

*На правах рукописи*



ШЕВЛЯКОВА ОЛЕСЯ АЛЕКСАНДРОВНА

Определение флавоноидов горянки и их метаболитов методом тандемной  
хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В.Ломоносова).

*Научный руководитель:*

кандидат химических наук, старший научный сотрудник **Родин Игорь Александрович**

*Официальные оппоненты:*

**Савельева Елена Игоревна,**

доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии, ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

**Григорьев Андрей Михайлович,**

кандидат химических наук, судебный эксперт (химик-эксперт), ГБУЗ МО «Бюро судебно-медицинской экспертизы»

*Ведущая организация:*

**ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Защита состоится 5 октября 2016 г. в 15 ч 00 мин в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова <http://www.chem.msu.su>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Моногорова О.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Наиболее древнее и актуальное направление фармацевтической химии связано с созданием лекарственных средств и биологически активных добавок к пище на основе растительного сырья, в состав которого входят сотни или даже тысячи различных соединений. Терапевтический эффект, как правило, обусловлен синергизмом нескольких компонентов.

Исследование качественного и количественного состава компонентов растительного сырья и препаратов на его основе проводится как при поиске новых биологически активных соединений и реализуемых с их помощью фармакологических эффектов, так и при контроле качества сырья и готовых лекарственных форм известных препаратов. Государственной Фармакопеей РФ регулируется лишь групповое определение флавоноидов методами титриметрии и спектрофотометрии, в то время как ввиду различающихся биологических эффектов разных представителей этого ряда необходима их индивидуальная идентификация в растительном сырье. Согласно федеральному закону №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» при регистрации новых препаратов необходимо проводить исследование метаболизма и фармакокинетики активных фармакологических ингредиентов.

Открытие новых фармакологических эффектов флавоноидов инициировало более пристальное внимание исследователей к растениям рода *Epimedium*, широко используемым в рамках традиционной медицины в Китае, Корее и на Дальнем Востоке. В последние годы опубликовано большое количество работ, посвященных исследованию состава флавоноидов, характерных для некоторых представителей этого рода. При этом состав флавоноидов горянки исчерпывающим образом изучен не был. Основными действующими веществами горянки являются флавоноиды: икариин, икаритин, икаризиды I, II, эпимедины А, В, С, обладающие широким спектром биологической активности: противоопухолевой, андрогенной, антидепрессантной, антиостеопорозной и иммуномодулирующей. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения обеспечивает надежную идентификацию не только действующих веществ горянки, но и их метаболитов, благодаря высокоселективному разделению исследуемых смесей и информативным спектрам. Ограниченность доступной из литературы информации о составе флавоноидов растений рода *Epimedium* и их масс-спектрометрических характеристиках не позволяла установить общие закономерности их фрагментации. Таким образом, возникла необходимость углубленного хроматомасс-спектрометрического исследования комплекса биоактивных соединений горянки. Значительная вариабельность состава экстрактивных компонентов в различных образцах растительного сырья обуславливает необходимость

разработки селективного, чувствительного и экспрессного способа определения активных компонентов горянки в растительном сырье и их метаболитов в биологических образцах.

**Цель работы** состояла в разработке способа определения биологически активных веществ растений рода *Epimedium* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения и апробация разработанного подхода при обнаружении метаболитов флавоноидов горянки с использованием полученной из экспериментальных данных информации о путях фрагментации исследуемой группы веществ.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- изучение процессов ионизации и путей фрагментации исследуемой группы веществ в условиях ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения, оптимизация условий получения масс-спектров;
- обоснование режима экстрагирования флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода;
- выбор условий хроматографического разделения исследуемой группы веществ;
- разработка алгоритма обнаружения флавоноидов горянки на основе закономерностей фрагментации;
- выбор условий подготовки биологических проб, обеспечивающих эффективное извлечение определяемых соединений, изучение влияния матрицы на степень ионизации;
- обнаружение метаболитов биологически активных веществ горянки в моче лабораторных животных.

### **Научная новизна.**

1. Изучены процессы формирования масс-спектров биологически активных компонентов горянки. Установлены закономерности, связывающие структуру икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В (последовательность углеводных заместителей) со значениями  $m/z$  в спектрах в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР). Обнаружены характеристичные сигналы в масс-спектрах ( $m/z$  369,1333 и 313,0707), позволяющие относить неизвестные флавоноиды горянки к данному классу соединений.

2. Разработан способ извлечения флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода, обеспечивающий более эффективное извлечение (в 2,5 раза) определяемых соединений из растительных материалов и продуктов на их основе по сравнению с жидкостной экстракцией этанолом под действием ультразвука.

3. Разработан селективный способ определения икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С в растительном сырье и продуктах на его основе с использованием масс-спектрометрического (МС) детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов, характеризующийся низкими пределами обнаружения и высокой

селективностью. Продемонстрирована возможность применения этого способа для контроля качества продуктов на основе горянки.

4. Выбраны условия подготовки проб мочи, обеспечивающие максимальную степень извлечения аналитов (93-98%) и позволяющие минимизировать влияние матрицы (матричный фактор составляет 0,94-0,98), на аналитический сигнал при сорбционном концентрировании на картриджах, заполненных модифицированным полимером стирола.

5. Предложены способ детектирования флавоноидов горянки и алгоритм, позволяющие проводить обнаружение структурных фрагментов флавоноидов горянки на основании закономерностей фрагментации, заключающийся в получении тандемных масс-спектров в режиме зависимого сканирования ионов-продуктов с предварительно установленными значениями нейтральных потерь ( $m/z$  132,0423, 146,0579 и 162,0528).

6. Применение разработанного подхода позволило обнаружить шесть метаболитов, ранее не описанных в литературе, в моче крыс и предположить их возможные структуры, соответствующие полученным результатам с использованием программ ACDLabs/biotransformation maps, ACDLabs/Percepta, MetWork.

#### **Практическая значимость.**

Разработанный способ апробирован при контроле качества растительного сырья и продуктов на его основе. Показано, что использование метода ВЭЖХ-МС/МС позволяет проводить надежное обнаружение и оценивать содержание икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С – основных действующих компонентов различных видов горянки, что может быть использовано для выявления фактов фальсификации растительного сырья и лекарственных средств на его основе.

На основании полученных результатов разработана, аттестована и внесена в реестр аттестованных методик измерения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии «Росстандарт» методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризидов I, икаризидов II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии (№6.00163/2-28-2016 от 28.03.16).

#### **На защиту выносятся следующие положения:**

1. Исследование закономерностей формирования масс-спектров флавоноидов горянки в условиях электрораспылительной ионизации показывает, что в масс-спектрах данных аналитов присутствуют характеристичные сигналы, позволяющие проводить групповое обнаружение соединений, относящихся к данному классу.

2. Использование экстрагирования флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода увеличивает степень извлечения в 2,5 раза по сравнению с жидкостной экстракцией.

3. Разработанная методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в растительных продуктах на основе горянки методом ВЭЖХ-МС/МС позволяет снизить пределы обнаружения и повысить селективность определения аналитов.

4. Разработанный способ подготовки проб мочи обеспечивает высокую степень извлечения аналитов и позволяет минимизировать влияние матрицы на ионизацию определяемых соединений.

5. Разработанный алгоритм обнаружения флавоноидов горянки на основании закономерностей формирования масс-спектров стандартных образцов веществ известной структуры позволяет выявлять ранее неизвестные метаболиты и делать предположения о возможных структурах обнаруженных соединений.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина (г. Чебоксары, 2014 г.), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (г. Самара, 2015 г.), VI Российско-корейской конференции «Современные достижения химии биологически активных веществ и биотехнологии» (г. Новосибирск, 2015 г.), IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых учёных «Химия и технология растительных веществ» (г. Москва, 2015 г.), I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (г. Москва, 2015 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, двух глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 132 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 29 рисунков и 21 таблицу, в списке цитируемой литературы 214 источников. Приложение включает 7 рисунков, 1 таблицу и 1 методику на 47 страницах.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования.

В обзоре литературы, представленном в **первой главе**, кратко рассмотрены и обобщены известные данные о флавоноидах растений рода *Epimedium*. Показано большое разнообразие действующих компонентов горянки, присутствующих в различных соотношениях в растительном сырье и продуктах на его основе. Рассмотрены способы

традиционной обработки листьев растений из рода *Epimedium* и существующие подходы извлечения и подготовки проб, используемые для приготовления лекарственных средств и других продуктов, а также для анализа этих объектов. Систематизированы данные о современных способах определения флавоноидов горянки в растительных материалах и продуктах на его основе. Обоснована ключевая роль метода жидкостной хроматографии для разделения флавоноидов, показаны преимущества методик с применением масс-спектрометрического детектирования. Рассмотрены существующие способы подготовки биологических проб, методы их анализа и программное обеспечение, используемое для поиска метаболитов. Отмечены достоинства и недостатки рассмотренных подходов.

Во **второй главе** перечислены материалы и методы, применявшиеся в работе, а также описаны методики экспериментов. Исследования проводили на следующем хроматографическом оборудовании: высокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 RS, оснащенный автосамплером, градиентным насосом, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки, соединенном с гибридным масс-спектрометром QExactive с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения («Thermo Scientific», США) с двумя источниками ионизации – ХИАД (химическая ионизация при атмосферном давлении) и ИЭР (ионизация электрораспылением), или с трибридным масс-спектрометром Orbitrap Fusion высокого разрешения («Thermo Scientific», США) с источником ионизации – ИЭР. В работе использовали хроматографическую колонку Hypersil Gold aQ, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм с предколонкой («Thermo Scientific», США).

Экстракцию сверхкритическим диоксидом углерода осуществляли на лабораторной установке производства компании «Waters Corporation», США, модели SFE-100.

**Третья глава** посвящена изучению масс-спектрометрического и хроматографического поведения флавоноидов горянки, а также способов их извлечения из различных объектов со сложной матрицей. Исследования действующих компонентов горянки проводили на примере характерных представителей данного класса соединений: икариина, икаритина, икаризидов I, II и эпимединов A, B. Изучали их масс-спектрометрическое поведение в вариантах ХИАД и ИЭР. Установлено, что в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов образуются депротонированные молекулы аддукта икариина, икаризида I, эпимединов A, B с муравьиной кислотой (компонентом подвижной фазы)  $[M+HCOOH-H]^-$  и депротонированные молекулы  $[M-H]^-$  икаритина и икаризида II. Масс-спектры первого порядка имеющих стандарты в условиях регистрации положительно заряженных ионов содержат интенсивный ион  $[M+H]^+$ . Согласно результатам экспериментов, при ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов отношение сигнал-шум выше, а масс-спектры имеют более интенсивные характеристичные сигналы.

Далее исследовали возможность получения интенсивных сигналов характеристичных фрагментных ионов в ячейке соударений. Для каждого аналита выбрали оптимальные значения энергии соударений и ионные переходы (табл. 1).

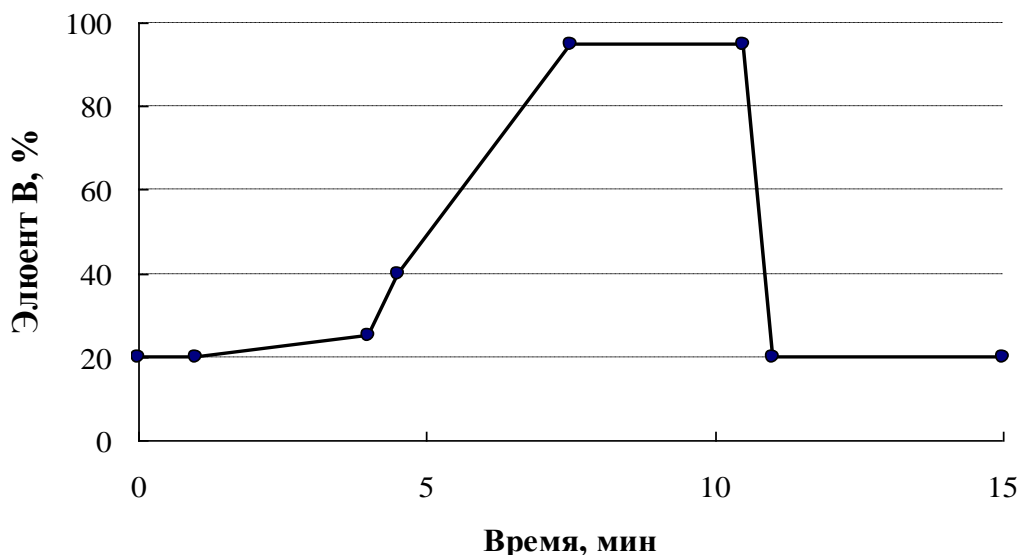
**Таблица 1.** Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых флавоноидов в режиме регистрации положительно заряженных ионов

| Определяемое вещество | Ион-предшественник $[M+H]^+$ , Да | Брутто-формула иона-предшественника | Энергия соударений, В | Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %) | Брутто-формулы фрагментных ионов       |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--|--|
| Эпимедин А            | 839,2968                          | $C_{39}H_{51}O_{20}$                | 30                    | 369,1333 (100)<br>313,0707 (15)              | $C_{21}H_{21}O_6$<br>$C_{17}H_{13}O_6$ |
| Эпимедин В            | 809,2863                          | $C_{38}H_{49}O_{19}$                | 30                    | 369,1333 (100)<br>313,0707 (15)              | $C_{21}H_{21}O_6$<br>$C_{17}H_{13}O_6$ |
| Икаризид I            | 531,1861                          | $C_{27}H_{31}O_{11}$                | 40                    | 369,1333 (55)<br>313,0707 (100)              | $C_{21}H_{21}O_6$<br>$C_{17}H_{13}O_6$ |
| Икаризид II           | 515,1912                          | $C_{27}H_{31}O_{10}$                | 40                    | 369,1333 (55)<br>313,0707 (100)              | $C_{21}H_{21}O_6$<br>$C_{17}H_{13}O_6$ |
| Икариин               | 677,2440                          | $C_{33}H_{41}O_{15}$                | 40                    | 369,1333 (35)<br>313,0707 (100)              | $C_{21}H_{21}O_6$<br>$C_{17}H_{13}O_6$ |
| Икаритин              | 369,1333                          | $C_{21}H_{21}O_6$                   | 50                    | 313,0707 (100)<br>243,0652 (15)              | $C_{17}H_{13}O_6$<br>$C_{14}H_{11}O_4$ |

Для всех исследуемых компонентов удалось выделить общие закономерности путей фрагментации в ячейке соударений. Для установления возможных структур фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0. Из представленных структур фрагментных ионов с помощью программы HyperChem версии 7 выбрали наиболее вероятные с наименьшей энергией образования, вычисленной с помощью полуэмпирического квантово-химического метода AM1. Расчётные и экспериментальные значения  $m/z$  отличались менее чем на 5 м.д. (миллионных долей).

Хроматографическое разделение флавоноидов горянки осуществляли в режиме обращенно-фазового градиентного элюирования (рис. 1). В качестве элюентов выбрали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (элюент А) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В).





**Рис. 1.** Программа градиентного элюирования.

Параметры хроматографического разделения анализов приведены в таблице 2 (при расчётах использовали величину мёртвого времени, равного 0,7 мин).

**Таблица 2.** Параметры хроматографического разделения икариина, икаритина, эпимединов А, В и икаризидов I, II на колонке Нуперсил Gold aQ (150 × 2,1 мм, размер зерна сорбента 3 мкм) при скорости потока 0,6 мл/мин

| Вещество    | Время удерживания, мин | Разрешение пиков | Коэффициент селективности |
|-------------|------------------------|------------------|---------------------------|
| Эпимедин А  | 3,67                   | 1,6              | 1,1                       |
| Эпимедин В  | 3,93                   | 2,1              | 1,1                       |
| Икариин     | 4,41                   | 10,9             | 1,4                       |
| Икаризид I  | 5,87                   | 4,5              | 1,1                       |
| Икаризид II | 6,01                   | 6,2              | 1,2                       |
| Икаритин    | 6,99                   | -                | -                         |

Для апробации разработанного способа определения флавоноидов проанализировали 3 препарата на основе горянки (табл. 3).

**Таблица 3.** Содержания флавоноидов, определённые в режиме сканирования по выбранным ионным переходам, в образцах экстракта *Epimedium brevicornum*, чая с экстрактом *Epimedium koreanum* и настойки из *Epimedium koreanum* (N=3, P=0,95)

| № п/п | Образец                               | Содержание, мг/г             |                              |                             |                             |                             |                              |
|-------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|       |                                       | Эпимедин А                   | Эпимедин В                   | Икариин                     | Икаризид I                  | Икаризид II                 | Икаритин                     |
| 1     | Экстракт <i>Epimedium brevicornum</i> | 28±2                         | 40±4                         | 153±10                      | 2,6±0,3                     | 31±3                        | 1,0±0,1                      |
| 2     | Чай с <i>Epimedium koreanum</i>       | (12,1±0,6) ×10 <sup>-2</sup> | (16,6±0,2) ×10 <sup>-2</sup> | (7,0±0,6) ×10 <sup>-1</sup> | (1,2±0,1) ×10 <sup>-2</sup> | (2,3±0,2) ×10 <sup>-2</sup> | (6,2±0,2) ×10 <sup>-4</sup>  |
| 3     | Настойка из <i>Epimedium koreanum</i> | 2,7±0,2                      | 3,6±0,5                      | 10,1±0,2                    | (1,1±0,1) ×10 <sup>-1</sup> | (6,8±0,8) ×10 <sup>-1</sup> | (11,8±0,8) ×10 <sup>-3</sup> |

Расчёт содержаний аналитов проводили согласно построенным уравнениям градуировочной зависимости (табл. 4).

**Таблица 4.** Метрологические характеристики разработанной методики определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС

| Вещество    | Диапазон линейности градуировочного графика, мкг/мл | Уравнение градуировочной зависимости    | S <sub>r</sub> , % | Предел обнаружения в водном растворе, мкг/мл |
|-------------|---|---|--------------------|--|
| Эпимедин А  | 0,001-25  | $y=2,2 \times 10^4 x + 2,7 \times 10^6$ | 9                  | 0,0005                                       |
| Эпимедин В  | 0,001-25  | $y=2,1 \times 10^4 x + 3,0 \times 10^6$ | 8                  | 0,0005                                       |
| Икариин     | 0,002-25  | $y=4,4 \times 10^4 x + 9,2 \times 10^6$ | 10                 | 0,0007                                       |
| Икаризид I  | 0,001-10  | $y=5,1 \times 10^4 x + 1,9 \times 10^7$ | 11                 | 0,0005                                       |
| Икаризид II | 0,001-10  | $y=6,3 \times 10^4 x + 4,7 \times 10^7$ | 12                 | 0,0005                                       |
| Икаритин    | 0,003-25  | $y=1,0 \times 10^5 x + 2,0 \times 10^7$ | 10                 | 0,0009                                       |

Предложенный нами способ определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС/МС отличается хорошей селективностью по отношению к основным компонентам горянки и низкими пределами обнаружения. Данный способ обладает широким диапазоном линейности градуировочного графика и может применяться для количественного анализа как растительных экстрактов, так и фитопродуктов, а также биологически активных добавок на основе горянки.

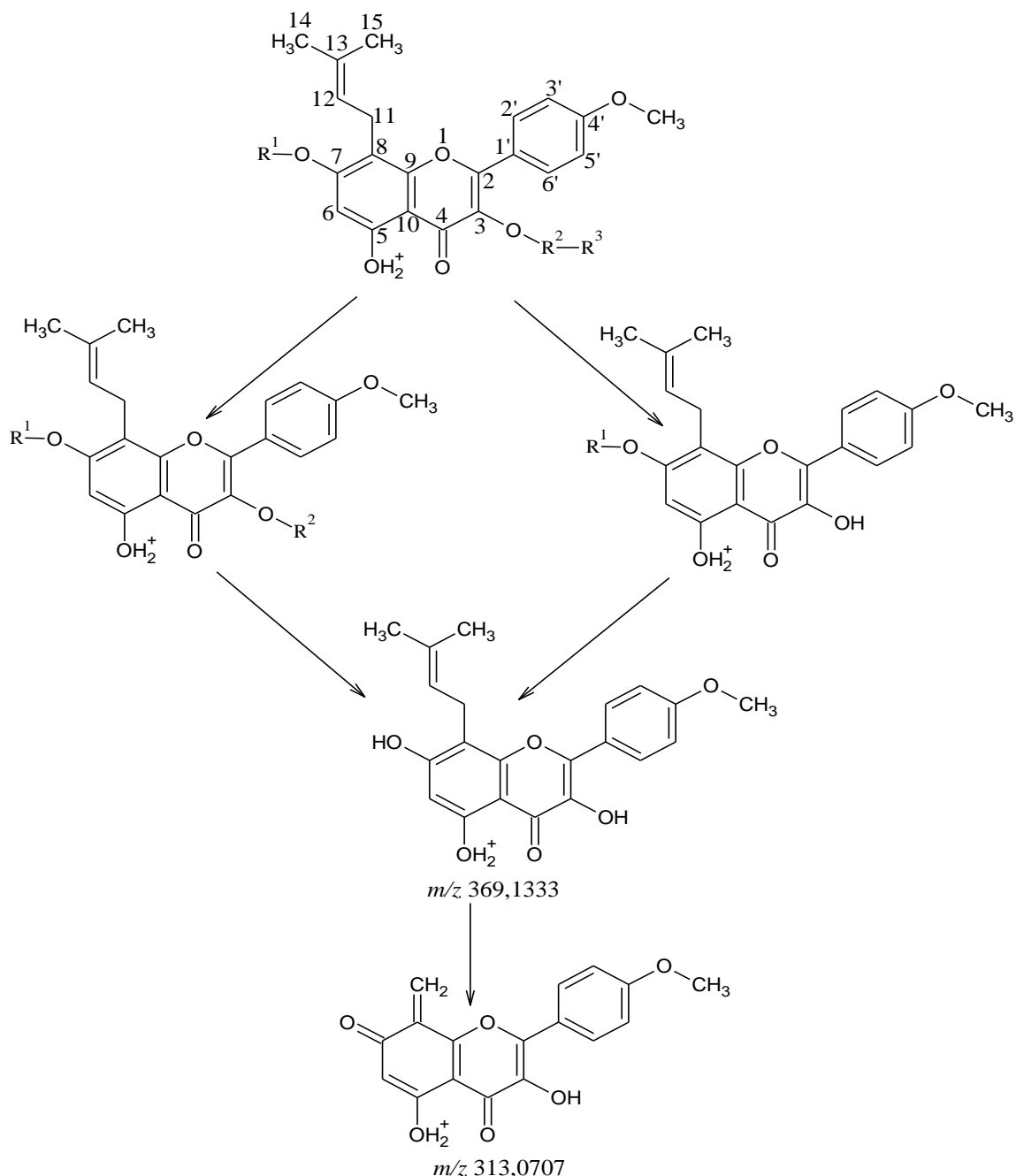
На основании полученных результатов разработана, аттестована и внесена в реестр аттестованных методик измерения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии «Росстандарт» методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии (№6.00163/2-28-2016 от 28.03.16).

Для обнаружения флавоноидов горянки в матрице растительного экстракта методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения подробно изучили фрагментацию данных соединений. Исследования проводили с помощью диссоциации, индуцируемой соударением. Ионная диссоциация протонированных молекул происходит в линейной ионной ловушке благодаря столкновению с молекулами инертного газа – гелия. Проводя исследования при энергии соударений в диапазоне 10 - 50 В с шагом 10 В, выбрали энергию 20 В, при которой наблюдается появление первых ионов-продуктов. Происходит отщепление углеводных заместителей (табл. 5): рамнозного – у икариина (с образованием иона с  $m/z$  531,1861) и икаризида II ( $m/z$  369,1333), глюкозного – у икаризида I ( $m/z$  369,1333) и эпимедина А ( $m/z$  677,2440), ксилозного – у эпимедина В ( $m/z$  677,2440).

**Таблица 5.** Характеристичные фрагментные ионы флавоноидов горянки в МС<sup>n</sup>-спектрах, полученных в условиях диссоциации, индуцируемой соударением

| Соединение   |             | МС                                     | МС <sup>2</sup>   | МС <sup>3</sup>   | МС <sup>4</sup>  |
|--|-------------|--|---|---|--|
| [ион-предшественник]: <i>m/z</i> ( <i>I<sub>отн</sub></i> %) | Икариин     | 677,2440<br>(100)                      | [677,2440]:<br>531,1861 (100),<br>677,2440 (30),<br>369,1333 (10) | [677,2440→531,1861]:<br><b>369,1333</b> (100),<br><b>313,0707</b> (10)                      | -  |
|  | Икаритин    | 369,1333<br>(100),<br>313,0707 (5)     | [369,1333]:<br><b>313,0707</b> (100),<br><b>369,1333</b> (55)     | -   | -  |
|  | Икаризид I  | 531,1861<br>(100)                      | [531,1861]:<br><b>369,1333</b> (100)<br><b>313,0707</b> (10)      | -   | -  |
|  | Икаризид II | 515,1912<br>(100),<br>369,1333<br>(40) | [515,1912]:<br><b>369,1333</b> (100)<br><b>313,0707</b> (10)      | -   | -  |
|  | Эпимедин А  | 839,2968<br>(100)                      | [839,2968]:<br>677,2440 (100),<br>531,1861 (70),<br>839,2968 (20) | [839,2968→677,2440]:<br>531,1861 (100),<br>677,2440 (30),<br>369,1333 (10),<br>839,2968 (3) | [839,2968→677,2440→<br>531,1861]:<br><b>369,1333</b> (100)<br><b>313,0707</b> (10) |
|  | Эпимедин В  | 809,2863<br>(100)                      | [809,2863]:<br>677,2440 (100),<br>531,1861 (50),<br>809,2863 (40) | [809,2863→677,2440]:<br>531,1861 (100),<br>677,2440 (30),<br>369,1333 (10),<br>809,2863 (5) | [809,2863→677,2440→<br>531,1861]:<br><b>369,1333</b> (100)<br><b>313,0707</b> (10) |

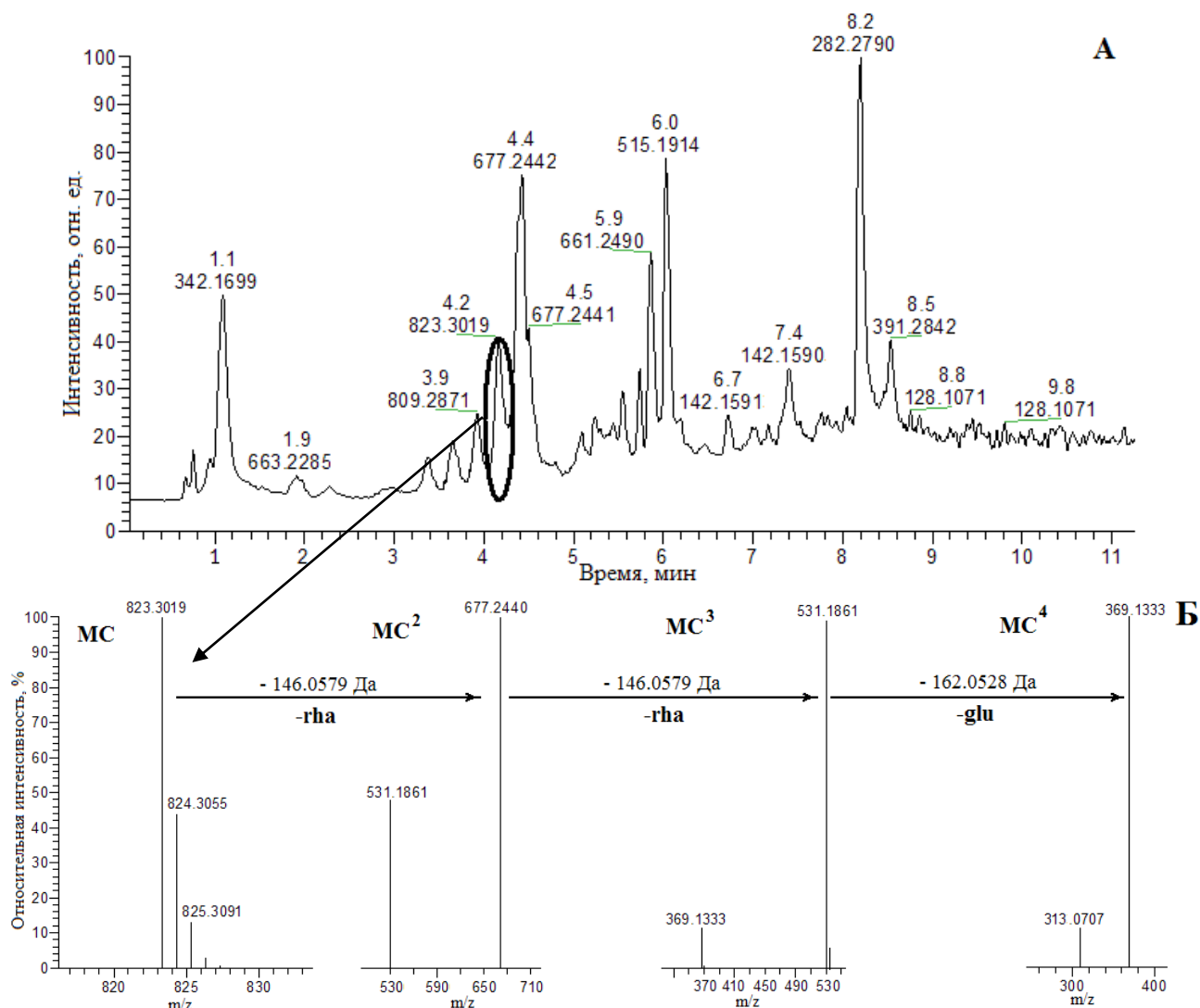
При дальнейшей фрагментации наблюдается последовательное отщепление углеводных заместителей, при этом сначала происходит потеря углеводных групп в положении С3, затем в положении С7 с образованием иона-продукта с *m/z* 369,1333, а перегруппировка изопентеновой группы в положении С8 приводит к появлению фрагментного иона с *m/z* 313,0707. Таким образом, *m/z* 369,1333 и 313,0707 являются характеристичными сигналами в масс-спектрах при обнаружении неизвестных флавоноидов горянки и их отнесении к данному классу соединений, так как соответствуют фрагментам, общим для действующих соединений растений рода *Epimedium*. На основании предполагаемых структур характеристичных фрагментных ионов, полученных с помощью программ HighChem Mass Frontier и HyperChem, предположена и представлена на рисунке 2 схема фрагментации флавоноидов горянки.



**Рис. 2.** Предположительная схема фрагментации флавоноидов горянки, где для икариина:  $R^1$  - глюкозил,  $R^2$  - рамнозил,  $R^3$  - водород; для икаритина:  $R^1, R^2, R^3$  - водород; для икаризида I:  $R^1$  - глюкозил,  $R^2, R^3$  - водород; для икаризида II:  $R^1, R^3$  - водород,  $R^2$  - рамнозил; для эпимедина А:  $R^1, R^3$  - глюкозил,  $R^2$  - рамнозил; для эпимедина В:  $R^1$  - глюкозил,  $R^2$  - рамнозил,  $R^3$  - ксилозил.

Метод масс-спектрометрического детектирования с использованием зависимого сканирования при регистрации нейтральных потерь (сигналы в масс-спектрах со значениями  $m/z$  132,0423, 146,0579 и 162,0528, указывающих на отщепление ксилозного, рамнозного и глюкозного остатков, соответственно) позволяет упростить процедуру обнаружения флавоноидов горянки. В данном методе каждое последующее МС сканирование запускается для ионов-продуктов, полученных при предыдущем МС сканировании с предварительно установленными величинами нейтральных потерь.

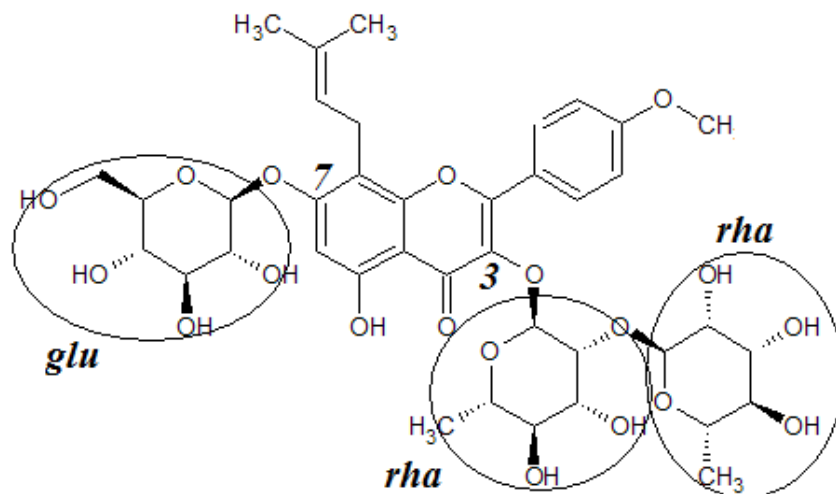
Эффективность разработанного метода подтвердили установлением структуры неизвестного компонента в экстракте горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*), Время выхода аналита составляло 4,2 мин. (рис. 3А).



**Рис. 3.** Хроматограмма по полному ионному току этанольного экстракта горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*) (А) и МС<sup>n</sup>-спектры соединения со временем выхода 4,2 мин (Б).

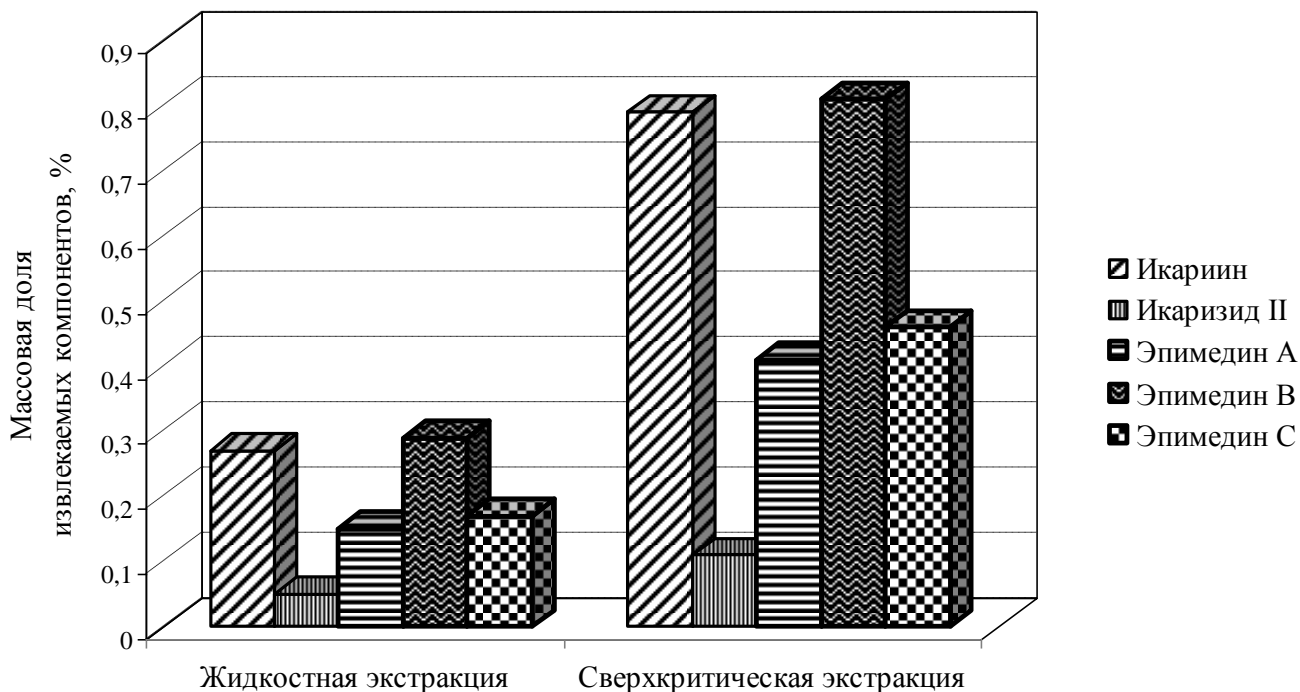
В МС<sup>4</sup>-спектре данного соединения присутствовали ионы с  $m/z$  369,1333 и 313,0707, указывающие на принадлежность к флавоноидам горянки (рис. 3Б). Фрагментный ион с  $m/z$  531,1861 в МС<sup>3</sup>-спектре отличается от иона с  $m/z$  369,1333 в МС<sup>4</sup>-спектре на 162,0528 Да, что соответствует отщеплению глюкозного остатка, вероятно, в положении С7, так как именно при этом углеродном атоме связь с углеводной группой более стабильна, чем при С3. Ион-продукт с  $m/z$  677,2440 в МС<sup>2</sup>-спектре отличается от иона с  $m/z$  531,1861 в МС<sup>3</sup>-спектре на массу рамнозного остатка (146,0579 Да), а МС<sup>2</sup>-спектр неизвестного соединения подобен МС-спектру икариина, что указывает на рамнозный заместитель в структуре исследуемого компонента в положении С3. Масс-спектр первого порядка содержит интенсивный ион с  $m/z$  823,3019, который, вероятно, соответствует протонированной молекуле  $[M+H]^+$ , а

нейтральная потеря 146,0579 Да в МС<sup>2</sup>-спектре показывает наличие двух рамнозных групп в положении С3. Таким образом, предполагаемая структура неизвестного соединения соответствует эпимедину С (рис. 4). Для дополнительного подтверждения структуры соединения полученные результаты сравнили с хроматографическими параметрами и фрагментацией стандартного образца эпимедина С.



**Рис. 4.** Структурная формула эпимедина С (брутто-формула  $C_{39}H_{50}O_{19}$ ,  $M=822,2946$ ), где glu – глюкозил, rha – рамнозил.

Качество препаратов, создаваемых на основе растительного сырья, зависит от технологий извлечения БАВ из лекарственных растений, поэтому, помимо разработки способов МС детектирования и количественной оценки содержания флавоноидов горянки, был предложен быстрый и эффективный способ экстракции фармакологически активных ингредиентов из растительного сырья. В настоящее время технология экстрагирования сверхкритическими газами рассматривается в качестве одного из наиболее перспективных методов. Была показана возможность применения экстракции сверхкритическим диоксидом углерода биологически активных соединений из листьев горянки коротконожковой (*Epimedium Brevicornum*). Для этого было изучено влияние на эффективность извлечения таких параметров, как температура, давление, время, и была проведена сравнительная оценка количественного содержания икариина, икаризида II, эпимединов А, В, С в экстрактах листьев горянки коротконожковой, полученных методом экстракции сверхкритическим диоксидом углерода и жидкостной экстракцией с применением ультразвука. В результате экспериментов было установлено, что максимальный выход действующих компонентов достигается при температуре 50 °С, давлении 30 МПа и продолжительности 30 минут (в качестве со-растворителя использовали 80%-ный этанол), а суммарное количество извлекаемых компонентов методом СК-СО<sub>2</sub> при данных параметрах в 2,5 раза выше, чем с помощью жидкостной экстракции этанолом под действием ультразвука (рис. 5).



**Рис. 5.** Выход извлекаемых компонентов при использовании различных методов экстракции.

Были исследованы различные способы экстракции икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В из мочи и влияние матрицы на степень ионизации при определении действующих компонентов. В качестве модельной биологической жидкости использовали мочу человека. Учитывая свойства аналитов, метод анализа и объект исследований было выбрано несколько направлений разработки процедур подготовки проб:

1. Анализ супернатанта после обессоливания ацетонитрилом и центрифугирования.

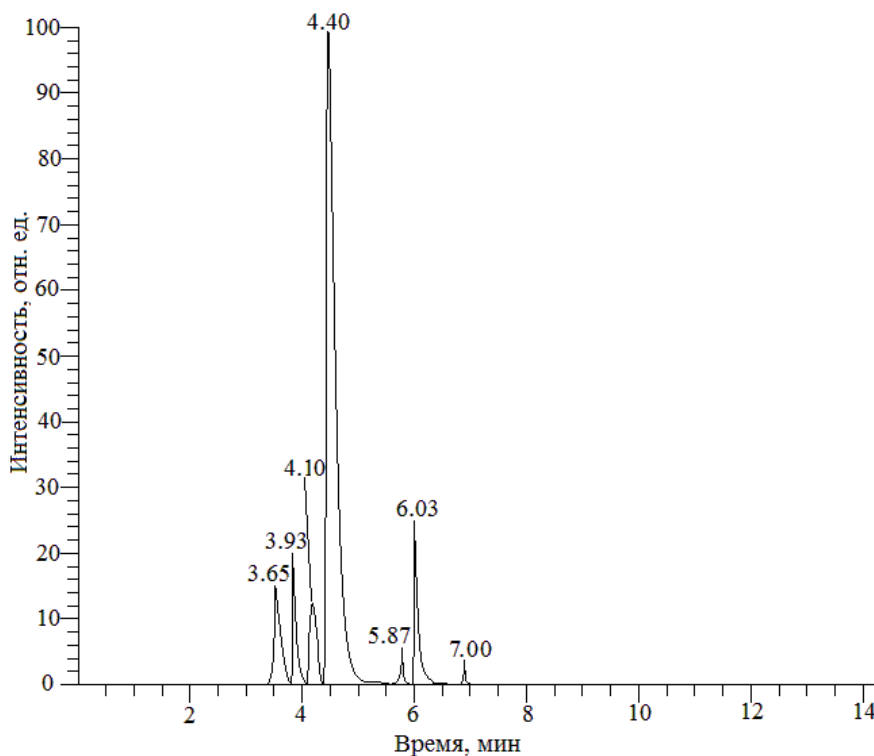
2. Жидкостно-жидкостная экстракция с предшествующим ферментативным гидролизом и без него в щелочной, нейтральной и кислой средах с использованием экстрагирующих систем с разными индексами полярности, таких как хлористый метилен; ацетонитрил; смесь диэтилового и трет-бутилметилового эфиров в соотношении 9:1 (по объёму); смесь гексана с хлористым метиленом в соотношении 85:15 (по объёму); смесь изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму).

3. Сорбционное концентрирование на картриджах SUPELCO DSC-18 и HLB.

В результате экспериментов была выбрана процедура подготовки проб, включающая в себя сорбционное концентрирование на картриджах SUPELCO HLB, представляющих собой модифицированный полимер стирола, элюирование метанолом и концентрирование элюата в токе азота с последующим перерастворением сухого остатка в подвижной фазе В. При этом наблюдалась максимальная степень извлечения аналитов (93-98%) и минимальное влияние матрицы на степень ионизации (матричный фактор составил 0,94-0,98).

При использовании оптимизированных условий тандемного масс-спектрометрического детектирования в сочетании с выбранной процедурой подготовки проб, помимо основных действующих компонентов горянки: икариина, икаритина,

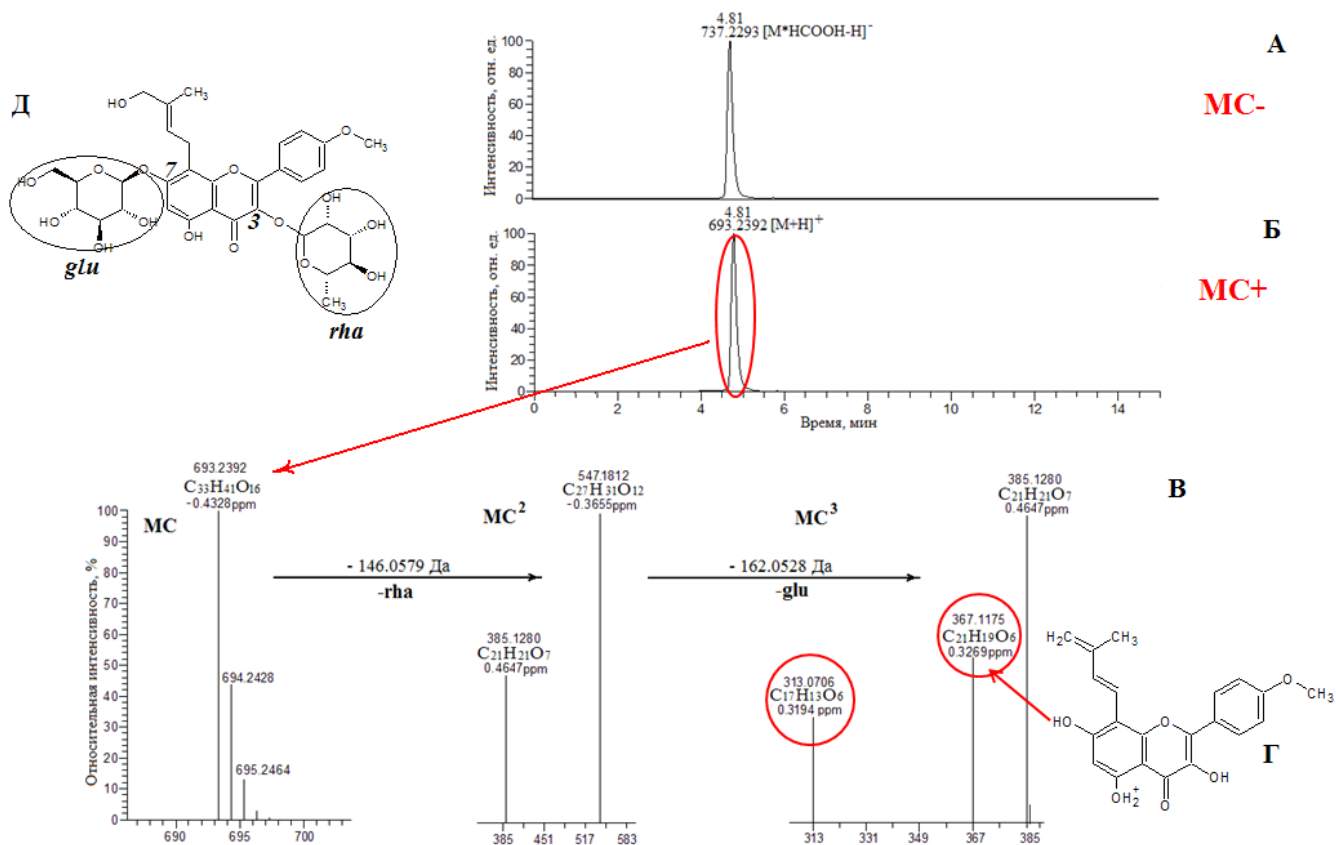
икаризидов I, II, эпимединов А, В, С (рис. 6) в моче крыс удалось обнаружить несколько соединений, отсутствующих в экстракте горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*) и в бланковых образцах мочи. Обнаруженные соединения предположительно отнесены к метаболитам (М1-6). Для установления возможной структуры метаболитов были изучены МС<sup>n</sup>-спектры данных соединений.



**Рис. 6.** Хроматограмма в режиме сканирования по выбранным ионным переходам мочи крыс через 12 часов после приёма экстракта горянки.

В МС<sup>3</sup>-спектре соединения М1 со временем выхода 4,8 мин присутствовал ион с  $m/z$  313,0707, указывающий на структурное родство с флавоноидами горянки (рис. 7В). Ион с  $m/z$  367,1175 отличается от характеристичного для флавоноидов фрагментного иона 369,1333 на 2,0158 Да, что говорит о наличии двойной связи, возможно, вследствие отщепления гидроксильной группы в изопентеновой цепи (рис. 7Г). Фрагментный ион с  $m/z$  547,1812 в МС<sup>2</sup>-спектре отличается от иона с  $m/z$  385,1280 в МС<sup>3</sup>-спектре на 162,0528 Да, что соответствует отщеплению глюкозного остатка, вероятно, в положении С7, так как именно при этом углеродном атоме связь с углеводной группой более стабильна, чем при С3. Ион-продукт с  $m/z$  693,2392 в масс-спектре первого порядка отличается от иона с  $m/z$  547,1812 в МС<sup>2</sup>-спектре на массу рамнозного остатка (146,0579 Да), что указывает на данный заместитель в структуре исследуемого компонента, возможно, в положении С3. Интенсивный ион с  $m/z$  693,2392 в МС-спектре, вероятно, соответствует протонированной молекуле  $[M+H]^+$  (рис. 7Б), а ион с  $m/z$  737,2293 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов - депротонированной молекуле аддукта с муравьиной кислотой (рис. 7А).





**Рис. 7.** Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с  $m/z$  737,2293 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с  $m/z$  693,2392 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б);  $MC^n$ -спектры соединения со временем выхода 4,81 мин (В); предположительная структура фрагментного иона с  $m/z$  367,1175 (Г); возможная структура метаболита М1 (Д).

Полученные данные были сопоставлены с результатами автоматической идентификации с помощью программного обеспечения ACDLabs/ biotransformation maps (версии 14.0), ACDLabs/Percepta, указывающими на гидроксирование в положении С14 или С15 как возможный путь метаболизма. Наиболее вероятная структура метаболита М1 представлена на рисунке 7Д. С применением программы метаболомного анализа полученных хроматомасс-спектрометрических данных MetWorks версии 1.3 фирмы «Thermo Scientific» в экстрактах мочи крыс было подтверждено наличие данного метаболита.

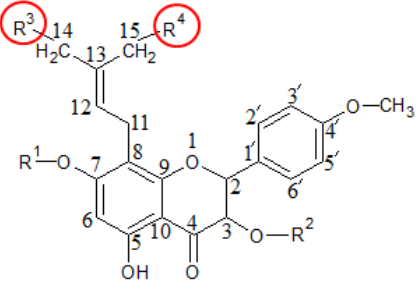
Разработанный на базе проведенных исследований алгоритм интерпретации данных, полученных методом ВЭЖХ-МС<sup>n</sup> в режиме зависимого сканирования ионов-продуктов с предварительно установленными значениями нейтральных потерь ( $m/z$  132,0423, 146,0579 и 162,0528), состоит в следующем:

1. Поиск в спектрах  $m/z$  характеристичных фрагментных ионов флавоноидов горянки ( $m/z$  369,1333 (367,1176) и 313,0707).
2. Установление структуры соединения на основании характерной фрагментации (последовательное отщепление углеводных заместителей: сначала происходит потеря групп в положении С3, затем в положении С7).
3. Сравнение экспериментальных значений  $m/z$  с теоретическими (расхождение не более 5 м.д.).

4. Сопоставление полученных данных с результатами программного обеспечения ACDLabs/ biotransformation maps (версии 14.0), ACDLabs/Percepta, MetWork (версии 1.3).

С использованием данного алгоритма были обнаружены также метаболиты M2-M6, вероятные структуры которых приведены в таблице 6, а характеристичные фрагментные ионы в MS<sup>n</sup>-спектрах в таблице 7.

**Таблица 6.** Предположительные структуры метаболитов флавоноидов горянки

| Метаболит |  |                |                |                |          | Моноизотопная масса, Да |
|-----------|--|----------------|----------------|----------------|----------|-------------------------|
|           | R <sup>1</sup>   | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | R <sup>4</sup> |          |                         |
| M1        | glu  | rha            | OH             | H              | 692,2316 |                         |
| M2        | glu  | H              | OH             | H              | 546,1737 |                         |
| M3        | H  | rha            | OH             | H              | 530,1788 |                         |
| M4        | glu  | rha-(1-2)glu   | OH             | H              | 854,2845 |                         |
| M5        | glu  | rha-(1-2)xyl   | OH             | H              | 824,2739 |                         |
| M6        | glu  | rha-(1-2)rha   | OH             | H              | 838,2895 |                         |

Примечание: rha – рамнозил, glu – глюкозил, xyl - ксилонил

**Таблица 7.** Характеристичные фрагментные ионы метаболитов горянки в MS<sup>n</sup>-спектрах, полученных в условиях диссоциации, индуцируемой соударением

| Соединение | МС                                | МС <sup>2</sup>   | МС <sup>3</sup>   | МС <sup>4</sup>  | [ион-предшественник]: m/z (I <sub>относ</sub> %) |
|------------|-----------------------------------|---|---|--|--|
|            |                                   |   |   |  |  |
| M1         | 693.2392 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [693.2392]:<br>547.1812 (100) [M-rha] <sup>+</sup> ,<br>385.1280 (50)                                 | [547.1812]:<br>385.1280 (100) [M-glu] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) | -  |  |
| M2         | 547.1815 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [547.1815]:<br>385.1280 (100) [M-glu] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) | -   | -  |  |
| M3         | 531.1857 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [531.1857]:<br>385.1280 (100) [M-rha] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) | -   | -  |  |
| M4         | 855.2910 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [855.2910]:<br>693.2390 (100) [M-glu] <sup>+</sup> ,<br>547.1815 (60)                                 | [855.2910→693.2390]:<br>547.1812 (100) [M-glu-rha] <sup>+</sup> ,<br>385.1280 (50)                    | [855.2910→693.2390→<br>547.1812]:<br>385.1280 (100) [M-2glu-rha] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) |  |
| M5         | 825.2820 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [825.2820]:<br>693.2390 (100) [M-xyl] <sup>+</sup> ,<br>547.1815 (60)                                 | [825.2820→693.2390]:<br>547.1812 (100) [M-glu-xyl] <sup>+</sup> ,<br>385.1280 (50)                    | [825.2820→693.2390→<br>547.1812]:<br>385.1280 (100) [M-2glu-xyl] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) |  |
| M6         | 839.2975 (100) [M+H] <sup>+</sup> | [839.2975]:<br>693.2390 (100) [M-rha] <sup>+</sup> ,<br>547.1815 (60)                                 | [839.2975→693.2390]:<br>547.1812 (100) [M-glu-rha] <sup>+</sup> ,<br>385.1280 (50)                    | [839.2975→693.2390→<br>547.1812]:<br>385.1280 (100) [M-2glu-rha] <sup>+</sup> ,<br><b>367.1175</b> (50),<br><b>313.0707</b> (35) |  |

Таким образом, разработанный алгоритм позволяет обнаружить основные флавоноиды горянки и их метаболиты. Полученные сведения о метаболизме флавоноидов горянки являются первым этапом в комплексе биоаналитических исследований, сопровождающих разработку новых фармацевтических рецептур, содержащих флавоноиды горянки.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены закономерности формирования масс-спектров флавоноидов горянки методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Ключевыми этапами фрагментации являются: потеря групп в положении С3; затем в положении С7 с образованием иона-продукта с  $m/z$  369,1333; перегруппировка изопентеновой группы в положении С8, приводящая к появлению иона-продукта с  $m/z$  313,0707. Ионы с  $m/z$  369,1333 и 313,0707 соответствуют характеристичным сигналам, используемым при обнаружении неизвестных флавоноидов горянки. Предложены возможные структуры фрагментных ионов.

2. Разработан способ извлечения флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода. При температуре 50 °С, давлении 30 МПа и продолжительности 30 мин достигается максимальный выход целевых компонентов, в 2,5 раза превышающий количество соединений, извлекаемых жидкостной экстракцией этанолом в ультразвуковом поле.

3. Разработаны условия хроматомасс-спектрометрического определения икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С в растительном сырье и продуктах на его основе в условиях обращенно-фазовой градиентной ВЭЖХ в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для каждого соединения установлены оптимальные значения энергии соударений и определены интенсивные характеристичные ионы-продукты.

4. Разработан алгоритм обнаружения флавоноидов горянки на основании закономерностей фрагментации, заключающийся в получении тандемных масс-спектров в режиме зависящего сканирования с предварительно установленными значениями нейтральных потерь ( $m/z$  132,0423, 146,0579 и 162,0528, соответствующих отщеплению ксилозного, рамнозного и глюкозного остатков, соответственно).

5. Выбрана процедура подготовки образцов мочи к ВЭЖХ-МС/МС анализу, включающая сорбционное концентрирование на картриджах, заполненных модифицированным полимером стирола, элюирование метанолом и концентрирование элюата в токе азота с последующим перерастворением сухого остатка в подвижной фазе, при этом коэффициент извлечения составляет 93-98%, а матричный фактор, характеризующий влияние матрицы, – 0,94-0,98.

6. Разработанный алгоритм апробирован при обнаружении метаболитов флавоноидов горянки в моче крыс. Выявлены ранее не известные метаболиты и предложены их возможные структуры, соответствующие продуктам гидроксирования.

*Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н. И.А. Родину, а также чл.-корр. РАН, О.А. Шпигуну, руководству Федерального государственного унитарного предприятия «Научный центр «Сигнал» и сотрудникам первого научно-исследовательского отдела за помощь при проведении исследований и поддержку в работе над диссертацией.*

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

1. Шевлякова О.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Применение тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для идентификации икариина в растительном сырье // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. № 4. С. 247–254.

2. Шевлякова О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Определение флавоноидов горянки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12. № 2. С. 117-123.

3. Шевлякова О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Извлечение флавоноидов из горянки коротконожковой (*Epimedium Brevicornum* L.) в среде сверхкритического диоксида углерода // Химия растительного сырья. 2015. № 4. С. 51–56.

4. Шевлякова О.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А., Беризовская Е.И., Родин И.А., Шпигун О.А. Современные способы определения и идентификации флавоноидов горянки (*Epimedium*) // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2016. Т. 57. № 3. С. 172–183.

5. Шевлякова О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Определение икариина в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. № 4. С. 316–322.

6. Шевлякова О.А., Шпигун О.А., Митрофанов Д.А., Аксёнов А.В., Таранченко В.Ф., Родин И.А., Беризовская Е.И. Изучение масс-фрагментации флавоноидов *Epimedium Brevicornu* с применением тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения // Современные проблемы химической науки и фармации: тез. докл. Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина. Чебоксары: ООО Издательский дом «Пегас», 2014. С. 71–72.

7. Шевлякова О.А., Шпигун О.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Аксёнов А.В., Родин И.А. Идентификация основных компонентов в экстрактах горянки (*Epimedium*) методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения // Теория и практика хроматографии: тез. докл. Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой памяти проф. М.С. Вигдергауза. Самара: Издательство ООО «Порто-принт», 2015. С. 247.

8. Shevlyakova O.A., Vasil'yev K.J., Ihalaynen A.A., Antokhin A.M., Taranchenko V.F., Mitrofanov D.A., Aksenov A.V., Shchetinina I.A., Rodin I.A., Shpigun O.A. Determination of seven flavonoids in *Epimedium* by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method // Current Issues of Biologically Active Compound Chemistry and Biotechnology: Proc. 6th Russian-Korean Conference. Novosibirsk, 2015. P. 271.

9. Шевлякова О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Митрофанов Д.А., Аксёнов А.В., Щетинина И.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Идентификация икариина в растительном сырье методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения // Химия и технология растительных веществ: тез. докл. IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых учёных. М., 2015. С. 207.

10. Шевлякова О.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Митрофанов Д.А., Аксёнов А.В., Родин И.А., Шпигун О.А. Определение икариина и его основных метаболитов в биосубстратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием // Химический анализ и медицина: тез. докл. I Всероссийской конференции с международным участием. М., 2015. С. 148–149.