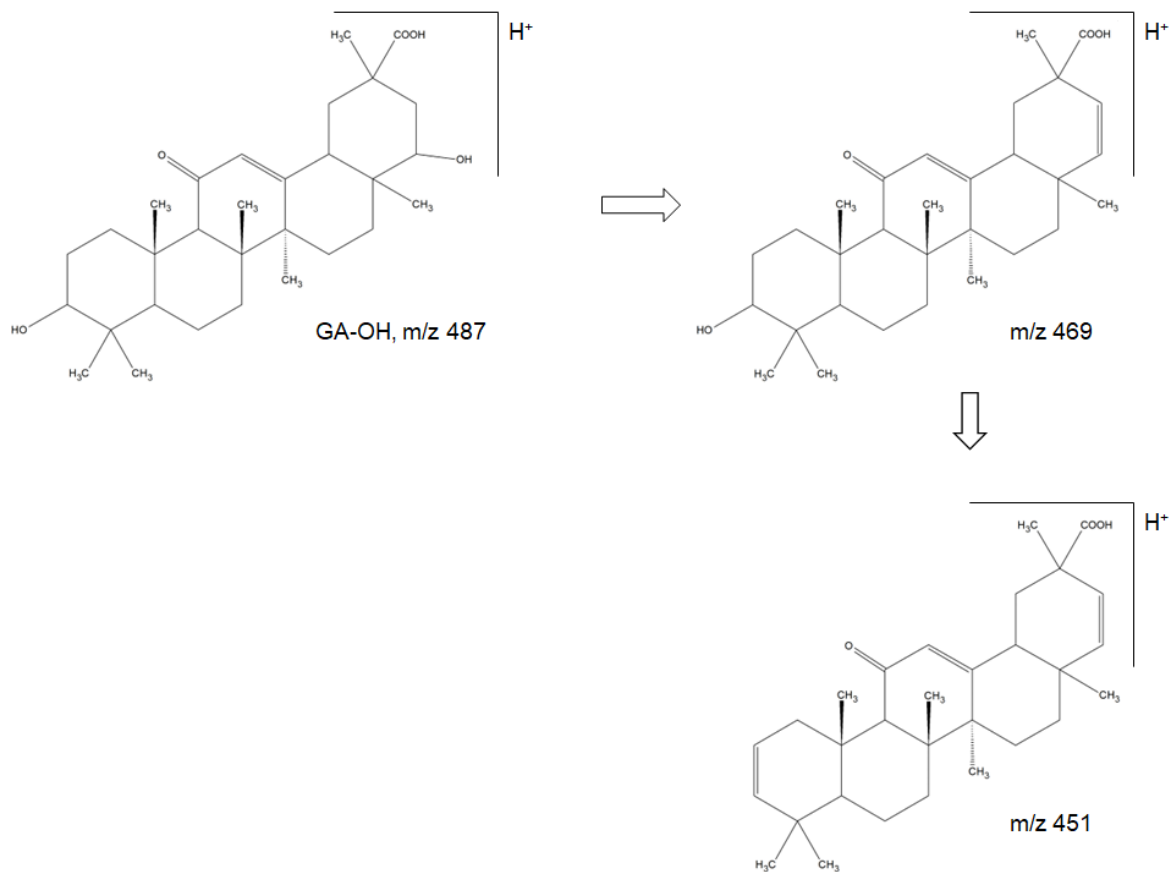


Рисунок П28 – Основные сигналы паттерна фрагментации GA-OH сапогенина.

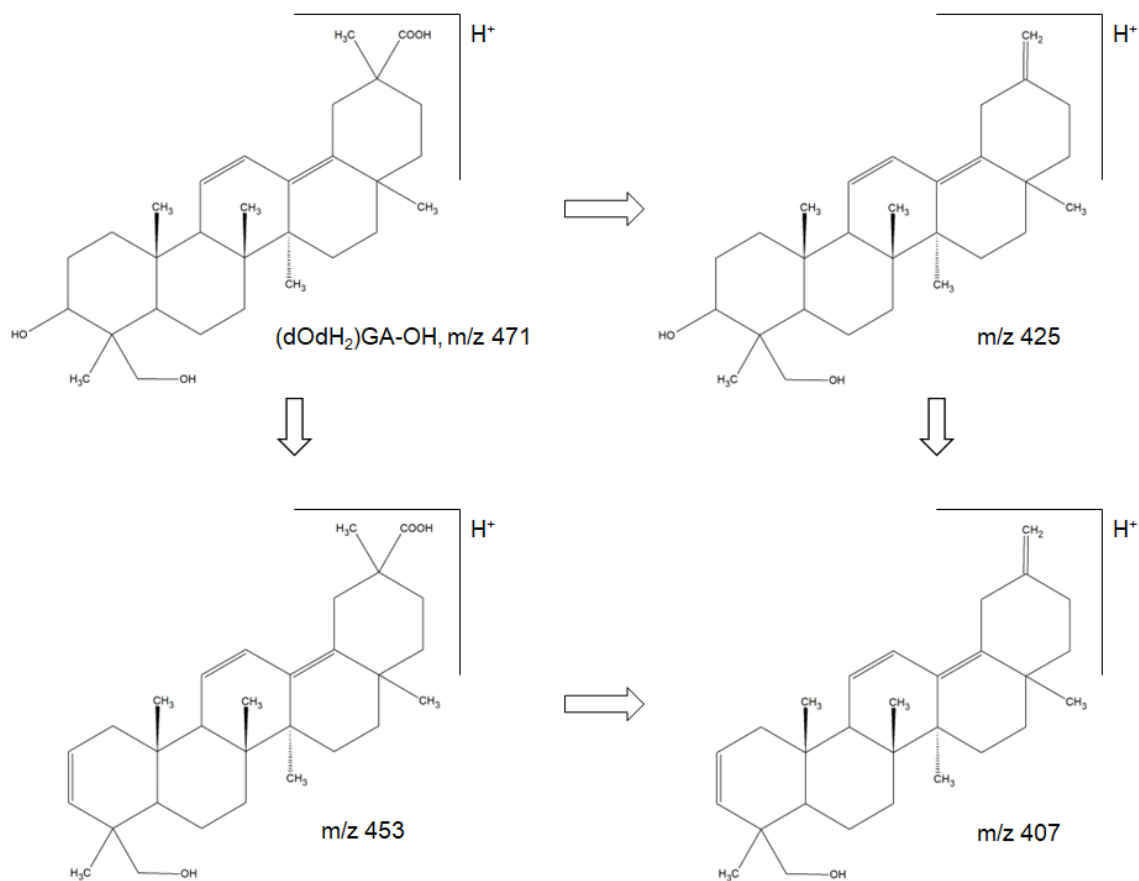


Рисунок П29 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dOdH₂)GA-OH сапогенина.

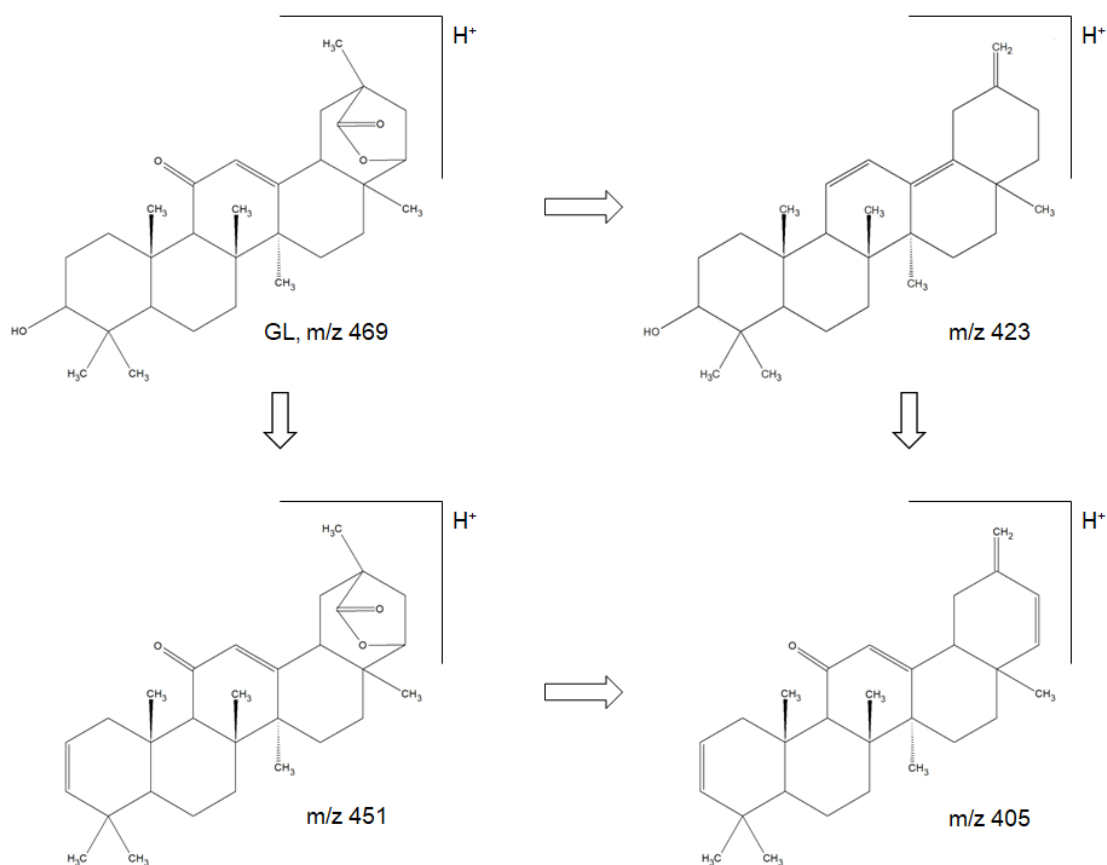


Рисунок П30 – Основные сигналы паттерна фрагментации GL сапогенина.

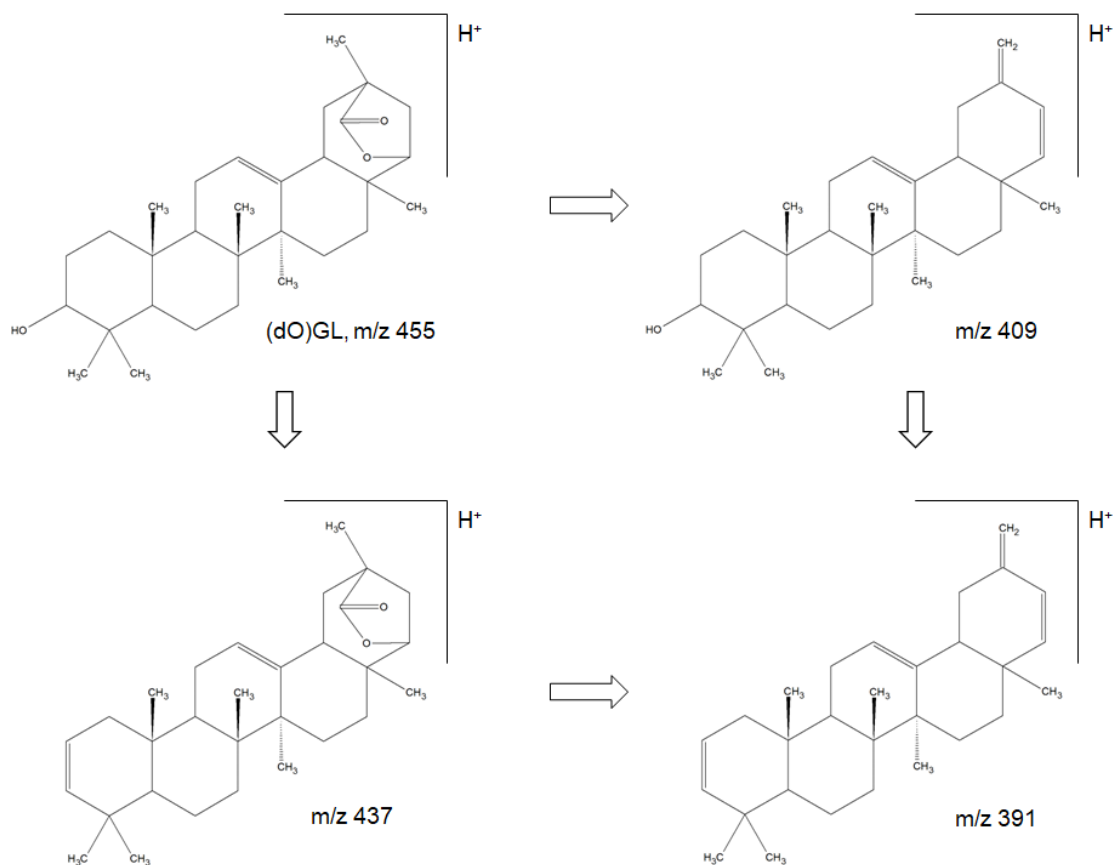


Рисунок ПЗ1 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dO)GL сапогенина.

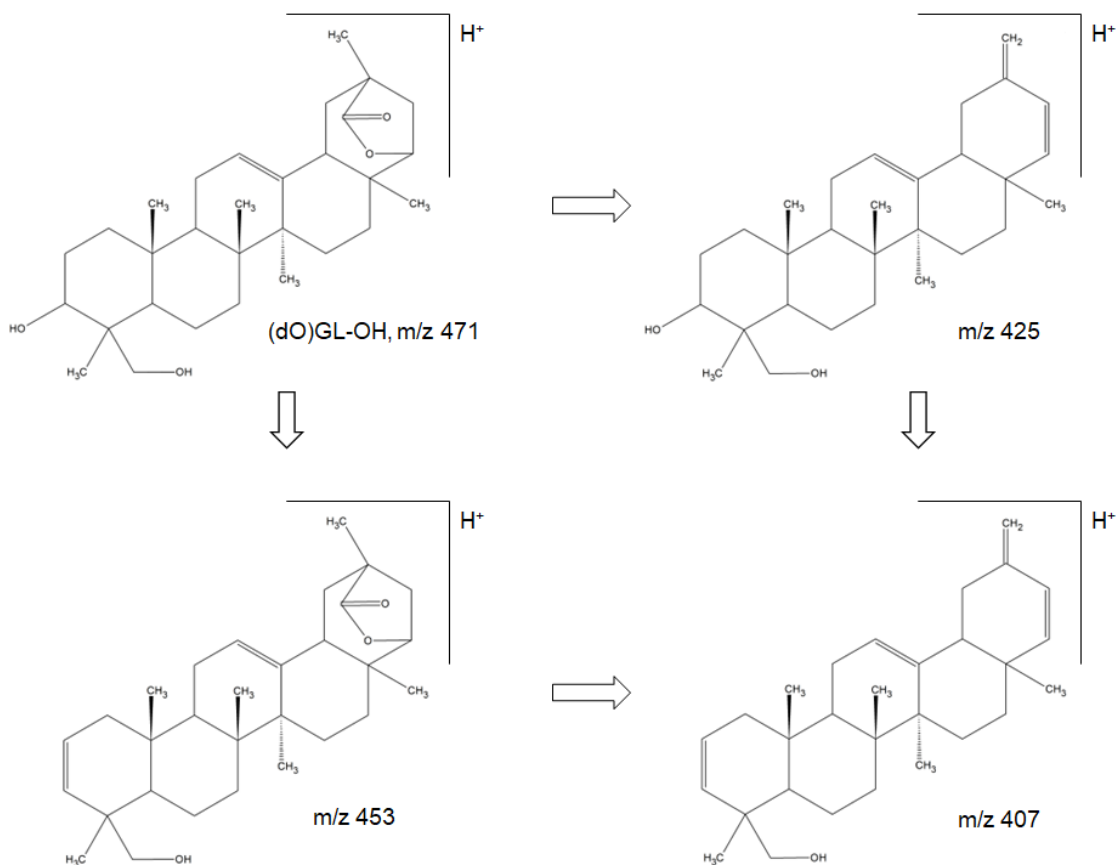


Рисунок ПЗ2 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dO)GL-OH сапогенина.

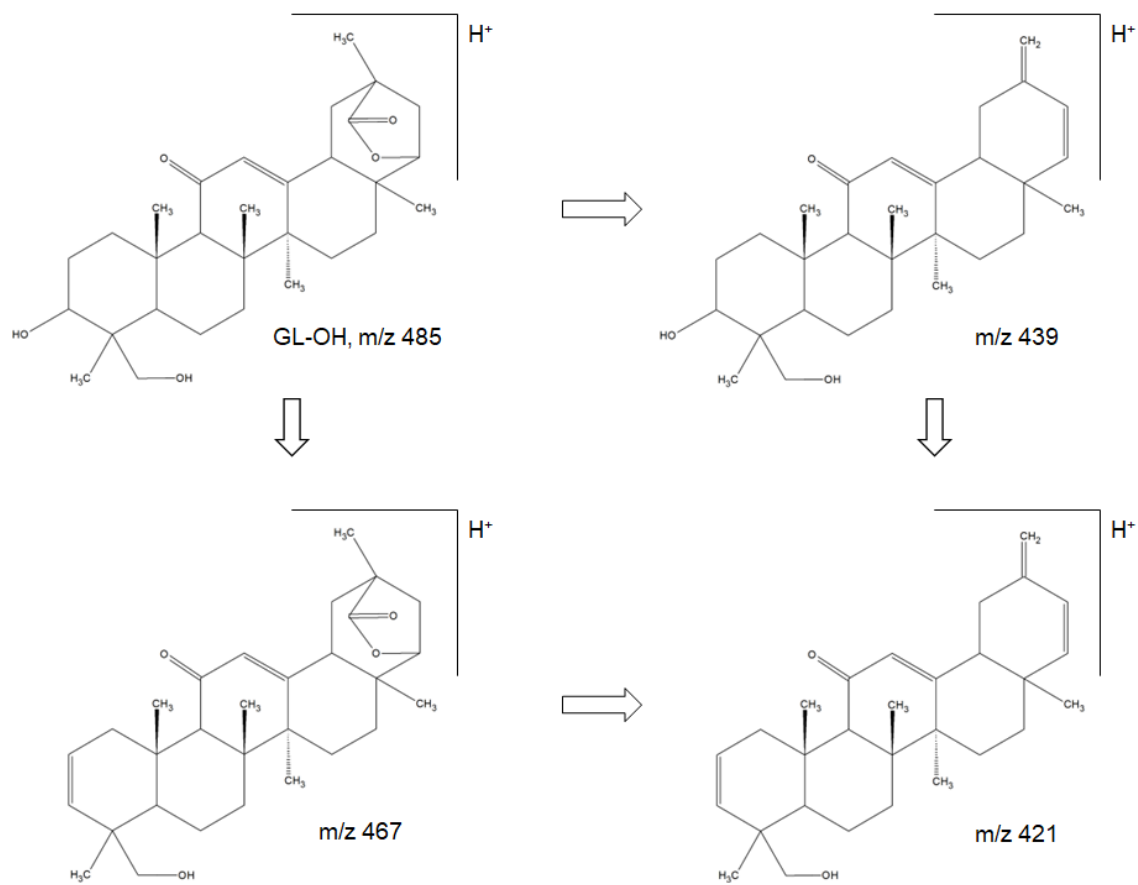


Рисунок П33 – Основные сигналы паттерна фрагментации GL-OH сапогенина.

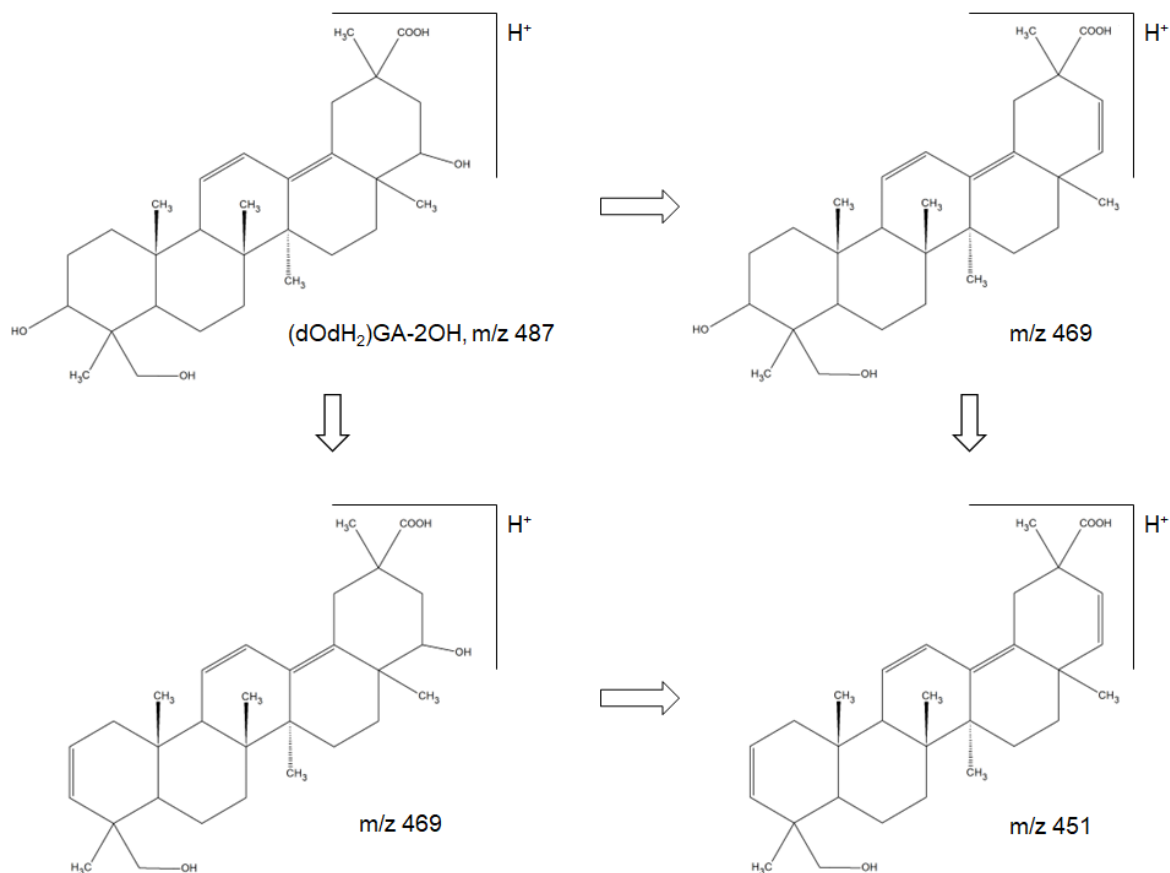


Рисунок П34 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dOdH₂)GA-2OH сапогенина.

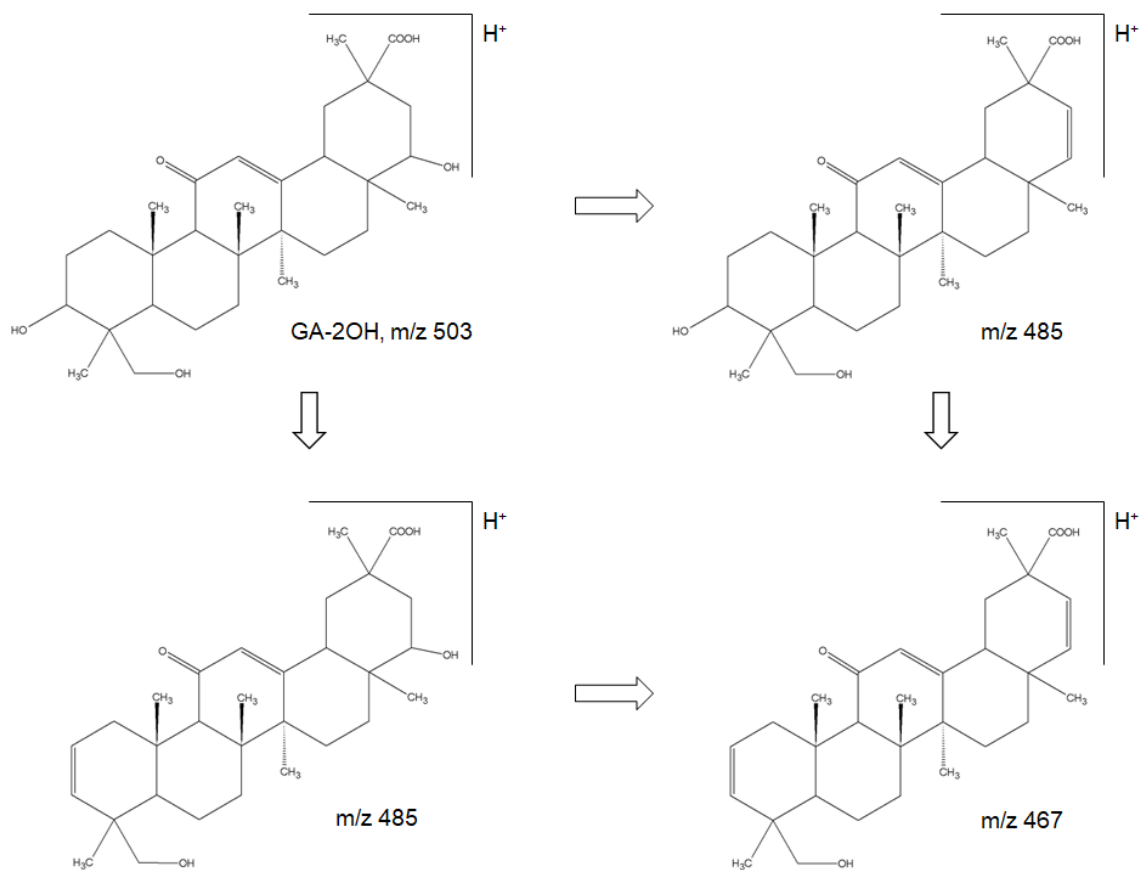


Рисунок П35 – Основные сигналы паттерна фрагментации GA-2OH сапогенина.

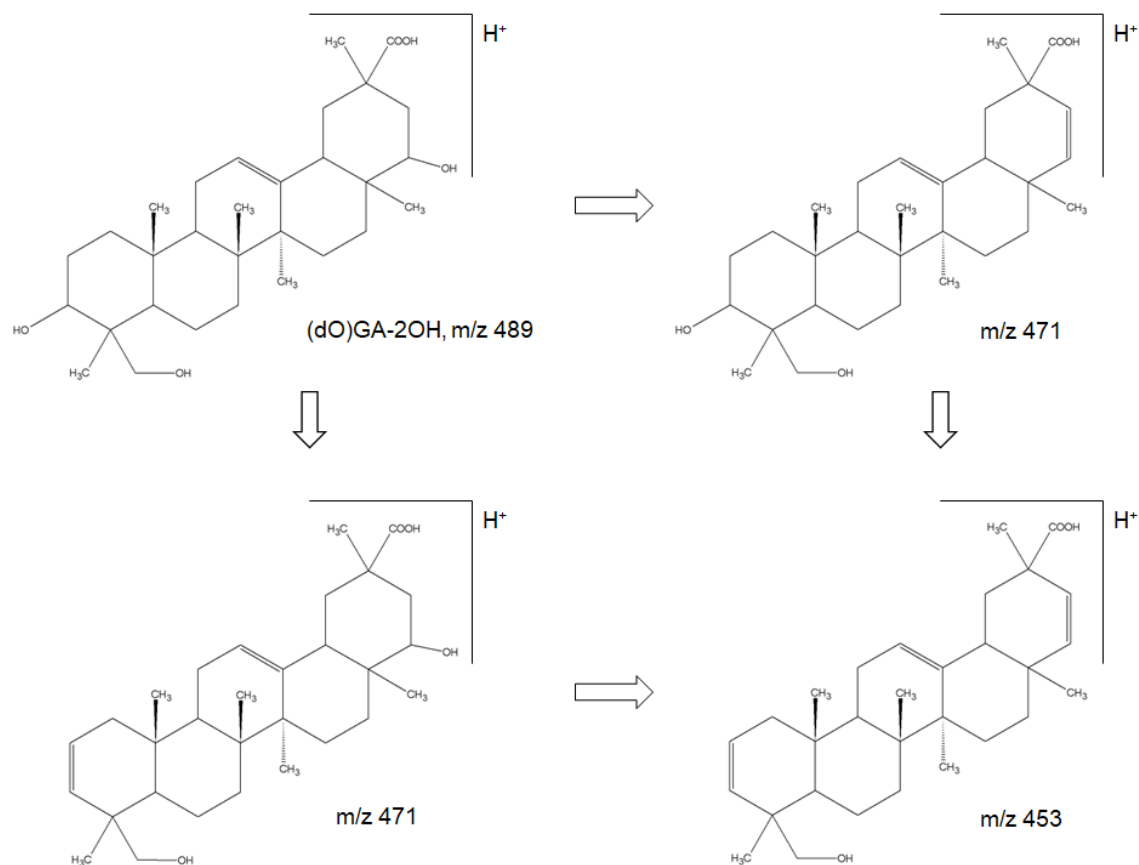


Рисунок П36 – Основные сигналы паттерна фрагментации (dO)GA-2OH сапогенина.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Дополнительные рисунки и таблицы к главе 5.

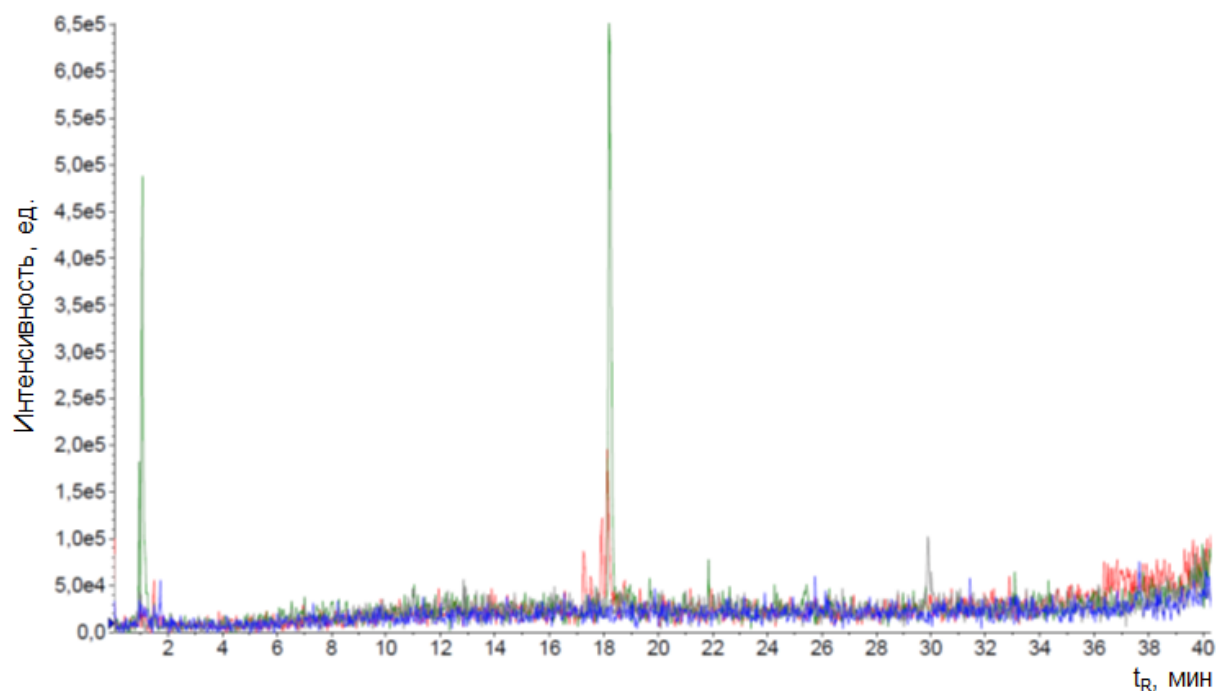


Рисунок ПЗ7 – Масс-хроматограммы экстракта из корня *P. ginseng* в режиме СИМ: m/z 485 (синий), m/z 467 (красный), m/z 439 (зеленый), m/z 421 (серый).

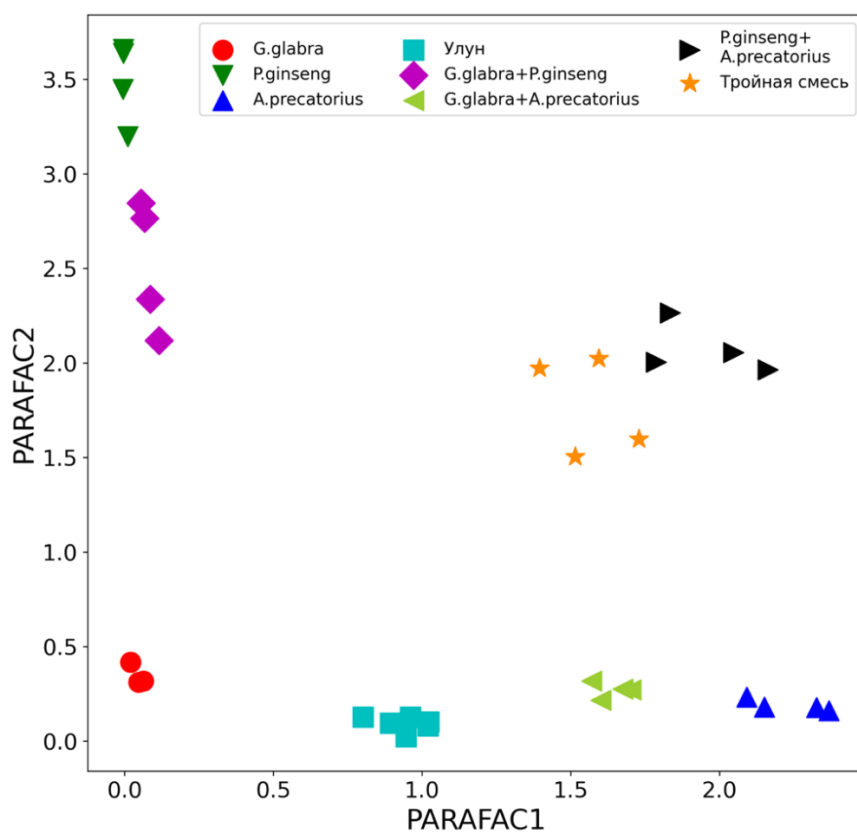


Рисунок ПЗ8 – Визуализация счетов ПФА для первой и второй компонент для расширенного набора образцов.

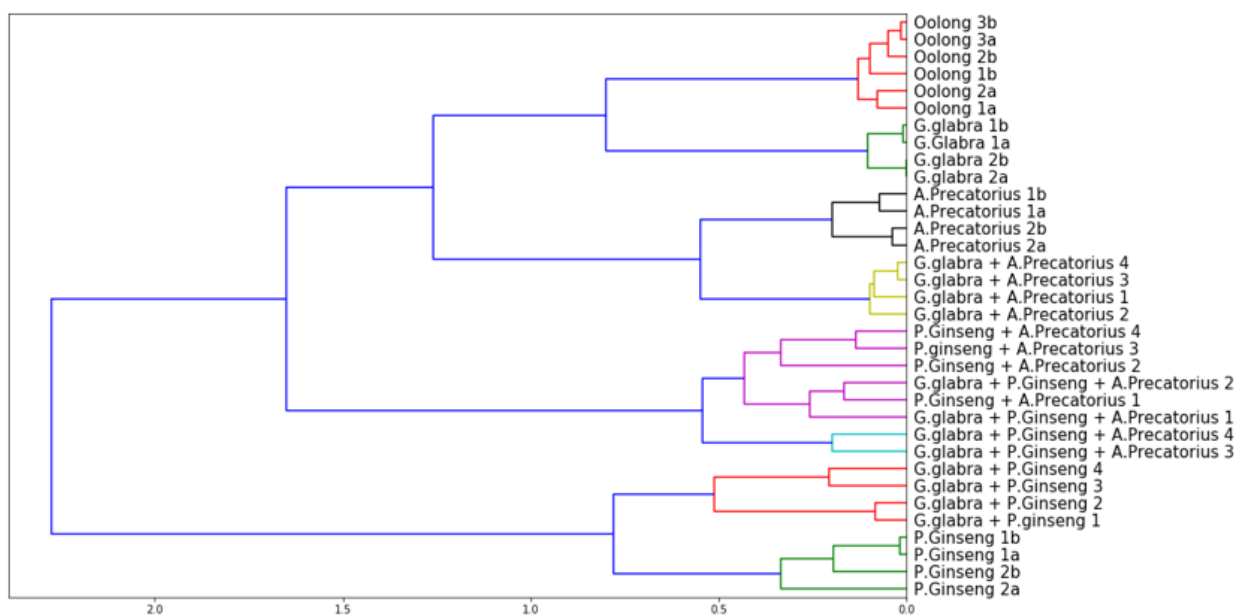


Рисунок П39 – Дендрограмма, построенная методом иерархического кластерного анализа.

Таблица П3 – Обнаруженные компоненты в экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенных в биореакторе

Фрагментарная формула*	t_R , мин 25R (25S)	Сигналы в масс-спектрах, m/z	
		Молекулярные ионы	Осколочные ионы
C(f)/G(f)-Gal-Glc-Glc	12.21 (11.91)	1081.3 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1121.4 [M+Na] ⁺	919 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 757 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 595 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-3H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(f)/G(f)-Gal[-Rha]-Glc	12.23 (12.02)	1065.3 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1105.4 [M+Na] ⁺	919 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 757 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺ 595 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-3H ₂ O-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
H(f)-Gal-Glc-Glc	14.16 (13.98)	1241.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1281.7 [M+Na] ⁺	917 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 899 [M-2H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 755 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 593 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
H(f)-Gal-Glc-Glc	14.26 (14.02)	1079.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1119.7 [M+Na] ⁺	917 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 755 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 593 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
H(f)-Gal[-Rha]-Glc	14.79 (14.61)	1063.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1103.7 [M+Na] ⁺	755 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺ 593 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺

Продолжение таблицы ПЗ

C(f)/G(f)-Gal-Glc-Glc-Glc	15.81 (15.64)	1243.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1283.7 [M+Na] ⁺	1081 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 919 [M-2H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 757 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 595 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 451 [M-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 433 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(f)/G(f)-Gal-Glc-Glc	15.95 (15.75)	1081.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1121.7 [M+Na] ⁺	919 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 757 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 595 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 451 [M-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 433 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-3H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(f)-Gal[-Rha]-Glc-Glc	18.45 (18.01)	1211.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1251.7 [M+Na] ⁺	1049 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 903 [M-H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 741 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Rha+H] ⁺ 579 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc-Rha-Gal+H] ⁺ 417 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
T(f)-Gal-Glc-Glc-Glc	19.00 (18.85)	1227.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1267.7 [M+Na] ⁺	1065 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 903 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 741 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 579 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 417 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(f)-Gal-Glc-Glc	19.28 (19.14)	1065.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1105.7 [M+Na] ⁺	903 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 741 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 579 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 417 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(f)-Gal[-Rha]-Glc	20.03 (19.78)	1049.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1089.7 [M+Na] ⁺	887 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 741 [M-H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 579 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 417 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
T(f)-Gal[-Rha]-Glc-Xyl	20.10 (19.92)	1181.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1221.7 [M+Na] ⁺	1049 [M-H ₂ O-Xyl+H] ⁺ 887 [M-H ₂ O-Xyl-Glc+H] ⁺ 741 [M-H ₂ O-Xyl-Glc-Rha+H] ⁺ 579 [M-H ₂ O-Xyl-Glc-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Xyl-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 417 [M-H ₂ O-Xyl-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Xyl-Glc-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
D(f)-Glc-Glc-Glc-Glc	20.97	- 1265.6 [M+Na] ⁺	1063 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 901 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 739 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺

Продолжение таблицы ПЗ

D(f)-Glc-Glc-Glc	21.20 (20.85)	1063.6 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1103.7 [M+Na] ⁺	901 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 739 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺
D(f)-Glc[-Rha]	21.55	885.6 [M-H ₂ O+H] ⁺ -	739 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 723 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 595 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺
D(f)-Glc[-Rha]-Glc	21.62	1047.5 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1087.5 [M+Na] ⁺	885 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 739 [M-H ₂ O-Glc-Rha+H] ⁺ 723 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Rha+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Glc-Rha+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Rha-Glc+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Rha-Glc+H] ⁺
C(s)/G(s)-Gal-Glc-Glc-Glc	26.16	1063.6 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1103.7 [M+Na] ⁺	901 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 883 [M-2H ₂ O-Glc+H] ⁺ 739 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 595 [M-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(s)/G(s)-Gal-Glc-Glc	26.90 (26.74)	901.6 [M-H ₂ O+H] ⁺ 941.6 [M+Na] ⁺	739 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 595 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(s)/G(s)-Gal[-Rha]-Glc	27.14 (26.89)	885.6 [M-H ₂ O+H] ⁺ 925.7 [M+Na] ⁺	739 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 723 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 595 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 577 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 433 [M-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
H(s)-Gal-Glc-Glc	28.38 (28.05)	917.7 [M+H] ⁺ 939.6 [M+Na] ⁺	755 [M-Glc+H] ⁺ 593 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 575 [M-2H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 395 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 377 [M-3H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
H(s)-Gal-Glc-Glc	31.90 (31.11)	- 939.6 [M+Na] ⁺	755 [M-Glc+H] ⁺ 593 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 395 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺

Продолжение таблицы ПЗ

H(s)-Gal[-Rha]-Glc	33.08 (32.65)	901.6 [M+H] ⁺ 923.6 [M+Na] ⁺	739 [M-Rha+H] ⁺ 593 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 575 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺ 431 [M-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 395 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
H(s)-Gal-Glc-Glc	33.29 (32.57)	- 939.6 [M+Na] ⁺	755 [M-Glc+H] ⁺ 593 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 575 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 431 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 395 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(s)/G(s)-Gal-Glc-Glc-Glc	35.22	1081.3 [M+H] ⁺ 1103.5 [M+Na] ⁺	919 [M-Glc+H] ⁺ 757 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 595 [M-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 451 [M-Glc-Glc-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
C(s)/G(s)-Gal-Glc-Glc	36.09	919.4 [M+H] ⁺ 941.5 [M+Na] ⁺	757 [M-Glc+H] ⁺ 595 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 451 [M-Glc-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 433 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 415 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 397 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal[-Rha]-Glc-Glc	37.61 (36.90)	- 1071.6 [M+Na] ⁺	887 [M-Glc+H] ⁺ 725 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 579 [M-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Rha-Glc-Glc-Gal+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Rha-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal[-Rha]-Glc	38.74 (38.02)	887.3 [M+H] ⁺ 909.6 [M+Na] ⁺	741 [M-Rha+H] ⁺ 725 [M-Glc+H] ⁺ 579 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Rha-Glc-Gal+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-2H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal-Glc-Glc	39.12 (38.41)	903.3 [M+H] ⁺ 925.6 [M+Na] ⁺	741 [M-Glc+H] ⁺ 579 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal-Glc-Glc-Glc	39.87 (39.80)	1065.6 [M+H] ⁺ 1087.6 [M+Na] ⁺	903 [M-Glc+H] ⁺ 885 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺ 741 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 579 [M-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Glc-Glc-Glc-Glc+H] ⁺ 399 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 381 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Glc-Gal+H] ⁺

Продолжение таблицы ПЗ

T(s)-Gal[-Rha]-Glc-Xyl	40.51 (39.84)	1019.5 [M+H] ⁺ 1041.5 [M+Na] ⁺	887 [M-Xyl+H] ⁺ 741 [M-Xyl-Rha+H] ⁺ 725 [M-Xyl-Glc+H] ⁺ 579 [M-Xyl-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Xyl-Rha-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Xyl-Rha-Glc-Glc+H] ⁺ 399 [M-H ₂ O-Xyl-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 381 [M-2H ₂ O-Xyl-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal[-Rha]-Glc	41.15 (40.60)	887.3 [M+H] ⁺ 909.6 [M+Na] ⁺	741 [M-Rha+H] ⁺ 725 [M-Glc+H] ⁺ 579 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 435 [M-Rha-Glc-Gal+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Rha-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-H ₂ O-Rha-Glc-Gal+H] ⁺
T(s)-Gal-Glc-Glc	41.72 (41.19)	903.3 [M+H] ⁺ 925.6 [M+Na] ⁺	741 [M-Glc+H] ⁺ 579 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 435 [M-Glc-Glc-Glc+H ₂ O+H] ⁺ 417 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 399 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺
Дополнительно: [H(s)+H ₂ O]-Gal-Glc-Glc	22.39 (22.09)	917.7 [M-H ₂ O+H] ⁺ 935.6 [M+H] ⁺ 957.6 [M+Na] ⁺	773 [M-Glc+H] ⁺ 611 [M-Glc-Glc+H] ⁺ 593 [M-H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 575 [M-2H ₂ O-Glc-Glc+H] ⁺ 449 [M-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 431 [M-H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 413 [M-2H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺ 395 [M-3H ₂ O-Glc-Glc-Gal+H] ⁺

*Обозначение Нех заменено на Glc или Gal, по аналогии с известными, описанными структурами.