

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ АРКТОУСА АЛЬПИЙСКОГО

Н. С. Фурса, О. М. Ермолаева, А. А. Таланов

Ярославская государственная медицинская академия

Поступила в редакцию 18.03.2014 г.

Аннотация. Методом ВЭЖХ-МС/МС без предварительной дериватизации определено 17 аминокислот и 2 амида моноаминодикарбоновых кислот в подземных и надземных органах арктоуса альпийского. Отмечено, что их больше всего накапливалось в цветках и весенних листьях с преобладанием моноаминодикарбоновых кислот, их амидов и пролина.

Ключевые слова: арктоус альпийский, подземные и надземные органы, аминокислоты, ВЭЖХ-МС/МС.

Abstract. By HPLC-MS/MS without prior derivatization defined amino acid composition of overground and underground organs of *Arctous alpina*. 19 amino acids are identified, with their large content in flowers and spring leaves, with predominance of monoamindicarbon acids and their amids, proline.

Keywords: *Arctous alpina*, overground and underground organs, amino acids, HPLC-MS/MS.

Арктоус альпийский (*Arctous alpina* (L.) Niedenzu) – арктоальпийский вид семейства вересковые, сохраняющий генетическое разнообразие, несмотря на изменения климата, и занимающий широкий ареал обитания в Арктике. Его листья – суррогат толокнянки, настои из них используют в народной медицине в качестве мочегонного и уросептического средства. Кроме того, вызывают интерес сведения последних лет об эффективном применении арктоуса в комплексном восстановительном лечении хронического бронхита, послеожогового келоида, флегмон полости рта [1,2,3]. Химический состав растения изучен в недостаточной мере.

При проведении фитохимического анализа различных органов арктоуса нами обнаружены разнообразные биологически активные вещества вторичного обмена (арбутин, урсоловая, галловая, аскорбиновая и хлорогеновая кислоты, кверцетин, рутин). Вместе с тем, вещества первичного обмена, в частности аминокислоты, не изучены.

Свободные аминокислоты играют особую роль в протекторно-адаптивных механизмах растения. Они обеспечивают регуляцию осмотического давления, детоксикацию свободного аммиака, поставку углево-

дородных скелетов для энергетического обмена в растительной клетке.

Отдельные аминокислоты используют в качестве лекарственных препаратов, они входят в состав различных биологически активных добавок к пище. Так, пролин находит применение при механических повреждениях и воспалительных заболеваниях кожи и слизистых [4], глютаминовая кислота – для регуляции метаболических процессов в ЦНС, аспарагиновая кислота выпускается в виде средства для парентерального питания.

Цель исследования – провести сравнительное изучение аминокислотного состава различных органов арктоуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили корни, побеги, весенние и осенние листья, цветки и плоды арктоуса альпийского, заготовленные в 2012 г. в Мурманской области.

Исследования проводили на приборе AB Sciex Qtrap 3200 (USA).

При разработке методики прямого определения аминокислот методом ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации нами проведены исследования по оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования и

подобраны оптимальные условия хроматографического разделения.

При оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования аминокислот нами выявлено влияние параметров, ответственных за осуществление функционирования квадруполей в масс-детекторе (потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия фрагментации) и выбраны для него оптимальные пары MRM переходов (таблица 1).

Критерием выбора оптимальных значений потенциала декластеризации и входного потенциала на нулевом квадруполе масс-спектрометрического детектора являлась максимальная интенсивность молекулярного иона на масс-спектре. Варьирование входного потенциала преимущественно не оказывало существенного влияния на количество протонированных или депротонированных молекул анализируемых веществ, попадающих в детектор. В связи с чем его значение, равное ± 10 В, выбрано постоянным для всех определяемых аминокислот.

При последующей оптимизации масс-спектрометрического детектирования аминокислот, заключающейся в выборе подходящих MRM переходов, исследовали влияние энергии фрагментации (CE) в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра дочерних ионов, образующихся при распаде протонированного молекулярного иона, и их интенсивность.

В качестве неподвижной фазы при хромато-масс-спектрометрическом определении аминокислот в анализируемых образцах служила колонка с обращено-фазовым сорбентом Acclaim RSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм (фирма «Thermo») с использованием программы градиентного элюирования, в условиях которой коэффициент емкости (k) для аминокислот находился в диапазоне от 1 до 3 и являлся приемлемым для хроматографического анализа. Объем вводимой с помощью шприцевого насоса пробы составлял 0.020 мл; температура термостата колонки – 25 °С; скорость подачи элюента – 0.200 мл/мин. В качестве элюента применяли смесь из 0,5% водного раствора муравьиной кислоты (элюент А) и ацетонитрила (элюент Б). Состав подвижной фазы в соответствии с программой градиентного элюирования изменялся следующим образом: 0.00 – 10.00 мин. - 1 % элюента Б; 10.00 мин – 11.00 мин. - 1 – 90 % Б; 11.01 – 17.00 мин. - 90 % Б; 17.01 – 18.00 мин. - 90 - 1 % Б; 18.01 – 25,00 мин. - 1 % Б.

Перед хроматографическим анализом образцов готовили серию стандартных растворов в выбранном интервале и строили градуировочную зависимость в диапазоне содержания отдельных аминокислот 100-3000 нг/мл.

После определения условий детектирования и выбора оптимальных условий разделения провели хромато-масс-спектрометрическое определение аминокислот в анализируемых образцах. В качестве критерия их наличия в пробах использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных переходов, соответствующих определяемому компоненту. Глицин на хроматограммах не обнаруживался из-за слишком низкой чувствительности его детектирования. Содержание каждой аминокислоты в анализируемых образцах рассчитывали согласно уравнениям градуировочных графиков.

На основании изложенного нами проанализированы образцы корней, побегов, листьев, цветков и плодов арктоуса альпийского и определено содержание аминокислот в каждом из них. В ходе пробоподготовки перед хроматографическим анализом к навескам (0.100) измельченных отдельных видов сырья надземных и подземных органов добавляли 2 мл смеси спирт этиловый - вода (7:3) и проводили экстракцию в течение 30 минут на ультразвуковой бане. Полученные извлечения разбавляли пятикратным количеством воды очищенной. Их очистку проводили центрифугированием в течение 4 минут при 16 000 об/мин и пропусканьем через 0.45 мкм фильтр. Очищенные растворы отбирали в вials для ВЭЖХ-МС/МС анализа, результаты которого представлены в таблице 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В анализируемых образцах нами определено 17 аминокислот и 2 амида моноаминодикарбоновых кислот (таблица 2), из них в сумме и в отдельности преобладало 12 заменимых аминокислот и их производных (Ala, Arg, Asn, Asp, His, Gln, Glu, Pro, Ser, Tyr, Trp, Cys), чем 7 незаменимых (Val, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Phe). В ряду выявленных аминокислот независимо от органа в суммарном выражении более интенсивно накапливались моноаминодикарбоновые кислоты и их амиды. Больше всего общей суммы аминокислот содержалось в весенних листьях и цветках, что, по-видимому, связано с высокой скоростью метаболических процессов в них. Значительно меньшее её содержание отмечено в побегах, ещё меньше в корнях, осенних листьях и особенно в плодах (таблица 2).

Таблица 1
 Оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования аминокислот

Аминокислота и её символ	m/z		Потенциал декла-стеризации (DP), В	Входной потен-циал (EP), В	Энергия соударений (CE), В
	m/z1	m/z2			
Аланин (Ala)	90.5	44	20	10	20
	90.5	72			
Аргинин (Arg)	175	70	28	10	20
	175	116			
Аспарагин (Asn)	133	74	19	10	19
Аспарагиновая кислота (Asp)	134	74	19	10	19
Валин (Val)	118	72	17	10	17
	118	77			
Гистидин (His)	156	110	19	10	19
Глицин (Gly)	76	30	15	10	10
Глютамин (Gln)	147	130	16	10	16
	147	84			
Глютаминовая кислота (Glu)	148	56	20	10	20
	148	84			
Изолейцин (Ile)	132	57	21	10	21
	132	56			
Лейцин (Leu)	132	86	19	10	15
	132	43			
Лизин (Lys)	147	130	16	10	16
	147	84			
Метионин (Met)	150	104	19	10	19
	150	133			
Пролин (Pro)	116	70	19	10	19
Серин (Ser)	106	60	20	10	20
	106	88			
Тирозин (Tyr)	182	165	19	10	19
Треонин (Thr)	120.5	74	20	10	10
	120.5	102			
Триптофан (Trp)	205	188	19	10	19
Фенилаланин (Phe)	166	120	19	10	19
Цистеин (Cys)	122	74	19	10	19
	122	88			

Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что в анализируемых органах, особенно в цветках и весенних листьях, обнаружено преимущественное накопление основных «стрессовых» аминокислот [5]: пролина (больше всего в весенних листьях), аспарагиновой, глютаминовой кислот и их амидов, валина и аланина (больше всего в цветках). Следует отметить, что пролин принимает участие в общем адаптивном ответе растительного организма на стрессоры, а его выраженная спо-

собность к накоплению обеспечивает растению солотолерантность. В стрессовых ситуациях пролин синтезируется *de novo* по глютаматсинтазному пути. Возможно, для его высокого содержания необходимо достаточное количество глютамата [6,7]. Глютамин и аспарагин - более устойчивые соединения, чем соответствующие им дикарбоновые аминокислоты. Они не подвергаются окислительному дезаминированию и являются резервом дикарбоновых аминокислот в растении. В опреде-

ленной мере процесс их образования происходит при детоксикации свободного аммиака [5].

Изложенные данные позволяют заключить, что аминокислотный состав различных органов и накопление в них отдельных соединений, вероятно, обусловлены местами произрастания и особенностями развития арктоуса как высокорезистентного вида.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика количественного определения аминокислот в надземных и подземных органах арктоуса альпийского без предварительной дериватизации методом ВЭЖХ-МС/МС после проведения оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования и выбора оптимальных условий хроматографического разделения.

2. В анализируемых образцах определено 17 аминокислот и 2 амида моноаминодикарбоновых кислот, из них в сумме и в отдельности в большей мере содержались заменимые аминокислоты и

их производные (Ala, Arg, Asn, Asp, His, Gln, Glu, Pro, Ser, Tyr, Trp, Cys), чем незаменимые (Val, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Phe).

3. Сумма аминокислот в цветках и весенних листьях, более половины которой составляли пролин, аспарагин и глутамин, значительно выше, чем в других органах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аргунов, А.В. Научное обоснование мультипликативных технологий использования природных лечебных факторов курорта Сочи в комплексном восстановительном лечении детей с келоидными рубцами и контрактурами конечностей после ожоговой травмы: Автореф. дис....канд. мед наук /А.В.Аргунов. — Сочи, 2008. — 38 с.

2. Баяндуров, С.Э. Фитотерапия как ингредиент восстановительного лечения больных хроническими бронхитами в условиях горноклиматического курорта Красная поляна: Автореф. дис....канд. мед наук/ С.Э. Баяндуров. — Сочи, 2007. — 23 с.

Таблица 2

Содержание аминокислот в различных органах арктоуса

Аминокислота	Орган, содержание в мкг/г					
	Корни	Побеги	Листья весенние	Листья осенние	Цветки	Плоды
Моноаминомонокарбоновые кислоты						
Аланин	5.0	3.6	24.2	<1	34.4	<1
Валин*	1.3	<1	41.8	2.7	60.4	<1
Изолейцин*	<1	<1	25.2	3.0	45.5	<1
Лейцин*	<1	<1	9.8	2.5	17.4	<1
Метионин*	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Серин	2.6	2.1	8.4	2.4	12.3	1.3
Тирозин	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Треонин*	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Фенилаланин*	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Цистеин	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Моноаминодикарбоновые кислоты						
Аспарагиновая кислота	1.3	3.1	46.6	1.1	74.8	<1
Глутаминовая кислота	54.4	77.2	51.9	14.0	138.0	<1
Амиды моноаминодикарбоновых кислот						
Аспарагин	<1	<1	133.1	1.1	200.5	<1
Глутамин	13.6	2.0	79.8	22.8	237.0	<1
Диаминомонокарбоновые кислоты						
Аргинин	36.5	49.6	24.8	0.8	115.2	<1
Лизин*	1.7	1.1	4.2	1.1	5.2	1.2
Гетероциклические кислоты						
Гистидин	<1	1.1	5.5	4.5	29.1	<1
Пролин	2.6	1.4	222.0	10.3	154.0	<1
Триптофан	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Примечание: * незаменимые аминокислоты.

3. Шевченко, Л.В. Концептуализация, методический и методологический инструментарий восстановительного лечения в ЛПУ и здравницах больных после оперативных вмешательств по поводу периапикальных абсцессов и флегмон полости рта: Автореф. дис...канд. мед наук/ Л.В. Шевченко. — Сочи, 2009. — 42 с.

4. Аниськова, О.Е. Доклиническое изучение препарата «Процелам»/О.Е. Аниськова, Л.В. Половинкин, Т.Л. Юркштович//Здравоохранение. — 2004. — №7. — С.36-41.

5. Епринцев, А.Т. Роль свободных аминокислот в адаптивной реакции кукурузы в условиях

солевого стресса/ А.Т. Епринцев, О.С. Солодилова, Г.Н. Хожаинова// Вестник Воронежского государственного университета. — 2013. — №2. — С.132-135.

6. Delauney, A.J. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants/ A.J. Delauney, D.P. Verma// Plant Journal. — 1993. — №4. — P.215-223.

7. Roosens, N.H. Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana glauca* studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance imaging/ N.H. Roosens, R.Willem, Y.Li //Plant physiology. — 1999. — V.121. — P. 1281-1290.

Фурса Николай Сергеевич — заведующий кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии Ярославской государственной медицинской академии; тел.: (4852) 72-66-03; e-mail: fursans@rambler.ru

Ермолаева Ольга Михайловна — аспирант кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии Ярославской государственной медицинской академии; тел.: 89301234367; e-mail: alba1212@yandex.ru

Таланов Андрей Александрович — ассистент кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии Ярославской государственной медицинской академии; тел.: 89201355457; e-mail: andrewtalanov87@rambler.ru

Fursa Nikolay S. — the head of the chair of pharmacognosy and pharmaceutical technology, Yaroslavl State Medical Academy; тел.: (4852) 72-66-03; e-mail: fursans@rambler.ru

Ermolaeva Olga M. — the post graduate of the chair of pharmacognosy and pharmaceutical technology, Yaroslavl State Medical Academy; тел.: 89301234367; e-mail: alba1212@yandex.ru

Talanov Andrey A. — the teaching assistant of the chair of pharmacognosy and pharmaceutical technology, Yaroslavl State Medical Academy; тел.: 89201355457; e-mail: andrewtalanov87@rambler.ru