

А.Р. ГЕВОРГЯН, А.Н. КОЧАРЯН, Е.К. АРМУДЖЯН, Н.С. ТОРОСЯН
АНАЛИЗ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА АРМЯНСКОЙ МЕДОВОЙ ТРАВЫ
(СТЕВИИ) МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Проведен анализ экстракта армянской медовой травы (стевию) масс-спектральным методом. С этой целью использовалась квадрупольная масс-спектрометрия Tg1 Quad™ 4500 фирмы Sciex для чувствительного и селективного структурного обнаружения стевиол гликозидов.

Ключевые слова: армянская медовая трава, стевия, стевиол гликозид, подсластитель, масс-спектральный анализ, МС/МС метод.

Введение. В настоящее время весьма актуальным является получение безопасных продовольственных продуктов, в том числе подсластителей. Потребительский рынок насыщен разными синтетическими подсластителями, которые в основном наносят вред человеческому организму. В этом отношении в последние годы повысился интерес к натуральным подсластителям, в том числе к стевию.

В Парагвае (у себя на родине) листья стевию (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) с XVI века используются для подслащивания напитков [1]. Сладкими компонентами в этом растении являются стевиогликозиды. Ранее отмечено, что полученные из листьев стевию сложные гликозиды представляются приблизительно десятью структурами, основными из которых являются стевиозид (СТЗ) и ребаудиозид [2].

Листья стевию многократно слаще сахара, они широко известны в мире и используются для лечения и профилактики многих заболеваний [3].

Границы применения стевию расширились от Японии до Западной Европы. В Армении климатические условия дают возможность выращивать листья стевию (армянская медовая трава). Эту уникальную и ценнейшую культуру в республике выращивают также гидропоническим методом [4], что дает возможность в два раза повысить урожайность армянской медовой травы по сравнению с почвенным методом. У листьев, полученных гидропоническим методом, одновременно повышается качество - количество экстрактивных веществ, белков, эндемических микроэлементов. Установлено также, что полученные гидропоническим методом листья более безопасны с радиологической точки зрения [4].

Целью настоящей статьи является использование метода гибридной высокоэффективной жидкостной хроматографии, тандемной с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Это быстрый и чувствительный способ для обнаружения органических веществ в смеси [5-8]. Метод позволяет применять самые простые способы пробоотбора стевииолгликозидов в водной среде. Кроме того, при простоте пробоотбора он обеспечивает экспериментальные результаты при проведении испытаний для оценки чувствительности, селективности, линейности, точности, целостности разбавления, а также различных дополнительных испытаний на устойчивость. Метод позволяет также производить анализ и обнаружение мельчайших количеств исследуемого вещества в воде.

Методы и результаты исследования. Первоначально осуществлено жидкостное хроматографирование экстракта из трав. Хроматографирование осуществлено высокоэффективным жидкостным хроматографом (ВЭЖХ) фирмы Chemical Industries, Ltd. Япония. В качестве мобильной фазы применена смесь ацетонитрила и воды в соотношении 80:20. pH водного раствора доведено до 3.0 с фосфорной кислотой с последующим фильтрованием.

50 мг экстракта разбавлено с подвижной фазой до 100 мл.

Колонка: Supelcosil LC-NH 2 или эквивалент (длина: 15...30 см; внутренний диаметр: 3,9...4,6 мм). Температура колонки: 40 °С.

Обнаружено 7 типов веществ (рис. 1, 2). В настоящее время проводятся работы по идентификации полученных веществ. По предварительным результатам все являются сахароидными и имеются в экстрактах армянского медоноса.

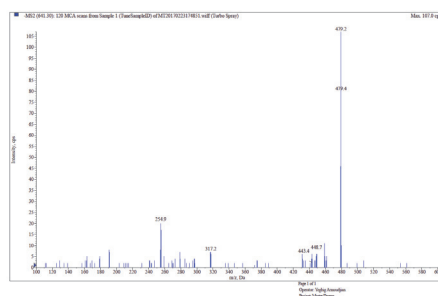


Рис. 1. Масс-спектр водного экстракта армянской медовой травы - *Stevia Rebaudiana Bertoni*

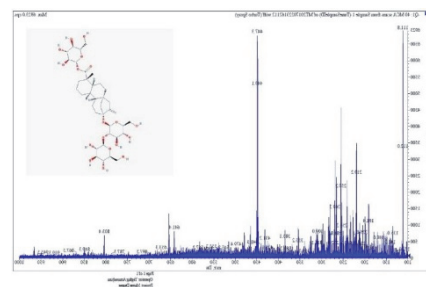


Рис. 2. Масс-спектр водного экстракта армянской медовой травы - *Stevia Rebaudiana Bertoni*

Имея в виду возможность получения стевииозида, проведено также масс-хроматографирование этого вещества.

Исследование наличия СТЗ в водной среде проводили с использованием хроматографической системы жидкостной Shimadzu Nexera X2 Ultra, соединенной с Sciex Triple Quad™ 4500 Tandem квадрупольной масс-спектрометрии. СТЗ вводили в МС в 1 нг/мл концентрации, разбавленный в соотношении метанол: муравьиная кислота 0,1% 1:1 и скорость потока 7 мкл/мин. Такая система обеспечивала прочный, быстрый, селективный и чувствительный качественный анализ, а также количественное определение исследуемых веществ.

Необходимо отметить, что в литературе не найдено примеров масс-спектрометрического анализа глюкозидов с использованием настоящего метода. Вследствие этого настройку масс-спектрометрических параметров для СТЗ проводили в двух режимах ионизации - отрицательном и положительном. В обоих случаях получены почти аналогичные результаты.

Найдена также удачная система для жидкостного хроматографирования - мобильная фаза смесь ацетонитрила и воды в соотношении 80:20. В масс-спектрах при отрицательном режиме проявляется наличие ионов m/z от 316,2, 479,4, 641,4 и 803,4 (соответствующее молекулярной массе СТЗ) в Q1 полного спектра сканирования. При положительном режиме ионизации m/z получены результаты от 311,3, 425,3, 440,4, 637,3, 827,3.

Выводы. Полученные результаты вселяют надежду на продолжение исследований по обнаружению структуры стевииолидных гликозидов стевии. Получение и рассмотрение структурных особенностей армянского медоносца позволят осуществить его использование, как в фитотерапевтических, так и для косметических целей. Продолжаются также исследования с целью внедрения армянского медоносца в пищевую промышленность страны, в частности, для получения фруктовых напитков, джемов.

Выражаем благодарность профессору Г.О. Торосяну за поддержку этой работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects / **R. Lemus-Mondaca, A.Vega-Galvez, et.al** // Food Chemistry.-2012.-132.-P. 1121.
2. Исследования по разрешению чистоты и структурных особенностей экстракта от армянского медоносца / **Г.О. Торосян, Е.К. Армуджян, А.Н. Кочарян, А.Р. Геворгян и др.** // Сборник статей по материалам научно-практической конференции с международным участием “Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017” (11 – 15 сентября 2017 г.) / Под ред. Ю.А. Омельчук, Н. В. Ляминой, Г. В. Кучерик. – Севастополь: СевГУ, 2017.-С. 1359.

3. Применение стевии, культивируемой в Армении, при лечении больных сахарным диабетом / **Х.О. Нагапетян, М.А. Бабаханян, О.В. Майтесян и др.** // Мед. наука Армении НАН РА.-2015.-Т. LV, № 3.- С.75.
4. Balance of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) macroelements in open- air hydroponics and in soil conditions / **M.A. Babakhanyan, L.M. Ghalachyan, L.E. Hovhannisyan, et. al** // Biolog. Journ. Armenia.-2014.-1(66).-P.54. [Armenian].
5. **Hurum D., Rohrer J.** Application Update 184: Mogroside V Determination by HPLC with Charged Aerosol and UV Detections, LPN2977, 2011. Thermo Scientific: Documents, Applications. www.dionex.com/.
6. **Adaway J.E., Keevil B.G., Owen L.J.** Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory // Ann Clin.Biochem.-2015.-52.-P.18.
7. **Adaway J.E., Keevil B.G.** Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol // Biomed Life Sci.-2012.-883.-P.33.
8. **Gao S., Zhan Q., Li J. et.al.** LC-MS-MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite I rat plasma // Biomed. Chromatogr.-2010.-24(5).-P.472.

**Հ.Ռ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Հ.Ն. ՔՈՉԱՐՅԱՆ, Ե.Կ. ԱՐՄՈՒՋՅԱՆ, Ն.Ս. ԹՈՐՈՍՅԱՆ
ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՄԵՂՐԱԽՈՏԻ (ՍՏԵՎԻԱՅԻ) ԼՈՒԾԱՄՉՎԱԾՔԻ ԱՆԱԼԻԶ ՄԱՍՍ-ՍՊԵԿՏՐԱՅԻՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ**

Կատարվել է հայկական մեղրախոտի լուծամզվածքի անալիզ՝ ստեվիոլ գլիկոզիդի զգայուն և ընտրողական կառուցվածքային հայտնաբերման նպատակով: Անալիզի կատարման համար օգտագործվել է Sciex ֆիրմայի Tri Quad™ 4500 կվադրուպոլ մասս-սպեկտրաչափ:

Առանցքային բառեր. հայկական մեղրախոտ, ստեվիա, ստեվիոլ գլիկոզիդ, քաղցրացուցիչ, մասս-սպեկտրային անալիզ, ՄՍ/ՄՍ մեթոդ:

**H.R. GEVORGYAN, H.N. QOCHARYAN, E.K. ARMUJYAN,
N.S. TOROSYAN**

**ANALYSIS OF THE AQUEOUS EXTRACT OF THE ARMENIAN HONEY
LEAF (STEVIA) BY THE MASS-SPECTRAL METHOD**

The analysis of the aqueous extract of the Armenian honey leaf (*Stevia*) is carried out. The Sciex's Triple Quad™ 4500 Quadrupole Mass Spectrometry has been used, for the sensitive and selective structural detection of steviol glycosides.

Keywords: Armenian honey leaf (*stevia*), steviol glycoside, sweetener, mass spectrometry method of analysis, MS/MS method.