ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ, 2020, том 54, № 6, с. 733–737

УДК 615.322:582.892:543.544.5.068.7:543.51

ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРАЛОЗИДОВ КОМПОЗИЦИИ ФИТОАДАПТОГЕНОВ

© 2020 г.
И. В. Казеев[a], *, О. А. Бочарова[a], В. Е. Шевченко[a], Р. В. Карпова[a], Е. В. Бочаров[a], Е. В. Уютова[b], О. П. Шейченко[b], В. Г. Кучеряну[c], М. А. Барышникова[a]

[a] *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

[b] *Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия*

[c] *Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия*

**e-mail: ilya_delta@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.04.2020 г.
После доработки 14.05.2020 г.
Принята к публикации 15.05.2020 г.

Исследованы возможности тандемной масс-спектрометрии для технологии анализа аралозидов в фармацевтической композиции “Мультифитоадаптоген” (МФА) и экстракте корней аралии маньчжурской (входящего в состав МФА). Хроматографирование проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH C18 в градиентном режиме. Использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр TSQ Vantage с электрораспылительной ионизацией. В МФА, так же как и в экстракте корней аралии маньчжурской, были идентифицированы аралозиды A, B, C и/или их изомеры.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, аралия маньчжурская, аралозиды, фитоадаптогены

DOI: 10.31857/S0040357120050085

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время очевидной становится перспективность применения нетоксичных иммуномодуляторов, в частности фитоадаптогенов, для профилактических воздействий, а также в составе комплексной терапии при злокачественных новообразованиях. Их действие направлено на восстановление защитных систем организма, в том числе иммуноадгезионных механизмов [1–6].

Вместе с тем актуальной является технологическая проблема стандартизации, особенно многокомпонентных фитокомплексов. Важным остается и обоснование фармакологической активности препаратов с учетом их химического состава [7].

Фармацевтическая композиция фитоадаптогенов “Мультифитоадаптоген” (МФА) содержит компоненты экстрактов 40 растений, включенных в Государственную фармакопею РФ, в том числе адаптогенов женьшеня, аралии, элеутерококка, родиолы розовой, заманихи, лимонника. Выявлены антимутагенные, противоопухолевые, радиопротекторные, гормономодулирующие, антиоксидантные, нейропротекторные, иммуномодулирующие, в том числе противовоспалительные и интерфероногенные эффекты МФА [8–16]. Эффективность МФА, вероятно, обусловлена комплексом биологически активных веществ (БАВ), входящих в его состав.

Для стандартизации и контроля качества МФА проводятся исследования по определению БАВ, входящих в его состав. В ранее проведенных работах с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором, хромато-масс-спектрометрии, ЯМР-спектрометрии в МФА были определены полифенольные соединения (флавоноиды и др.), эфирные масла, аминокислоты и витамины [17, 18].

Весьма важным моментом дальнейшего анализа компонентов МФА является определение тритерпеновых сапонинов, основных БАВ, в частности женьшеня, аралии, заманихи и других фитоадаптогенов. Тритерпеновым сапонинам свойственна многообразная фармакологическая активность, в том числе противоопухолевая, антиоксидантная, иммуномодулирующая [19].

Учитывая многокомпонентный состав МФА, для идентификации тритерпеновых сапонинов представляется перспективным применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Этот метод отличается высокой специфичностью, точностью и возмож-

ностью определения веществ в минимальных количествах.

В предыдущих исследованиях среди компонентов МФА методом ВЭЖХ-МС/МС были идентифицированы гинзенозиды Rb_1, Rb_2, Rc, Rd, Rg_1, Rg_2, Re, Rf, Ro, которые представляют собой основные тритерпеновые сапонины корней женьшеня [20].

Кроме того, в состав МФА входит экстракт корней аралии маньчжурской – Aralia mandshurica Rupr. et Maxim; сем. аралиевые – Araliaceae. Известно, что корни этого растения содержат аралозиды – тритерпеновые сапонины пентациклического ряда, производные олеанана.

Введение компонентов экстракта аралии в состав МФА было оправдано тем, что аралозиды обладают комплексом свойств, значимых для онкологических заболеваний и болезней старения. Так, показано, что аралозиды регулируют ключевые медиаторы ответа на стресс, в том числе нейропептид Y, кортизол, оксид азота, стресс-активируемую протеинкиназу JNK и транскрипционный фактор DAF-16. Обладают цитотоксической активностью против опухолевых клеточных линий. Проявляют кардиопротекторный, гиполипидемический, антидиабетический, антиоксидантный эффекты. Повышают реактивность, лабильность и работоспособность нервных клеток [19].

В связи с этим следующим этапом анализа тритерпеновых сапонинов в составе МФА стало определение аралозидов.

Цель данного исследования – выявление аралозидов в МФА методом ВЭЖХ-МС/МС.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

В работе исследовали 2 образца: МФА, а также экстракт корней аралии, входящий в состав МФА. Оба образца были получены по одинаковой технологии (удельный вес сырья, температурный и временной режим экстрагирования, состав экстрагента, соотношение сырье : экстрагент). Для приготовления экстрактов использовали сертифицированное сырье.

Образец МФА смешивали с метанолом в соотношении 1 : 2 и центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и центрифугировали при 13000 об./мин в течение 1 мин.

Аликвоту (1 мл) экстракта аралии упаривали на роторном испарителе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) при 30°C досуха. Остаток растворяли в 100 мкл метанола и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Анализ образцов проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра TSQ Vantage (серии Thermo Scientific TSQ), соединенного с ВЭЖХ-хроматографом Accela.

Условия хроматографического анализа: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 мкм, 2.1 × × 100 мм, Waters); состав подвижной фазы: фаза А – 100% вода и 0.1% муравьиная кислота (FA); фаза Б – 95% ацетонитрил, 5% вода и 0.1% FA.

Для анализа экстрактов применяли длинный градиент подачи подвижной фазы (в % фазы Б): 0–68 мин (0–60%), 68–70 мин (60–100%), 70–75 мин (100%), 75–80 мин (0%). Образцы в объеме 5 мкл вводили в петлю инжектора объемом 25 мкл (мобильная фаза – 20 мкл), скорость потока 450 мкл/мин.

Ионизацию осуществляли с помощью электроспрея. Условия ионизации: отрицательная полярность, напряжение капилляра спрея 4 кВ, газ (создающий спрей) – 60 psi (фунтов на квадратный дюйм), обтекающий газ – 15 отн. ед., температура капилляра – 270°C. Спектры в режиме полного сканирования и режиме сканирования отдельных ионов были сняты в диапазоне 150–1500 Да, время сканирования – 0.1 с.

Масс-спектры получали прямым вводом пробы через шприц со скоростью 5 мкл/мин; давление газа в камере соударений составило 0.9 торр. Напряжение в камере соударений было подобрано для каждого соединения отдельно.

Анализ данных литературы о химическом составе корней аралии маньчжурской показал основные БАВ этого растения. В табл. 1 приведены

Таблица 1. Основные аралозиды (тритерпеновые сапонины) аралии маньчжурской и их изомеры

№	Соединение	Молекулярная формула	Молекулярная масса
1	Аралозид А	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927
2	Стипулеанозид R1 (изомер аралозида А)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927
3	Chikusetsusaponin Ib (изомер аралозида А)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927
4	Элатозид А (изомер аралозида А)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927
5	Аралозид В	$C_{52}H_{82}O_{22}$	1059
6	Аралозид С	$C_{53}H_{84}O_{23}$	1089
7	Стипулеанозид R2 (изомер аралозида С)	$C_{53}H_{84}O_{23}$	1089

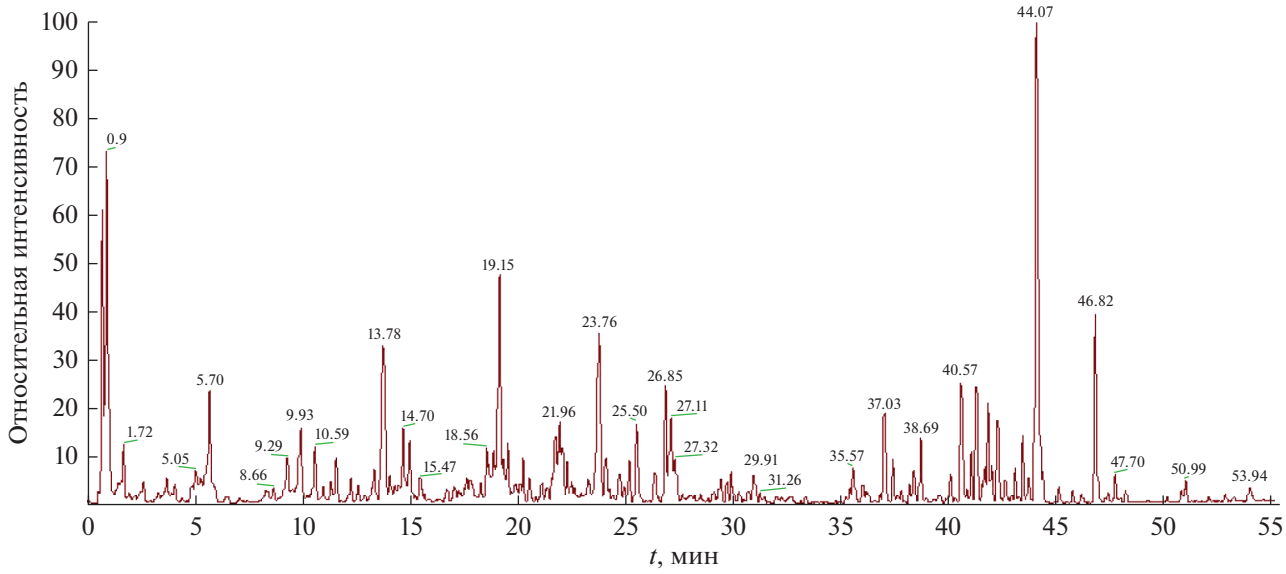

Рис. 1. Хроматограмма экстракта аралии в режиме полного ионного тока.

некоторые из них, относящиеся к пентациклическим тритерпеновым сапонинам (производным олеаноловой кислоты) [21]. Например, аралозид А представляет собой олеаноловую кислоту с последовательно присоединенными остатками глюкозы, арабинозы и глюкуроновой кислоты. У аралозида В в качестве радикалов, кроме глюкозы, присутствуют два остатка арабинозы. У аралозида С – остатки галактозы и ксилозы.

Для выявления аралозидов в экстракте аралии, входящем в состав МФА, была получена хроматограмма экстракта с использованием длинного градиента подачи мобильной фазы, снятая в режиме полного сканирования ионов (рис. 1).

В табл. 2 представлены результаты тандемной масс-спектрометрии экстракта аралии (t и m/z для основного молекулярного иона, а также для фрагментов молекулярного иона), а также молекулярная масса вещества.

Как видно из рис. 1 и табл. 2, доминирующим компонентом экстракта аралии является соединение, дающее основной молекулярный ион с m/z = 925,4 (t = 43.9 мин). Сопоставляя эти данные со значением молекулярной массы из табл. 1, указанный пик можно отнести к аралозиду А.

На хроматограмме экстракта аралии можно видеть еще 3 пика с m/z = 925 (t = 52.3; 53.1; 54.4 мин). Эти пики могут соответствовать изомерам аралозида А. Можно предположить, что в экстракте

Таблица 2. Результаты тандемной масс-спектрометрии экстракта аралии (t, m/z для основного молекулярного иона, а также для фрагментов молекулярного иона), а также молекулярная масса по данным литературы

Соединение, молекулярная формула	t, мин	m/z	Молекулярная масса
Аралозид А Стипулеанозид R1 Chikusetsusaponin Ib Элатозид А $C_{47}H_{74}O_{18}$	43.9; 52.3; 53.1; 54.4	925.32 $[M-H]^-$ 763.25 $[M-H-Glc]^-$ 455 Agl	927.1
Аралозид В $C_{52}H_{82}O_{22}$	42.1–42.6	1057 $[M-H]^-$ 924.66 $[M-H-Ara]^-$ 455 Agl	1059.2
Аралозид С Стипулеанозид R2 $C_{53}H_{84}O_{23}$	41.3–43.0	1087.6 $[M-H]^-$ 925.36 $[M-H-Glc]^-$ 455 Agl	1089.2

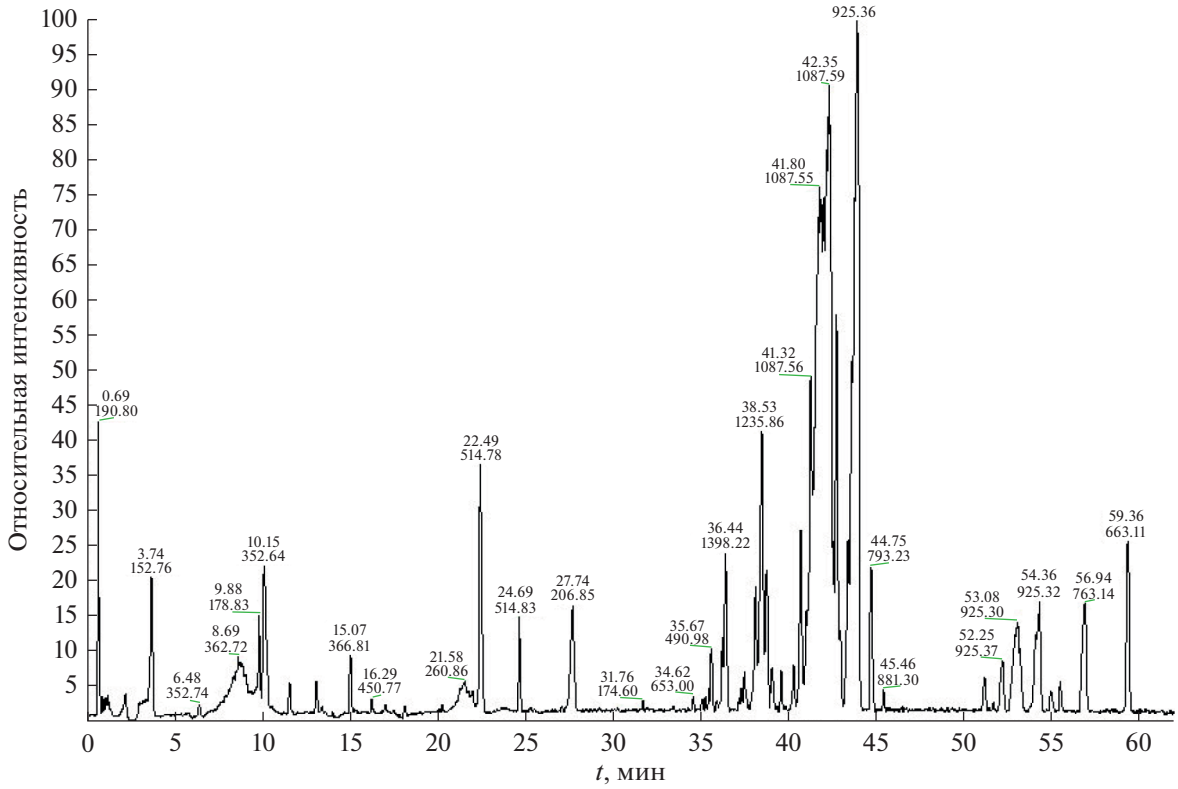

Рис. 2. Хроматограмма экстракта мультифитоадаптогена в режиме полного ионного тока.

аралии имеются все приведенные в табл. 1 соединения с молекулярной массой 927, дающие псевдомолекулярный ион $[M–H]^-$ с $m/z = 925.4$, а основной пик ($t = 43.9$ мин) принадлежит именно аралозиду А, одному из ведущих компонентов экстракта аралии по данным литературы.

Пик с $m/z = 1087.6$ ($t = 41.3–43.0$ мин), вероятно, содержащий аралозид С или его изомер, выглядит очень широким. Скорее всего, под ним скрываются несколько веществ, близких по молекулярной массе.

Аралозид В с $m/z = 1057.5$ был обнаружен на хроматограмме экстракта в режиме детектирования отдельных ионов. Ему соответствовал пик со временем удерживания $t = 42.1–42.6$ мин. В связи с этим можно полагать, что на хроматограмме экстракта аралии (см. рис. 1) пик с $m/z = 1087.6$ ($t = 41.3–43.0$ мин) содержит вместе с тем и аралозид В.

Хроматограмма полного ионного тока МФА представлена на рис. 2. В интервале $t = 41.3–44.0$ мин, а также при $t = 52.3$ и 53.1 мин приведены пики, которые могут соответствовать аралозидам А, В, С и/или их изомерам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были использованы современные технологические подходы к изучению химического состава и стандартизации многокомпонентных экстрактов из лекарственного растительного сырья, в частности мультифитоадаптогена.

Результаты работы говорят в пользу того, что методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в фармацевтической композиции “Мультифитоадаптоген” идентифицированы аралозиды А, В, С и/или их изомеры – тритерпеновые сапонины пентациклического ряда, производные олеаноловой кислоты.

ОБОЗНАЧЕНИЯ

m/z	отношение массы иона к его заряду
t	время удерживания

СОКРАЩЕНИЯ

Agl	агликон
Ara	арабиноза

FA муравьиная кислота

Glc глюкоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е.* Растения в комплексной терапии опухолей. М.: РАМН, 2008.
2. *Amsterdam J.D., Panossian A.G. Rhodiola rosea* L. as a putative botanical antidepressant // Phytomedicine. 2016. V. 23. № 7. P. 770.
3. *Shanmugam M.K., Lee J.H., Chai E.Z., Kanchi M.M., Kar S., Arfuso F., Dharmarajan A., Kumar A.P., Ramar P.S., Looi C.Y., Mustafa M.R., Tergaonkar V., Bishayee A., Ahn K.S., Sethi G.* Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds // Cancer Biol. 2016. V. 40–41. P. 35.
4. *Hassan A.M., Abdel-Aziem S.H., El-Nekeety A.A., Abdel-Wahhab M.A.* Panax ginseng extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1 // Cytotechnology. 2015. V. 67. № 5. P. 861.
5. *Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G., Wagner H., Verpoorte R., Heinrich M.* Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia: their history and applications // J. Ethnopharmacol. 2014. V. 154. № 3. P. 481.
6. *Бочарова О.А.* Профилактическая онкология и фитоадаптогены // Вестн. Росс. акад. мед. наук. 2009. № 7. С. 41.
7. *Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Турмагамбетова А.С.* Актуальные проблемы стандартизации фитопрепаратов и растительного сырья для их производства // Фундам. исслед. 2013. № 6. С. 1184.
8. *Бочарова О.А.* Фармацевтическая композиция, проявляющая антимутагенное действие. Пат. 2477142 РФ // Бюлл. изобрет. 2013. № 7. С. 16.
9. *Kurennaya O.N., Karpova R.V., Bocharova O.A., Kazeev I.V., Bocharov E.V.* Antimutagenesis of Multiphytoadaptogene in Yeast Saccharomyces // Russ. J. Genet. 2013. V. 49. № 12. P. 1190. [*Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А., Казеев И.В., Бочаров Е.В., Королев В.Г.* Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов // Генетика. 2013. Т. 49. № 12. С. 1364.]
10. *Бочарова О.А., Карпова Р.В., Матвеев В.Б., Аксенов А.А., Лыженкова М.А., Ершов Ф.И., Мезенцева М.В., Семернина В.В.* Иммуномодулирующий и интерфероногенный эффекты комплексного фитоадаптогена при доброкачественной гиперплазии предстательной железы // Росс. биотерапевтический журн. 2004. Т. 3. № 1. С. 90.
11. *Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Belorustseva S.A., Bocharova O.A., Kudrin V.S.* Effect of complex phytoadaptogen on MPTP-induced parkinson's syndrome in mice // Bull. Exp. Biol. Med. 2006. V. 141. № 5. P. 560. [*Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Кудрин В.С., Белорусцева С.А.* Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей // Бюлл. эксп. биол. мед. 2006. Т. 141. № 5. С. 495.]
12. *Bocharova O.A., Davydov M.I., Klimenkov A.A., Baryshnikov A.Y., Karpova R.V., Chulkova S.V., Gorozhanskaya E.G., Ilyenko V.A.* Prospects of using phytoadaptogen in the treatment of diffuse stomach cancer // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 48. № 1. P. 82. [*Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А., Барышников А.Ю., Карпова Р.В., Чулкова С.В., Горожанская Э.Г., Ильенко В.А.* Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка // Бюлл. эксп. биол. мед. 2009. Т. 148. № 7. С. 96.]
13. *Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V., Il'enko V.A., Kazeev I.V., Baryshnikov A.Y.* Integrins LFA-1 and Mac-1 and cytokines IL-6 and IL-10 in high-cancer mice under the influence of phytoadaptogen // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. V. 157. № 2. P. 258. [*Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Ильенко В.А., Казеев И.В., Барышников А.Ю.* LFA-1, Mac-1 интегрины и IL-6, -10 цитокины у высокораковых мышей под воздействием фитоадаптогена // Бюлл. эксп. биол. мед. 2014. Т. 157. № 2. С. 223.]
14. *Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Solov'yov Yu.N.* Effects of Phytoadaptogen on Hepatoma Development in Cancer-Prone CBA Mice // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 159. № 5. P. 655. [*Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Соловьев Ю.Н.* Воздействие фитоадаптогена на возникновение гепатом у высокораковой линии мышей CBA // Бюлл. эксп. биол. мед. 2015. Т. 159. № 5. С. 615.]
15. *Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A., Kucheryanu V.G., Shprakh Z.S.* Effect of phytoadaptogen administration during early ontogeny on lifespan and somatic status of CBA mice with high incidence of tumors // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 163. № 6. P. 789. [*Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А., Кучеряну В.Г., Шпрах З.С.* Продолжительность жизни и соматический статус высокораковых мышей при воздействии фитоадаптогена в раннем онтогенезе // Бюлл. эксп. биол. мед. 2017. Т. 163. № 6. С. 755.]
16. *Бочаров Е.В., Бочарова О.А., Карпова Р.В., Кучеряну В.Г., Казеев И.В., Иноземцева Е.С., Соловьев Ю.Н., Шпрах З.С.* Регуляция иммуноадгезивных взаимодействий мультифитоадаптогеном в профилактике спонтанных гепатокарцином // Росс. биотерапевтический журн. 2018. Т. 17. № 2. С. 69.
17. *Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А., Уютова Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В., Бочаров Е.В., Быков В.А.* Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ // Вопр. биол., мед. фарм. хим. 2012. № 10. С. 52.
18. *Бочарова О.А., Барышников А.Ю.* Фитоадаптогены в онкологии. М.: ЗооМедВет, 2004.
19. *Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G.* Aralia elata var. mandshurica (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies // Phytomedicine. 2016. V. 23. № 12. P. 1409.
20. *Карпова Р.В., Шевченко В.Е., Бочаров Е.В., Шейченко О.П., Бочарова О.А., Кучеряну В.Г., Быков В.А.* Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах // Росс. биотерапевтический журн. 2016. Т. 15. № 2. С. 36.