

УДК 543.544.5.068.7

**ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ *RHODIOLA ROSEA*
В ЭКСТРАКТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
МЕТОДОМ ГИХ-МС/МС**

© 2025 г. С. А. Нуйкин^a, Ю. В. Тимченко^{a,*},
И. А. Родин^a

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*E-mail: yury_tim@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2024 г.

После доработки 29.08.2024 г.

Принята к публикации 29.08.2024 г.

Разработан простой, экспрессный и высокочувствительный способ одновременного определения основных компонентов *Rhodiola rosea* (розина, салидрозида, розарина и розавина) в широком диапазоне концентраций методом гидрофильной хроматографии—тандемной масс-спектрометрии. Выбраны условия извлечения (тип и состав экстрагента, время экстракции) основных компонентов из образцов корней *Rhodiola rosea*, хроматографического разделения и детектирования этих соединений, а также оценены метрологические характеристики предложенного подхода. Пределы обнаружения составили 250, 2.4, 2.3, 5.4 нг/мл, а линейные диапазоны определяемых концентраций – 1–100, 0.01–10, 0.01–10 и 0.01–100 мкг/мл для розина, салидрозида, розарина и розавина соответственно. Разработанный подход опробован в анализе реальных образцов фармпрепарата и растительного сырья.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, анализ растительного сырья.

DOI: 10.31857/S0044450225020084 **EDN:** aeldqo

В последнее время возрос интерес к лекарственным растениям и контролю качества фармпрепаратов на их основе. Родиола розовая (*Rhodiola rosea*) известна как лекарственное растение с широким спектром полезных свойств, а его надземные и подземные части нашли широкое применение как в народной, так и в современной медицине. Основные биологически активные компоненты *Rhodiola rosea* – салидрозид, розарин, розавин и розин (схема 1) – являются природными адаптогенами, не только повышающими неспецифическую сопротивляемость организма к различным вредным факторам, но и обладающими антиоксидантными, ноотропными, антидепрессантными и другими полезными свойствами [1].

Салидрозид, розарин, розавин и розин относят к классу гликозидов, молекулы которых состоят из углеводного остатка и неуглеводного

фрагмента. Розавины (розин, розавин, розарин) имеют сходную химическую структуру, а розавин и розарин являются структурными изомерами (схема 1). Розавины могут быть обнаружены только в составе *Rhodiola rosea*, в то время как салидрозид встречается и в других видах рода *Rhodiola*. При этом содержание розавина в *Rhodiola rosea* превышает содержания других розавинов. Общая их концентрация в корневищах может достигать нескольких процентов [2, 3]. Для надежной оценки качества биологически активных добавок и фармпрепаратов на основе растительного сырья необходимо использовать эффективные способы извлечения основных соединений с последующим анализом подходящим методом, позволяющим идентифицировать компоненты с их последующим высокочувствительным детектированием.

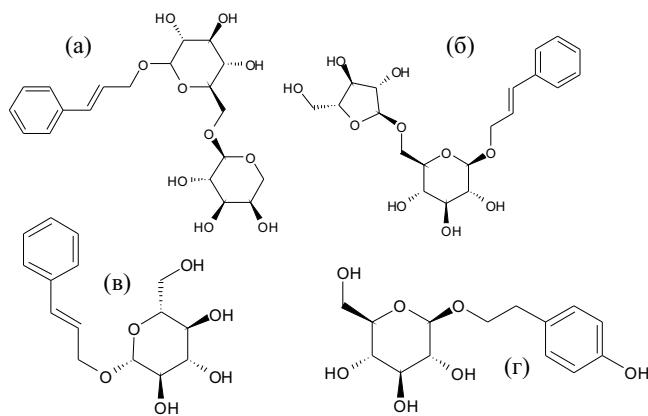


Схема 1. Основные компоненты *Rhodiola rosea*. А – розавин, Б – розарин, В – розин, Г – салидрозид.

Для извлечения основных биологически активных компонентов *Rhodiola rosea* применяют многократную жидкостную экстракцию из твердых образцов [4], экстракцию под высоким гидростатическим давлением [5] ускоренную экстракцию растворителем [6, 7], микроволновую экстракцию [8], но наиболее популярным, доступным, экспрессным и эффективным методом экстракции основных компонентов является ультразвуковая экстракция (УЗЭ) с использованием в качестве экстрагента смеси воды с подходящим органическим растворителем [3, 9–12].

Ввиду особенностей химической природы основных компонентов *Rhodiola rosea* и содержащих их объектов имеется ограниченный набор селективных методов, позволяющих решать задачи их разделения, идентификации и одновременного определения. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) благодаря высокой селективности, широкому набору подвижных и неподвижных фаз и способов детектирования давно зарекомендовал себя как безальтернативный метод анализа сложных смесей биологически активных соединений природного происхождения, в том числе экстрактов на основе *Rhodiola rosea*. На данный момент известно небольшое число работ, посвященных обнаружению и определению салидрозида и розавинов в реальных объектах. Часто для разделения и определения основных компонентов *Rhodiola rosea* применяют вариант обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с УФ- (200–280 нм) или масс-спектрометрическим (МС) детектированием. Однако основные компоненты *Rhodiola rosea* являются гидрофильными соединениями, обладающими схожим химическим строением и слабым удерживанием в условиях ОФ ВЭЖХ. Кроме того, присутствие в образце на основе растительного сырья матричных компонентов

требует использования нестандартных программ градиентного элюирования и системы растворителей, что приводит к усложнению методики и в ряде случаев к увеличению общего времени анализа. Даже в этих условиях полное разделение некоторых структурных изомеров, таких как розарин и розавин, трудноосуществимо [6, 9, 11].

Использование УФ-детектирования в анализе объектов растительного происхождения как традиционного и совместимого с ОФ ВЭЖХ способа осложняется отсутствием характерических полос поглощения в длинноволновой части УФ-спектров основных компонентов *Rhodiola rosea* (салидрозида, розавина, розарина и розина), что приводит к недостаточной селективности и низкой чувствительности их определения [4, 6, 8–10, 12]. Масс-спектрометрическое детектирование таких анализаторов, в особенности в варианте tandemной МС, характеризуется заметно более высокими селективностью и чувствительностью, широким линейным диапазоном определяемых концентраций (ЛДОК) по сравнению с УФ-детектированием, что позволяет определять их на низком уровне концентраций и предъявляет меньше требований к хроматографическому разделению компонентов образца. Однако неполное разделение изобарных соединений (розарин и розавин) в условиях ОФ ВЭЖХ-МС (МС/МС) может негативно сказаться на метрологических характеристиках методик и результатах количественного анализа [3, 11].

С целью улучшения характеристик разделения основных компонентов *Rhodiola rosea* перспективно использование других вариантов хроматографии, например гидрофильной хроматографии (ГИХ), которая хорошо зарекомендовала себя в анализе широкого круга природных объектов за счет эффективного разделения гидрофильных, высокополярных и заряженных соединений. Важным преимуществом ГИХ является потенциальное упрощение пробоподготовки благодаря совместимости составов часто используемых экстрагирующих смесей и подвижной фазы при хроматографическом разделении. Использование МС-детектирования в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) обеспечит повышение селективности и чувствительности определения компонентов. На сегодняшний день неизвестны подходы к определению компонентов *Rhodiola rosea*, сочетающие ГИХ и МС/МС-детектирование.

Цель данной работы – разработка подхода к одновременному определению биологически активных компонентов *Rhodiola rosea* в объектах растительного происхождения методом ГИХ-МС/МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. Использовали ацетонитрил для хроматографии (99.9 %) и муравьиную кислоту (98 %) производства Panreacs (Испания) и метанол (99.9 %) производства J.T.Baker (США). Розарин, Розавин, Розин и Салидрозид (все >98 %) приобретали у компании Phytolab (Германия). Для приготовления всех растворов использовали высокочистую воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см, полученную с применением системы очистки воды Milli-Q (Millipore, США).

Хроматографические колонки. Acclaim HILIC-10 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США), Asahipak NH2P-50 2D HILIC 100 Å (2.0 × 150 мм, 5 мкм) (Resonac Corporation, Япония), Luna HILIC 200 Å (2.0 × 150 мм, 3 мкм) (Phenomenex, США), Acclaim C18 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США), Hypersil Gold PFP 175 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США), Shim-pack GIST-HP C18-Aq 100 Å (3.0 × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония).

Прочее оборудование. Кофемолка (Bosch, Германия), ультразвуковая ванна Сапфир – 2,8 ТТЦ (Сапфир, Россия), мембранные фильтры из полиэтилентерефталата Chromafil Xtra PET с диаметром мембранны 25 мм и размером пор 45 мкм (Macherey-Nagel, Германия), аналитические весы ViBRA HT-224RCE (ВИБРА РУС, Россия) с точностью измерения до ± 0.0005 г, автоматические дозаторы объемом 5–50, 20–200, 100–1000 мкл, 1–5 мл с пределом допускаемой погрешности измерения не более ±5% (LABMATE, Польша) и наконечники необходимых объемов, мульти-вортекс V-32 (Biosan, Латвия), пластиковые пробирки типа Эппendorф емк. 1.5 мл (Eppendorf, Германия), хроматографические стеклянные виалы емк. 2 мл (Agilent Technologies, США).

Приготовление растворов. Исходные растворы салидрозида, розарина, розавина и розина с концентрациями 1000 мкг/мл готовили растворением точных навесок стандартных веществ в смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему) и хранили при +4 °C не более месяца. Растворы с меньшими концентрациями получали путем последовательного разбавления этих растворов смесью ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему) непосредственно в день проведения анализа.

Условия ВЭЖХ-МС-определения. В работе использовали ВЭЖХ-МС-систему, состоящую из ВЭЖХ-системы Expec L-Chrom MS (Expec, Китай), оснащенной двумя программируемыми насосами со смешением по низкому давлению, дегазатором, автоматическим дозатором проб и термостатом колонок, совмещенной

с масс-спектрометрическим детектором на базе тройного квадруполя (Expec, Китай), оснащенным источником электрораспылительной ионизации. Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения MassExpert.P004. V005.002 MassControl (Expec, Китай). Для разделения компонентов использовали хроматографическую колонку Acclaim HILIC-10 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм). Температура термостата колонки – 30 °C, скорость потока – 0.3 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. В качестве подвижной фазы A использовали 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, в качестве подвижной фазы B – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Содержание элюента B менялось по следующей градиентной программе: 0–10 мин 98–95%, 10–20 мин 95–90%, 20–21 мин 90–50%, 21–26 мин 50%, 26–27 мин 50–98%, 27–35 мин 98%.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР), в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: температура источника ионов – 500 °C, напряжение на распыляющем капилляре – 4000 В, расход газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов – 1.1 л/мин, осушающего газа – 10 л/мин, газа завесы – 1.1 л/мин. В табл. 1 представлены параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых компонентов.

Подготовка пробы к анализу. Исследовали два образца на основе природного растительного сырья. Образец 1 представлял собой жидкий спиртовой экстракт Родиолы розовой (ВИФИТЕХ ЗАО, Россия), образец 2 – смесь сухих корней *Rhodiola rosea* (Русские корни, Россия).

Пробоподготовка образца 1. Отбирали аликвоту экстракта объемом 1 мл, центрифугировали. Затем 100 мкл супернатанта добавляли к 900 мкл смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему), перемешивали и полученную смесь анализировали методом ГИХ-МС/МС.

Пробоподготовка образца 2. Навеску сухих корней массой 1–2 г измельчали в кофемолке до состояния мелкодисперсного порошка. В пластиковую пробирку отбирали точную навеску полученного порошка (≈0.1 г). Добавляли 1 мл смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему). Полученную смесь помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин. После этого образцы центрифугировали 5 мин при скорости 16 000 об/мин и фильтровали через мембранные фильтры. Полученный фильтрат разбавляли в 100 раз смесью ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему) и анализировали методом ГИХ-МС/МС.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования

| Соединение | Начало сегмента, мин | Конец сегмента, мин | Ион-предшественник, m/z (M_1) | Ион-продукт, m/z (M_2) | Потенциал декластеризации, В | Энергия соударения, В | I_{M1}/I_{M2} ^в ($n = 3$, $P = 0.95$) |
|------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|---|
| Розин | 0 | 7 | 341 | 45 ^a | 55 | 8 | — |
| Салидрозид | 7 | 11 | 299 | 119 ^a | 40 | 10 | 1.20 ± 0.05 |
| | | | 299 | 179 ^b | 40 | 6 | |
| Розавин | 11 | 13.5 | 473 | 149 ^b | 45 | 20 | 8.1 ± 0.2 |
| | | | 473 | 293 ^a | 45 | 10 | |
| Розарин | 13.5 | 20 | 473 | 293 ^b | 40 | 15 | 5.8 ± 0.2 |
| | | | 473 | 427 ^a | 40 | 10 | |

^aИон-продукт, использованный для количественного анализа; ^bион-продукт, использованный для качественного анализа;
^вдиагностическое соотношение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали возможность применения ГИХ-МС/МС для одновременного определения основных компонентов *Rhodiola rosea*. Для этого следовало выбрать подходящую неподвижную фазу, условия хроматографического разделения (состав подвижной фазы, условия градиентного элюирования) и масс-спектрометрического детектирования. Кроме того, необходимо было подобрать условия извлечения основных компонентов *Rhodiola rosea* из матриц реальных объектов и опробовать предложенный подход на образцах растительного происхождения.

Выбор условий хроматографического разделения. Опробовали три обращено-фазовые хроматографические колонки, заполненные гидрофобизированными силикагелями с привитыми октадецильными и фенильными группами, и три ГИХ хроматографические колонки с неподвижными фазами на основе силикагеля или полимерной матрицы с функциональными группами различной природы одинаковой длины 15 см и с размером частиц 3 мкм.

Эффективность и селективность разделения четырех определяемых соединений сравнивали в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.3 мл/мин и различных составах подвижных фаз. Для выбора подходящей неподвижной фазы сравнивали основные хроматографические параметры пиков компонентов: селективность (α), коэффициент емкости (k'), число теоретических тарелок (N) и разрешение пиков (R_s). В табл. 2 дана характеристика эффективности и селективности разделения смеси салидрозида, розарина, розавина и розина на исследованных хроматографических

колонках в условиях, обеспечивающих наилучшее разрешение их пиков.

Стоит отметить, что с помощью использованных ОФ-колонок не удалось добиться полного разрешения пиков розавинов. Колонка Acclaim HILIC-10 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) обеспечила лучшие значения хроматографических параметров разделения и полное разрешение пиков определяемых соединений за минимальное время. Программу градиентного элюирования выбрали с целью достижения максимального разрешения пиков целевых компонентов за минимальное время с учетом присутствия потенциальных мешающих компонентов в матрице реального образца.

Выбор условий детектирования. В качестве способа ионизации использовали ИЭР, поскольку ранее показано, что данный способ позволяет добиться более высокой чувствительности при определении компонентов *Rhodiola rosea* [11]. С целью улучшения характеристик ионизации в условиях ИЭР определяемых компонентов использовали добавку 0.1 об. % муравьиной кислоты в подвижную фазу. Ион-предшественник выбирали путем изучения масс-спектров, полученных в режиме сканирования масс-спектрометрического детектирования в диапазоне m/z 200–700 при потенциале декластеризации (ПД) 30 В. Выбранные для детектирования значения m/z соответствовали отрицательно заряженным аддуктам $[M + \text{HCOO}]^-$ для розина, розавина и розарина, и $[M - \text{H}]^-$ для салидрозида. Для выбора оптимального ПД получали зависимости нормированных площадей пиков соответствующих определяемых соединений по иону-предшественнику от значения ПД в диапазоне 25–150 В с шагом в 25 В (рис. 1а). Для уточнения значений ПД получали зависимости с шагом 5 В

Таблица 2. Эффективность и селективность разделения смеси салидрозида, розарина, розавина и розина для исследованных хроматографических колонок

| Хроматографические колонки для ГИХ | | | | |
|---|------------|-------------------|---------|---------|
| Acclaim HILIC-10 120 Å (2,1 × 150 мм, 3 мкм) Thermo Fisher Scientific (США), вода—ацетонитрил (5 : 95, по объему) | | | | |
| Параметр | Розин | Салидрозид | Розарин | Розавин |
| <i>k'</i> | 1.82 | 3.49 | 5.29 | 8.35 |
| α | | 1.92 | 1.52 | 1.58 |
| N | 442 | 894 | 837 | 1484 |
| R_s | | 2.9 | 2.5 | 3.3 |
| Asahipak NH2P-50 2D HILIC 100 Å (2.0 × 150 мм, 5 мкм) Resonac Corporation (Япония), вода—ацетонитрил (5 : 95, по объему) | | | | |
| Параметр | Розин | Салидрозид | Розарин | Розавин |
| <i>k'</i> | 4.23 | 14.57 | 20.54 | 23.91 |
| α | | 3.45 | 1.41 | 1.16 |
| N | 301 | 1626 | 1128 | 1951 |
| R_s | | 7.5 | 2.9 | 1.4 |
| Luna HILIC 200 Å (2.0 × 150 мм, 3 мкм) Phenomenex (США), вода—ацетонитрил (5 : 95, по объему) | | | | |
| Параметр | Розин | Салидрозид | Розарин | Розавин |
| <i>k'</i> | 0.63 | 0.94 | 1.51 | 1.90 |
| α | | 1.48 | 1.61 | 1.26 |
| N | 173 | 421 | 341 | 1229 |
| R_s | | 0.7 | 1.2 | 0.9 |
| Хроматографические колонки для ОФ ВЭЖХ | | | | |
| Acclaim C18 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) Thermo Fisher Scientific (США), вода—ацетонитрил (90 : 10, по объему) | | | | |
| Параметр | Салидрозид | Розарин | Розин | Розавин |
| <i>k'</i> | 2.65 | 32.04 | 33.50 | 38.66 |
| α | | 12.08 | 1.05 | 1.15 |
| N | 1813 | 2428 | 3098 | 3381 |
| R_s | | 19.5 | 0.6 | 2.0 |
| Hypersil Gold PFP 175 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм) Thermo Fisher Scientific (США), вода—ацетонитрил (90 : 10, по объему) | | | | |
| Параметр | Салидрозид | Розарин + Розавин | Розин | |
| <i>k'</i> | 1.12 | 7.63 | 8.12 | |
| α | | 6.81 | 1.06 | |
| N | 562 | 730 | 942 | |
| R_s | | 8.0 | 0.4 | |
| Shim-pack GIST-HP C18-Aq 100 Å (3.0 × 150 мм, 3 мкм) Shimadzu (Япония), вода—ацетонитрил (80 : 20, по объему) | | | | |
| Параметр | Салидрозид | Розарин + Розавин | Розин | |
| <i>k'</i> | 0.91 | 4.67 | 6.72 | |
| α | | 5.11 | 1.44 | |
| N | 5868 | 7940 | 9979 | |
| R_s | | 21.2 | 7.3 | |

для области экстремумов полученных диаграмм (рис. 1б). Величины ПД, соответствующие максимальным значениям площадей, выбрали в качестве оптимальных и использовали в дальнейшей работе (табл. 1).

Для выбора характеристических ММР-переходов изучали масс-спектры ионов-продуктов при различных значениях энергии соударений (ЭС) (10, 20, 30 и 40 В). В полученных спектрах выбрали 2–3 наиболее интенсивных перехода и получили зависимости нормированных площадей пиков для каждого перехода от ЭС (1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 В). Зависимости нормированных площадей пиков от ЭС в режиме выделенных ионов представлены на рис. 2.

Критерий выбора оптимальной ЭС – максимум полученных зависимостей для соответствующего ММР-перехода, при этом если максимум наблюдался между парой соседних значений ЭС, то оптимальное значение выбирали как среднее. Пару наиболее интенсивных переходов выбрали для количественного и качественного анализа (табл. 1).

Оценка метрологических характеристик. Для оценки метрологических характеристик предложенного способа определения основных компонентов *Rhodiola rosea* анализировали стандартные образцы розина, салидрозида, розарина и розавина. Аналитическим сигналом служила

площадь хроматографического пика. Метод наименьших квадратов использовали для аппроксимации и расчета параметров линейной регрессии. Предел обнаружения оценивали как минимальное количество аналита, которое может быть обнаружено с отношением сигнал/шум (S/N), равным 3. Правильность подтверждали методом введенено–найдено на трех уровнях концентрации. Сходимость рассчитывали по трем параллельным результатам анализа в течение одного дня. В табл. 3 приведены характеристики хроматографического определения розина, салидрозида, розарина и розавина.

На рис. 3 представлена хроматограмма стандартной смеси розина, салидрозида, розарина и розавина. Предложенный способ определения основных компонентов *Rhodiola rosea* характеризуется приемлемыми правильностью и воспроизводимостью.

Выбор условий извлечения компонентов из растительного сырья. Для извлечения основных биологически активных компонентов *Rhodiola rosea* на этапе пробоподготовки образца корней данного растения (образец 2) использовали УЗЭ как наиболее доступный и универсальный метод, позволяющий добиться высоких значений коэффициентов извлечения за относительно короткое время. Учитывая химическую природу целевых соединений, в качестве

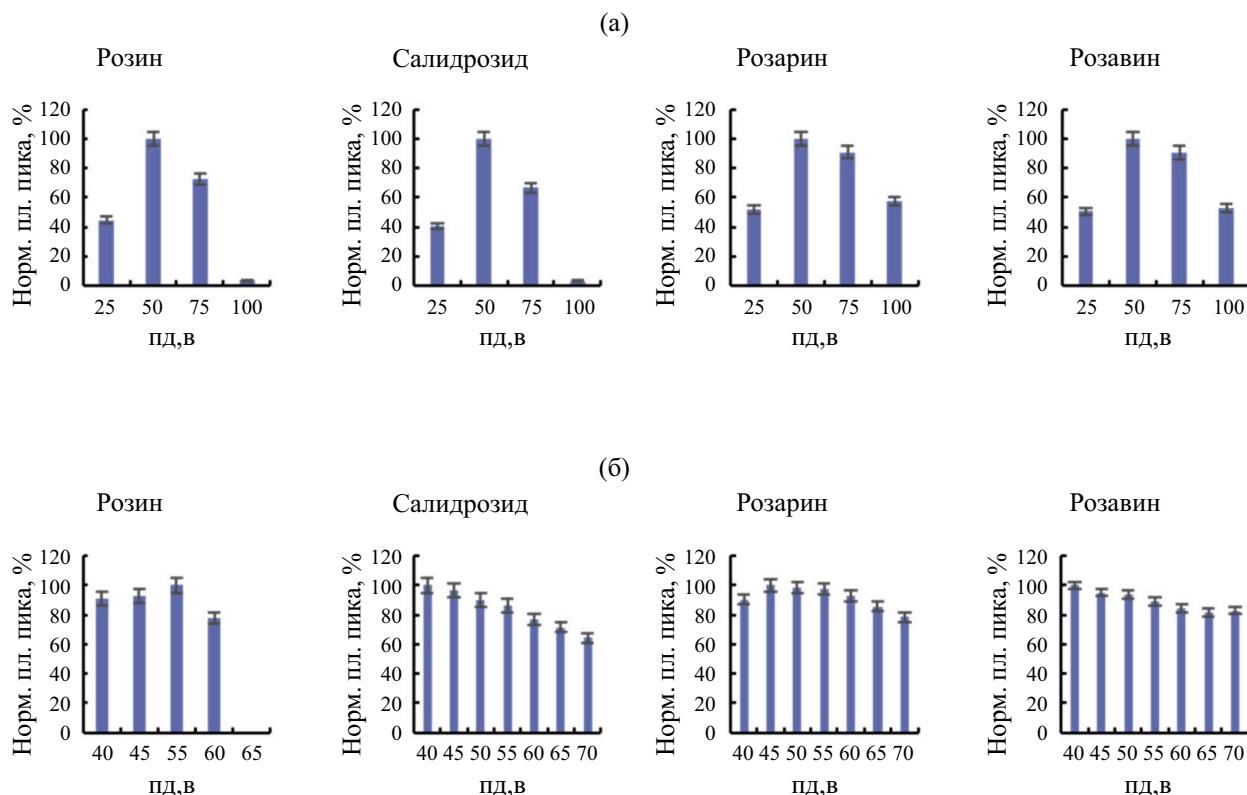


Рис. 1. Зависимость нормированных площадей пиков от приложенного потенциала декластеризации в режиме выделенных ионов ($n = 3$, $P = 0.95$). (а) – предварительная оценка, (б) – уточняющий эксперимент.

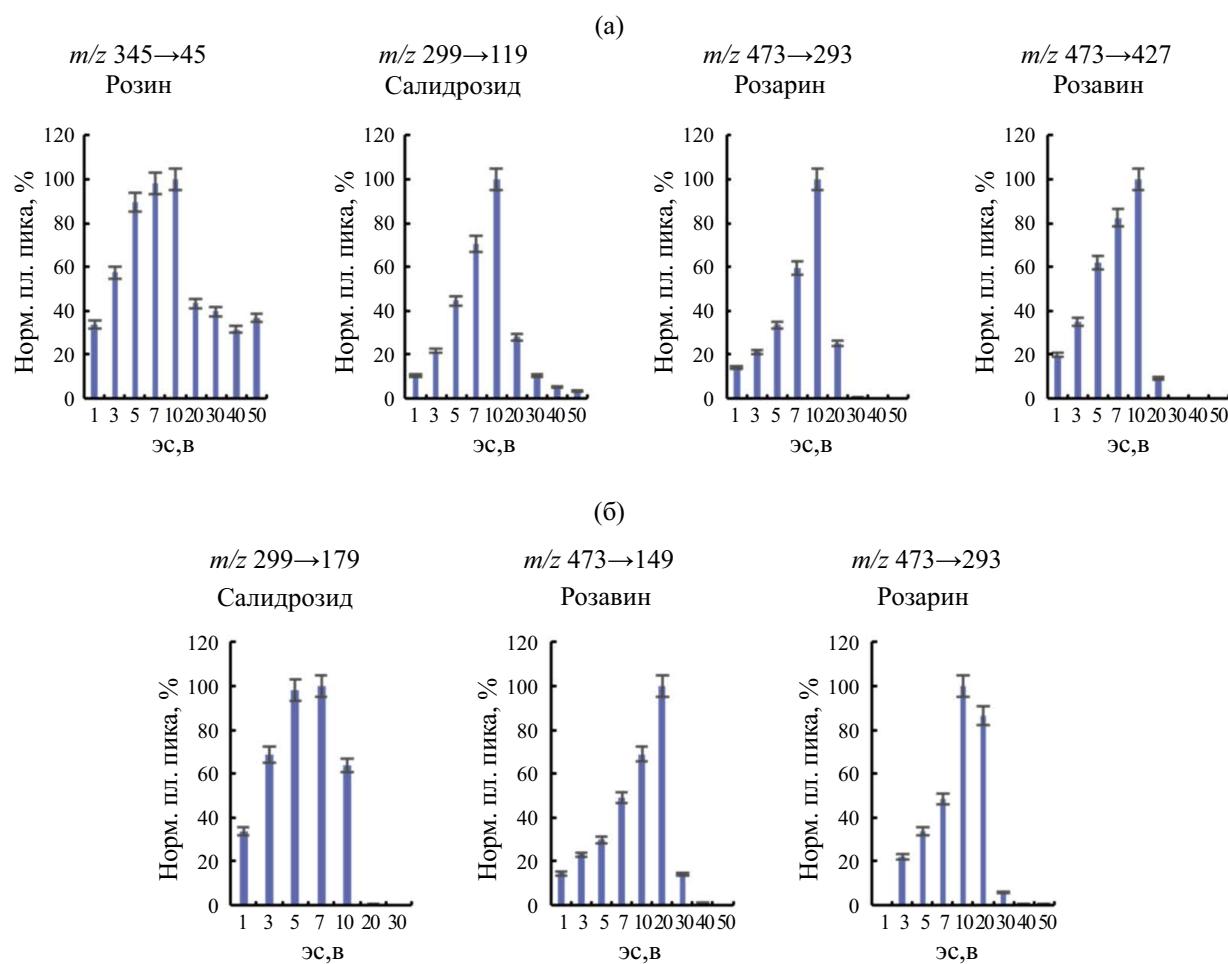


Рис. 2. Зависимости нормированных площадей пиков от энергии соударений для выбранных MMP-переходов ($n = 3$, $P = 0.95$). (а) – переходы, использованные для количественного анализа; (б) – переходы, использованные для качественного анализа.

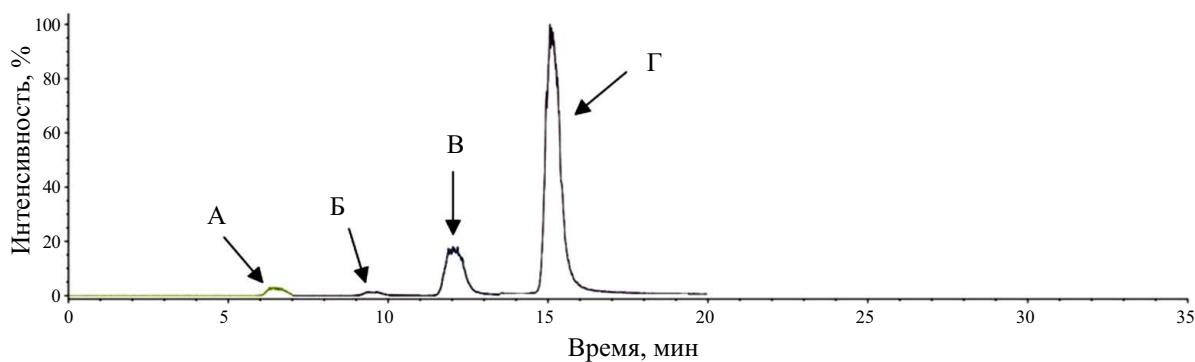


Рис. 3. Хроматограмма стандартной смеси с концентрацией каждого компонента 100 мкг/мл. А – розин, Б – салидрозид, В – розарин, Г – розавин.

экстрагирующей смеси применяли водные растворы органических растворителей. Для выбора подходящего органического растворителя сравнивали эффективность экстракции определяемых соединений метанолом и ацетонитрилом (рис. 4). Использование ацетонитрила обеспечило более высокую общую степень извлечения

целевых компонентов, поэтому его выбрали в качестве органического модификатора в составе экстрагента.

Для выбора состава экстрагента сравнивали эффективность экстракции смесью ацетонитрил–вода в различных соотношениях (0 : 100, 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25, 100 : 0, по объему).

Таблица 3. Характеристики ГИХ-МС/МС-определения розина, салидрозида, розавина и розарина

| Компонент | ММР | $S_{\text{пика}} = k \cdot c$ (n = 5, P = 0.95) | R ² | c _{min} , нг/мл | ЛДОК, мкг/мл | Введено, мкг/мл | Найдено (n = 3, P = 0.95), мкг/ мл | s _r (n = 3, P = 0.95), % |
|------------|---------|--|----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|---|--|
| Розин | 341→45 | $S_{\text{пика}} = (1371 \pm 62) \cdot c$ | 0.9956 | 250 | 1–100 | 1 | 0.96 ± 0.08 | 4.9 |
| | | | | | | 50 | 50 ± 2 | 2.4 |
| | | | | | | 100 | 100 ± 8 | 4.8 |
| Салидрозид | 299→119 | $S_{\text{пика}} = (5935 \pm 193) \cdot c$ | 0.9991 | 2.4 | 0.01–10 | 0.01 | 0.0097 ± 0.0005 | 3.1 |
| | | | | | | 1 | 1.00 ± 0.03 | 1.8 |
| | | | | | | 10 | 10.2 ± 1.7 | 4.0 |
| Розарин | 473→293 | $S_{\text{пика}} = (86828 \pm 1865) \cdot c$ | 0.9996 | 2.3 | 0.01–10 | 0.01 | 0.0100 ± 0.0009 | 5.1 |
| | | | | | | 1 | 1.01 ± 0.03 | 1.8 |
| | | | | | | 10 | 10.0 ± 1.7 | 3.9 |
| Розавин | 473→427 | $S_{\text{пика}} = (242108 \pm 9067) \cdot c$ | 0.9967 | 5.4 | 0.01–100 | 0.01 | 0.0097 ± 0.0007 | 4.5 |
| | | | | | | 10 | 9.9 ± 0.5 | 3.0 |
| | | | | | | 100 | 103 ± 10 | 5.8 |

Зависимость суммы площадей пиков розина, салидрозида, розарина и розавина от состава экстрагента представлена на рис. 5. Наилучшую эффективность экстракции обеспечило использование смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему).

Полнота и степень извлечения компонентов в условиях УЗЭ зависят от продолжительности экстракции. Для выбора времени экстракции исследовали его влияние (5, 10, 15 и 30 мин) на эффективность УЗЭ. Наибольшая полнота УЗЭ достигается за 10 мин (рис. 6).

На сегодняшний день отсутствуют примеры использования ацетонитрила в качестве компонента экстрагирующих смесей для извлечения

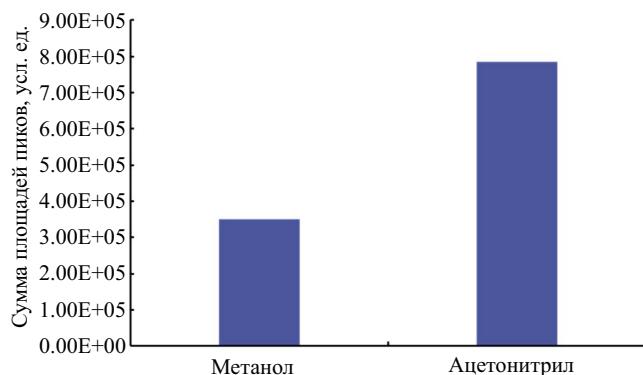


Рис. 4. Зависимость суммы площадей пиков розина, салидрозида, розарина и розавина от типа использованного для экстракции органического растворителя (n = 3, P = 0.95). Время ультразвуковой экстракции 10 мин.

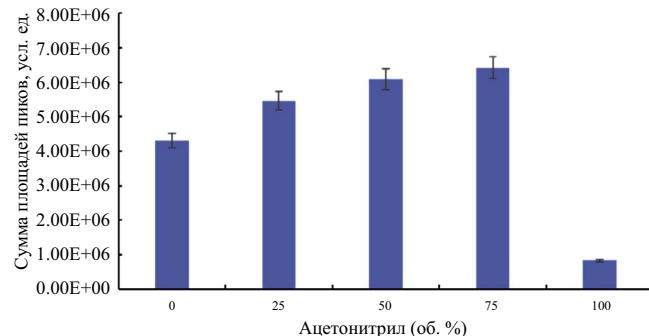


Рис. 5. Зависимость суммы площадей пиков розина, салидрозида, розарина и розавина от состава экстрагента ацетонитрил–вода (n = 3, P = 0.95). Время ультразвуковой экстракции – 10 мин.

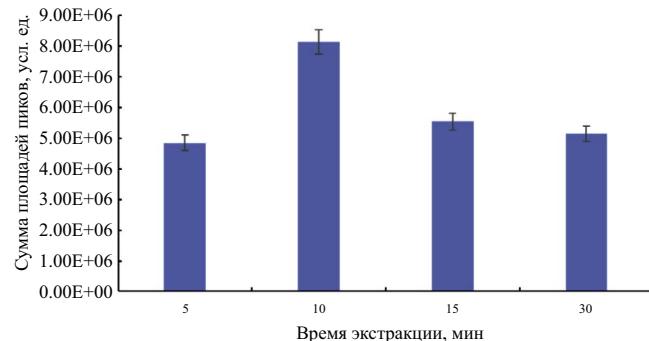


Рис. 6. Зависимости суммы площадей пиков розина, салидрозида, розарина и розавина от продолжительности ультразвуковой экстракции (n = 3, P = 0.95). Состав экстрагента – ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему).

биологически активных соединений *Rhodiola rosea*. Добавка воды в состав таких смесей, по всей видимости, обеспечивает оптимальную полярность экстрагента для извлечения соединений класса гликозидов. Более того, предложенный состав экстрагирующей смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему) не только обеспечивает лучшее извлечение целевых компонентов из объектов растительного происхождения за 10 мин экстракции, но и является совместимым с последующим ГИХ-МС/МС-анализом.

Анализ реальных образцов. Предложенный УЗЭ-подход к извлечению основных компонентов *Rhodiola rosea* использовали на этапе проподготовки образца 2. Полученные экстракты и образец 1 перед ГИХ-МС/МС-анализом

разбавляли экстрагирующей смесью ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему). Результаты анализа аптечного фармпрепарата образец 1 и смеси сухих корней представлены в табл. 4.

Хроматограмма аптечного фармпрепарата представлена на рис. 7. В образце коммерческого спиртового экстракта *Rhodiola rosea* (образец 1) содержания розина и розарина оказались ниже предела обнаружения, а салидрозида и розавина составили 16.3 и 0.21 мкг/мл соответственно.

Хроматограмма, полученная в результате анализа экстракта смеси сухих корней *Rhodiola rosea*, представлена на рис. 8. Содержания салидрозида, розарина и розавина по результатам ГИХ-МС/МС-анализа составили 2.68, 1.14 и 2.89 мак. %.

Таблица 4. Результаты анализа реальных образцов на основе растительного сырья *Rhodiola rosea* ($n = 3$, $P = 0.95$)

| Компонент | Розин | Салидрозид | Розарин | Розавин |
|-----------|-----------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Образец 1 | Ниже c_{\min} | 16.3 ± 0.6 мкг/мл | Ниже c_{\min} | 0.21 ± 0.01 мкг/мл |
| Образец 2 | Ниже c_{\min} | 26.8 ± 0.8 мг/г | 11.4 ± 0.4 мг/г | 28.9 ± 0.6 мг/г |

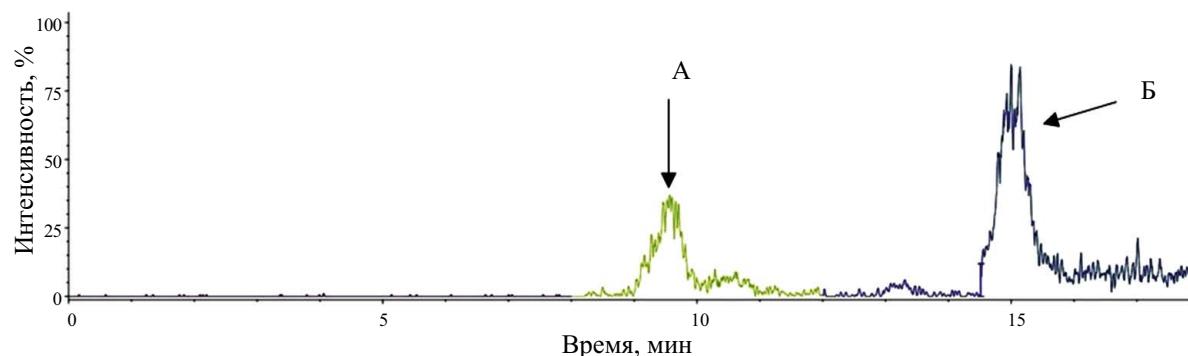


Рис. 7. Экспериментальная хроматограмма образца 1. А – салидрозид, Б – розавин.

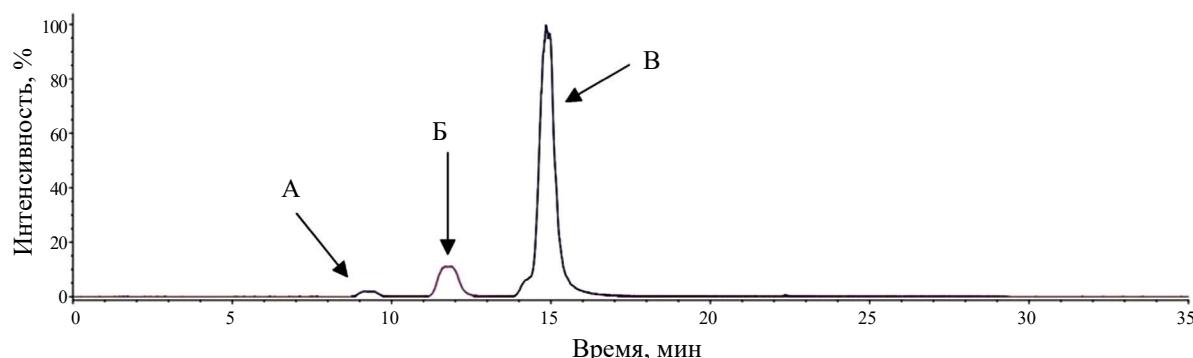


Рис. 8. Экспериментальная хроматограмма образца 2. А – салидрозид, Б – розарин, В – розин.

Таблица 5. Характеристики ВЭЖХ-МС (MC/MC)-способов определения основных компонентов *Rhodiola rosea*

| Аналит | Подготовка пробы | Колонка | Подвижная фаза | $V_{\text{н.п.}}^*$, мкЛ | Детектор и условия детектирования | C_{\min} | $s_r, \%$ | Объект | Литература |
|------------|---|--|--|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------|---|---------------|
| Салидрозид | УЗЭ, (этанол–вода, 10 : 90, по объему), 15 мин | Zorbax SBC18 (150 × 2.00, 5 мкм), температура термостата –25°C | 0.35 мл/мин, ацетонитрил–вода (с 0.5 % муравьиной кислоты), 85 : 15, по объему | 20 | MC, m/z 299 → 119, 299 → 89 | 0.005–10 мкГ/мЛ | 2 нг/мЛ | Корни <i>Rhodiola rosea</i> | [3] |
| | Розарин | | | | MC, m/z 427 → 293, 427 → 149 | | 4 нг/мЛ | | |
| | | | | | MC, m/z 427 → 293, 427 → 149 | | 6 нг/мЛ | | |
| Салидрозид | УЗЭ, (метанол–вода, 60 : 40, по объему), 60 мин | Waters Polarity (2.1 × 50 мм, 3 мкм), температура термостата –35°C | 0.3 мл/мин, ГР: 76–90 % вода, 5–12 % ацетонитрил, 5–12 % метанол | 5 | MC, m/z 323 | 0.5–500 нг/мЛ | 8.9 | Корни <i>Rhodiola rosea</i> | [11] |
| | Розарин | | | | MC, m/z 451 | 2–2000 нг/мЛ | — | | |
| | Бензил-О-β-глюкопиранозид | | | | MC, m/z 293 | 2–500 нг/мЛ | 4.3 | | |
| Розин | | Acclaim HIIC-10 120 Å (2.1 × 150 мм, 3 мкм), температура термостата –30 °С | | | MC, m/z 345 → 45 | 1–100 мкГ/мЛ | 6.3 | Корни <i>Rhodiola rosea</i> | Данная работа |
| | Салидрозид | УЗЭ, (ацетонитрил–вода, 75 : 25, по объему), 10 мин | 0.3 мл/мин, ГР: 50–98 % ацетонитрил, 2–50 % вода | 10 | MC, m/z 299 → 119, 299 → 179 | 0.01–10 мкГ/мЛ | 250 нг/мЛ | | |
| | Розарин | | | | MC, m/z 473 → 293, 473 → 149 | 0.01–10 мкГ/мЛ | 4.9 | | |
| Розарин | | | | | MC, m/z 473 → 427, 473 → 293 | 0.01–100 мкГ/мЛ | 5.1 | и аптечный экстракт <i>Rhodiola rosea</i> | № 2 |
| | | | | | | 5.4 нг/мЛ | 5.8 | | |

*Объем вводимой пробы.

Отсутствие пика розина на хроматограммах проанализированных образцов, вероятно, связано с его низким содержанием в исходном использованном для получения экстракта растительном сырье. Кроме того, отсутствие розарина в образце коммерческого экстракта (образец 1) может быть связано как с химическими процессами трансформации при хранении фармпрепарата, так и, возможно, с меньшей эффективностью экстракции, использованной при производстве данного продукта. Сравнение результатов определения основных компонентов в исследованных экстрактах *Rhodiola rosea* демонстрирует заметно более высокую эффективность извлечения компонентов с использованием предложенного УЗЭ-подхода с учетом всех стадий разбавления проб. В табл. 5 представлены характеристики ВЭЖХ-МС (МС/МС)-способов определения основных компонентов *Rhodiola rosea*.

Предложенный ГИХ-МС/МС-подход за приемлемое время позволяет разделить большее количество важных компонентов *Rhodiola rosea*, полное разделение которых ранее не удавалось осуществить без использования ГИХ даже с применением нестандартных подвижных фаз и сложных программ градиентного элюирования. Благодаря тщательному подбору условий извлечения удалось снизить время экстракции компонентов из матрицы растительного сырья до 10 мин. Более того, предложенный подход позволяет одновременно определять розин, салидрозид, а главное, изомерные розарин и розавин, обеспечивая сопоставимую и в ряде случаев лучшую (в 1,5–2 раза) чувствительность, широкий ЛДОК, а также лучшую воспроизводимость за счет совместимых условий определения и пробоподготовки в сравнении с известными ОФ ВЭЖХ-МС(МС/МС)-подходами [3, 11].

Таким образом, предложен простой, экспрессный и высокочувствительный способ одновременного определения основных компонентов *Rhodiola rosea* (розина, салидрозида, розарина и розавина) в широком диапазоне концентраций методом ГИХ-МС/МС. Проведено сравнение эффективности применения трех ОФ и трех ГИХ-неподвижных фаз для разделения четырех основных биологически активных соединений *Rhodiola rosea*, продемонстрировано преимущество использования ГИХ для разделения основных компонентов. Выбраны условия хроматографического разделения (тип неподвижной и состав подвижной фазы, программа градиентного элюирования) и параметры масс-спектрометрического детектирования целевых компонентов (значения m/z

характеристичных ММР-переходов, энергий соударения и др.), обеспечивающие наилучшую чувствительность и селективность определения. Предложенный ГИХ-МС/МС-способ определения основных компонентов *Rhodiola rosea* характеризуется сопоставимыми или лучшими по сравнению с известными подходами экспрессностью, чувствительностью, ЛДОК, правильностью и воспроизводимостью. Впервые предложена экстрагирующая смесь ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему), не только обеспечивающая лучшее извлечение целевых компонентов из объектов растительного происхождения за 10 мин УЗЭ, но и совместимая с последующим ГИХ-МС/МС-анализом. Разработанный ГИХ-МС/МС-способ определения основных компонентов *Rhodiola rosea* успешно применен для анализа коммерчески доступных биологически активных добавок. Он может быть рекомендован для использования в организациях, осуществляющих надзор и контроль в сфере применения таких добавок и фармпрепаратов на основе растительного сырья *Rhodiola rosea*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнена за счет средств государственного задания “Развитие высококонтрольных и высокотехнологичных методов химического анализа для защиты экосистем, создания новых материалов и передовых производственных технологий, перехода к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике, развития природоподобных технологий, высокотехнологичного здравоохранения и рационального природопользования” (номер ЦИТИС: АААА-А21-121011590089-1) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было. ВЭЖХ-МС-исследования выполнены с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown R.P., Gerbarg P.L, Ramazanov Z. *Rhodiola rosea*. A phytomedicinal overview // HerbalGram. 2002. V. 56. P. 40.
2. Ghiorghita G., Maftei D.I., Maftei D.E. *Rhodiola rosea* L. – A valuable plant for traditional and for the modern medicine // An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi. Mat. 2015. V. 61. № 1-2. P. 5.

3. 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 // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 9. № 1. С. 61 (Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Shpigun O.A., Popik M.V. Simultaneous determination of salidroside, rosavin, and rosarin in extracts from *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. P. 1026.)
4. Linh P.T., Kim Y.H., Hong S.P., Jian J.J., Kang J.S. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography // Arch. Pharm. Res. 2000. V. 23. P. 349.
5. Bi H.M., Zhang S.Q., Liu C.J., Wang C.Z. High hydrostatic pressure extraction of salidroside from *Rhodiola Sachalinensis* // J. Food Process Eng. 2009. V. 32. № 1. P. 53.
6. Filion V.J., Saleem A., Rochefort G., Allard M., Cuerrier A., Arnason J.T. Phytochemical analysis of Nunavik *Rhodiola rosea* L // Nat. Prod. Commun. 2008. V. 3. № 5. P. 721.
7. Alperth F., Turek I., Weiss S., Vogt D., Bucar F. Qualitative and quantitative analysis of different *Rhodiola rosea* root extracts by LC-ESI-TOF-MS // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1245. P. 102.
8. Mao Y., Li Y., Yao N. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola L.* by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. V. 45. № 3. P. 510.
9. Ganzenra 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. 2001. V. 49. № 4. P. 465.
10. Saunders D., Poppleton D., Struchkov A., Ireland R. Analysis of five bioactive compounds from naturally occurring *Rhodiola rosea* in eastern Canada // Can. J. Plant Sci. 2014. V. 94. № 4. P. 741.
11. Tolonen A., Hohtola A., Jalonen J. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization techniques in the analysis of the main constituents from *Rhodiola rosea* extracts by liquid chromatography/mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2003. V. 38. № 8. P. 845.
12. Avula B., Wang Y.H., Ali Z., Smillie T.J., Filion V., Cuerrier A. et al. RP-HPLC determination of phenylalkanoids and monoterpenoids in *Rhodiola rosea* and identification by LC-ESI-TOF // Biomed. Chromatogr. 2009. V. 23. P. 865.

ONE-TIME DEFINITION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF *RHODIOLA ROSEA* IN EXTRACTS OF PLANT SOURCES BY HILIC-MS/MS METHOD

S. A. Nuikin^a, Yu. V. Timchenko^a, *, I. A. Rodin^a

^a*Lomonosov Moscow State University, chemistry department*

Moscow, Russia

**E-mail: yury_tim@mail.ru*

Abstract. A simple, rapid and highly sensitive method for the simultaneous determination of the main components of *Rhodiola rosea* (rosin, salidroside, rosarin, and rosavin) in a wide range of concentrations by hydrophilic chromatography-tandem mass spectrometry has been developed. The conditions for extraction (type and composition of extractant, extraction time) of the main components from *Rhodiola rosea* root samples, chromatographic separation and detection of these compounds were selected, and the metrological characteristics of the proposed approach were evaluated. The detection limits were 250, 2.4, 2.3, and 5.4 ng/mL, and the linear ranges of detectable concentrations are 1–100, 0.01–10, 0.01–10, and 0.01–100 µg/mL for rosin, salidroside, rosarin, and rosavin, respectively. The developed approach is tested in the analysis of real samples of pharmaceuticals and plant raw materials.

Keywords: hydrophilic chromatography, tandem mass spectrometry, plant raw material analysis.