

Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов,
С.Л. Люблинский

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, mdulya@gmail.com

Проведено исследование состава биологически активных компонентов мускуса кабарги в условиях комплексной пробоподготовки и последующего определения состава методом ГХ-МС с применением дериватизации силилированием и метилированием. Найдены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных компонентов. Подробно представлены результаты идентификации и определения содержания наиболее значимых (мажорных и минорных) компонентов в ткани железы в соответствии с библиотекой NIST 2014 и алгоритмом относительной нормализации. Предложены механизмы трансформации макроциклических компонентов (мускон, экзальтон), связанные с душистыми свойствами мускусной железы кабарги. Описаны возможные связи компонентов препарата на основе железы с биологическим эффектом. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности состава железы, предложены маркерные компоненты в составе мускусной железы и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных компонентов состава с биологическими эффектами.

Ключевые слова: кабарга (*Moschus moschiferus*), мускус, железа, газовая хроматография, масс-спектрометрия, дериватизация, андростероиды.

Введение

Кабарга (*Moschus moschiferus*) – небольшое, похожее на оленя животное, населяющее крутые, поросшие хвойным лесом скалистые склоны гор. Кабарга характеризуется стенофагией (узкоспециализированное питание животных) и преобладанием в ее рационе лишайников, доля которых очень высока и может достигать 95%.

Мускус (выделение особой железы) кабарги является одним из наиболее ценных природных биостимуляторов, применение которых в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине известно с середины IV века [1]. Он при-

меняется или как монокомпонентный препарат, или как обязательный базисный компонент различных комплексов поддержания жизнедеятельности и долголетия. Представленные в литературе по народной и региональной медицине данные свидетельствуют о его эффективности при инфекционных заболеваниях (иммуностимулирующее действие), вялом заживлении ран (регенеративное действие), нарушениях кроветворения (противоанемическое действие), состояниях хронического утомления, астении, последствиях черепно-мозговых травм, нарушений мозгового кровообращения, нейроинфекций (нейропротекторное,

ноотропное, психоэнергизирующее действие), онкологических заболеваниях (иммунный контроль над опухолевым ростом, повышение эффективности и переносимости лучевой и химиотерапии опухолей, ускоренное восстановление после хирургического лечения), а также для борьбы с импотенцией и бесплодием [10].

Экспериментальные и клинические наблюдения на мышах, крысах, морских свинках и кроликах показали, что мускус в дозах 1-100 мг/кг массы тела оказывает анальгезирующее и противовоспалительное влияние, вызывает спонтанные сокращения матки у крыс, тормозит перистальтику изолированной подвздошной кишки у кролика [10].

В экспериментальных исследованиях обнаружены антиокислительные (антиоксидантные) свойства мускуса кабарги [5, 12]. Антиоксидантные свойства мускуса предполагают эффективное его применение в профилактике и лечении заболеваний, причиной которых является оксидативный стресс, или в патогенезе которых он участвует. К таким заболеваниям относятся нейродегенеративные заболевания (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера, эпилепсия, деменция, рассеянный склероз), сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемически-реперфузионные поражения миокарда, дистрофия миокарда), сахарный диабет, заболевания дыхательной системы (респираторный дистресс-синдром, пневмония, бронхообструктивные заболевания), различные формы анемий, ретинопатии, катаракта, ревматоидный артрит, различные интоксикации.

Известно, что одним из компонентов стероидной фракции мускуса является

3 α , 17 β -андростандиол, у которого обнаружен модулирующий (стимулирующий) эффект на мелатонин-синтезирующие ферменты шишковидной железы – N-ацетилтрансферазу и гидроксидиндол-О-метилтрансферазу [12]. Следовательно, мускус железы может оказывать благоприятное действие на биологические ритмы человека, скорость процессов старения, процессы спонтанного канцерогенеза.

Такая широкая сфера его показаний к применению позволяет предположить, что в его составе могут присутствовать регуляторные соединения пептидной природы, гормонально активные комплексы и ростовые факторы, в т.ч. активирующие жизненный цикл стволовых клеток [4].

Представленные в литературе данные об эффективности применения мускуса кабарги, в т.ч. при инфекционных заболеваниях, вялом заживлении ран, нарушениях кроветворения, заболеваниях нервной системы, онкологических заболеваниях, импотенции и бесплодии, носят разрозненный, чаще всего – описательный характер. Они не введены в научный оборот, т.к. не соответствуют требованиям доказательной медицины. Каких-либо контролируемых доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности препаратов мускуса кабарги на сегодняшний день не проводилось. Перспективность для современной медицины новых биогенных стимуляторов, полученных из мускуса кабарги, основанная на многовековом опыте их применения в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине, не вызывает сомнений [2].

Несмотря на столь обширный период применения, состав активных компонентов мускуса кабарги остается малоизучен-

ным, не идентифицированы компоненты, ассоциированные с широким спектром биологической активности ткани. Известно, что в состав мускуса входят жирные кислоты, воски, ароматические и стероидные соединения, сложные эфиры холестерина. Основной носитель мускусного запаха связывают с присутствием в составе макроциклического кетона мускона. Однако с большинством из этих компонентов известные биологические эффекты не сопоставлены и не доказаны экспериментально. Более того, известно, что различные пробы мускуса по своей биологической активности не являются эквивалентными, и их эффективность варьирует от умеренной до очень высокой.

В связи с этим **целью** нашего исследования стала идентификация биологически активных соединений, обеспечивающих биологическую эффективность мускуса кабарги.

Задачи состояли в разработке методов пробоподготовки экстрактов мускусной железы в различных условиях, подборе условий дальнейшей дериватизации и их идентификации в природном сырье методом ГХ-МС анализа. На основе результатов выполненной работы будет возможно решать задачи стандартизации, в т.ч. биологической, природного сырья, разработки технологии получения эффективных лекарственных форм препаратов и методов контроля их качества.

Ранее из экстрактов секрета препуциальной железы самцов кабарги выделено более 20-ти различных природных соединений. Большинство из них идентифицированы с низким фактором надёжности в идентификации (табл. 1). Рядом работ было установлено, что в мускусе кабарги присутствуют мускон [15], стероидные гормоны, мускопиридины [6] и др. макроциклические соединения.

Таблица 1

Химический состав (% к весу экстракта секрета) мускусной железы

Компоненты секрета	Китайская кабарга [6, 13]	Сибирская кабарга [12]
Воски	17,0	38,0
Мускон	22,6	0**
Алифатические спирты	2,8	0**
Кислоты и фенолы	—*	10,0
Стероиды (суммарно)	46,4	38,0
Холестанол	—*	1,8
Холестерин	7,7	7,0
5 α -13,17-дикетоандростан	1,3	0**
5 β -3,17-дикетоандростан	1,3	0**
Δ^4 -3,17-дикетоандростан	1,7	0**
$\Delta^{4,6}$ -3,17-дикетоандростан	1,7	0**
Андростерон	3,1	3,0
Δ^4 -3 α -окси-17-кетандростан	—*	3,4
Δ^5 -3 β -гидрокси-17-кетандростан	1,2	0**
Эпиандростерон	0,7	0**
5 β -3 α -окси-17-диокиандростан	5,6	9,5
5 α -3 β , 17 α -диокиандростан	5,3	3,0
5 β -3 α , 17 β -диокиандростан	1,4	1,0
5 β -3 α , 17 α -диокиандростан	6,3	3,1

Примечания: * – данные отсутствуют, ** – соединение или отсутствует, или его концентрация менее чем 0,5%.

Мускусный запах секрету препуциальной железы придает смесь летучих компонентов железы, одним из которых является макроциклический кетон мускон (3-метилпентадеканон, рис. 1), содержание которого широко варьирует в зависимости от подвиговой классификации, ареала обитания и сезонности [14]. Так, у животных из географически удаленных популяций (Китай, Непал) его процентное отношение к весу исследуемого экстракта может составлять от менее чем 0,5% [15]

до 22,6% [6]. В образцах из др. мест обитания мускон не обнаружен [3].

Известно, что молекула 3-метилпентадеканона (мол. вес: 238 а.е.м., CAS 541-91-3) синтезируется рядом методов направленного органического синтеза через стадии циклизации и конденсации линейных карбоновых и дикарбоновых кислот [11], в которых исходными являются гексадекановая дикарбоновая, 3-метилгексадекановая и др. линейные кислоты (рис. 2).

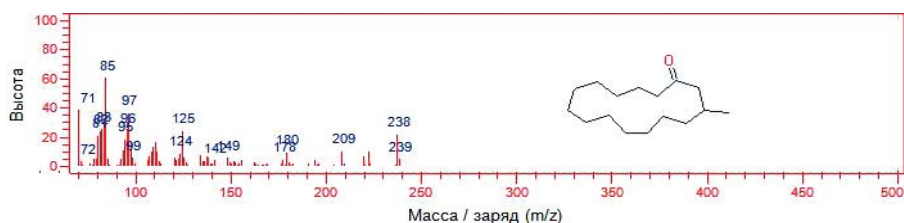


Рис. 1. Молекулярная структура и ГХ-МС спектр мускона (3-метилпентадеканона, CAS 541-91-3). Источник: Library NIST14.

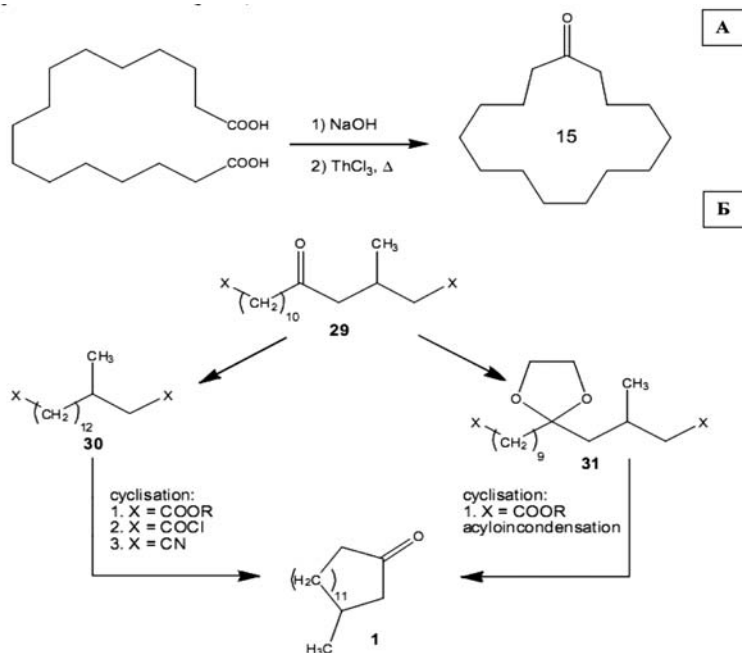


Рис. 2. Схема реакции циклизации гексадекановой дикарбоновой кислоты с образованием мусконподобного макроциклического кетона (пентадеканона, экзальтон) (А). Схема лабораторного получения мускона (3-метилпентадеканона, 1) из различных линейных карбопроизводных (Б).

Обратная реакция дециклизации и раскрытия цикла макроциклических мусконов может происходить как под воздействием внешних факторов (света, температуры), так и ввиду особенностей биотрансформации внутренней секреции в присутствии ферментов, металлопротеиназ и микробиоты мускусной железы.

Основу липидных компонентов мускуса составляют стероиды – 38,0-46,4%, в т.ч. холестеранол, холестерин и соединения ряда андростана (рис. 3). Среди липидов значительную долю (до 38%) занимают воски, т.е. сложные эфиры холестерина и высших жирных спиртов с длинноцепочными алифатическими кислотами. Воски могут играть роль инертной подложки, пролонгирующей сигнальное действие пахучих соединений. Они могут служить также источником свободных жирных кислот, например,

при ферментативной их трансформации. В составе секрета препуциальной железы в значительных количествах (до 10%) присутствуют свободные жирные кислоты и фенольные соединения, среди которых преобладают C_{16} – C_{24} и ароматическая фенилуксусная кислота. В липидах секрета присутствуют также не идентифицированные компоненты, которые в принципе могут выполнять сигнальную функцию, хотя содержание их в экстракте оказалось незначительным – менее 0,5%.

Обнаруженные межпопуляционные (или подвидовые) различия в составе выделений препуциальной железы кабарги могут быть обусловлены различным набором спектра предпочитаемых кормов. Обоняние у копытных играет решающую роль при выборе поедаемых растений. Пищевые предпочтения видов, ориентированные на запах расте-

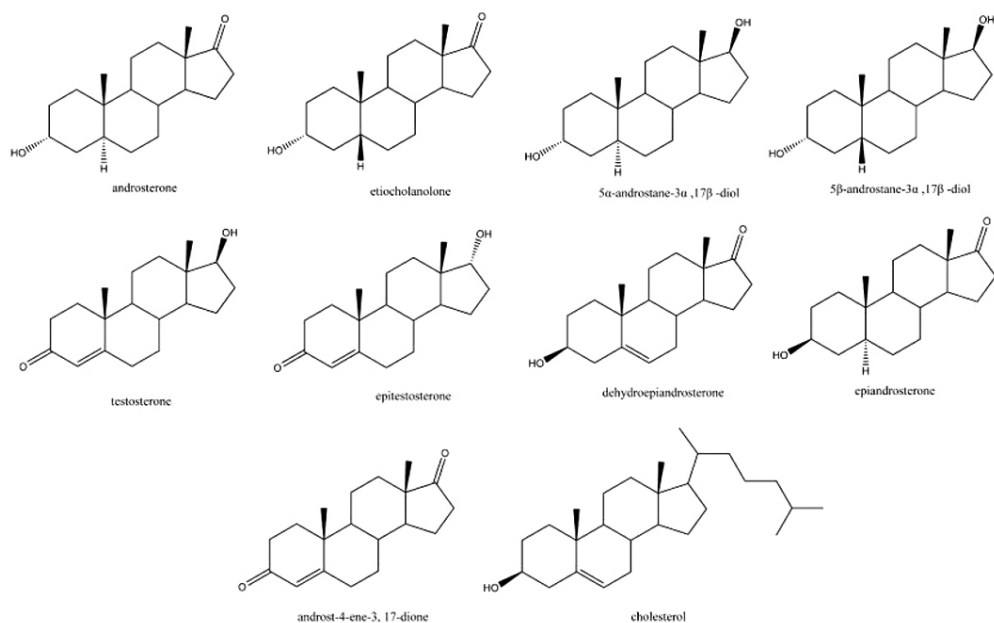


Рис. 3. Андрогенная группа стероидов, обнаруживаемая в мускусной железе кабарги (по данным [9]).

ний, широко используются в последние годы как самостоятельное направление химической экологии, а сам эффект получил название «ольфакторный опосементизм» [7]. Растения, обладающие предпочитаемыми запахами, не только удовлетворяют потребности животного в пище, но могут также служить источником поступления в организм ряда органических веществ, способных связываться с клетками-мишенями в специфических кожных железах.

Материалы и методы

Образцы для исследования

Изучаемыми объектами были нативные ткани мускусной железы кабарги сибирской (рис. 4), извлекаемые из мускусного мешочка – специфичного природного контейнера с зернистой темно-коричневой тканью. Препаратами сравнения выступали два объекта извлеченной мускусной железы кабарги китайской – коммерчески доступные образцы «Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance» двух различных партий, маркированные нами как Gold и Silver.

Первичным объектом для извлечения биологически активных компонентов является ткань мускусной железы, имеющей на своей поверхности фрагменты кожи, волос, фасций (рис. 4). Поэтому первым этапом подготовки ткани железы к последующему анализу является механическое освобождение образца ткани от инородных включений.

Пробоподготовка включала этапы механической гомогенизации и последующей экстракции компонентов, а также этапы химического тканевого лизиса для высвобождения активных компонентов из тканей в среде различных растворителей и значения pH.

Пробоподготовка для анализа жирно-кислотного состава мускусной железы кабарги

Условия экстрагирования из нативных тканей природного сырья являются наиболее значимой стадией для полного представления о качественном и количественном составе объекта.

Нами отработаны условия экстрагирования из ткани мускусной железы растворителями широкого ряда с раз-



Рис. 4. Общий вид ткани мускусной железы кабарги.

личной полярностью (этиловый спирт, диэтиловый эфир, гексан, этилацетат, третбутилметилвый эфир). Данный этап экстрагирования выполнен в условиях различного времени экстракции, гомогенизации и различных способов дериватизации (метилирование по Фолчу и силилирование).

Метилирование. Образец ткани мускусной железы в количестве 1,0 г подвергали в течение 24 ч обработке смесью 10 мл хлороформа с 10 мл метанола по Фолчу в присутствии 1% р-ра KCl для растворения липидных компонентов. Экстракт фильтровали через бумагу и после удаления избытка растворителей упариванием досуха подвергали кислотному гидролизу с целью получения смеси метиловых эфиров кислот. Для этого к омыляемой фракции добавляли концентрированную соляную кислоту до pH=2-3 для перевода калиевых солей карбоновых кислот в кислоты, после чего смесь выделенных жирных кислот трижды экстрагировали той же смесью. Растворитель удаляли в токе азота. Пере-

вод жирных кислот в метиловые эфиры осуществляли с помощью реакции этерификации (метилирование) в условиях кислой среды по ГОСТ Р 51486-99. Полученные МЭЖК трижды экстрагировали 10 мл смеси диэтиловый эфир+гексан (1:4 по объему). После удаления растворителя в токе азота при комнатной температуре сухой остаток МЭЖК взвешивали и растворяли в 1 мл хлороформа.

Газовая хроматография с масс-селективным детектором

Качественный и количественный анализ проводили на ГХ-МС анализаторе с масс-спектрометрическим детектором «Хроматэк», сопряженным с газовым хроматографом «Хроматэк-Кристалл 5000» и жидкостным дозатором «ДАЖ-2М (ЗД)».

Условия хроматографирования на капиллярной колонке CR-5ms, 30 м * 0,25 мм * 0,25 мкм, Cat.N 6.904.652: повышение температуры колонки в термостате с 70°C до 260°C со скоростью 10°C/мин; температура инжектора – 250°C, переходной линии – 250°C, детекто-



Рис. 5. Направление реакций дериватизации силилированием для надежного разделения и определения многокомпонентного состава мускусной железы кабарги.

ра – 200°C; поток гелия – 1,0 см³/мин; деление потока – 1:10; время анализа – 33 мин; ввод 1 мкл пробы.

Для надежной идентификации дериватов использовали автоматическую базу поиска и идентификации данных хромато-масс-спектрометрии NIST14 MS Library.

Дериватизация компонентов мускусной железы

Известны многочисленные варианты эффективной дериватизации первичных и вторичных аминов, карбоновых кислот, спиртов, стероидов методом силилирования. При ГХ-МС анализе определяемые аналиты химически модифицируются для обеспечения более разделяемых пиков с улучшенными хроматографическими свойствами – време-

нем удерживания и разрешением, а также более информативных масс-спектров после электронной ионизации (ЭИ).

Используя методы дериватизации силилированием для экстрактов мускусной железы кабарги, время удерживания полученных продуктов изменяется, а форма пика компонента значительно улучшается.

Результаты и их обсуждение

Весь пул хроматографически разделенных компонентов (рис. 6) был идентифицирован в автоматическом режиме (библиотека NIST14 MS Library) и подвергнут ранжированию по вкладам площадей каждого компонента в общий ионный ток и степени достоверности предложенных структур.

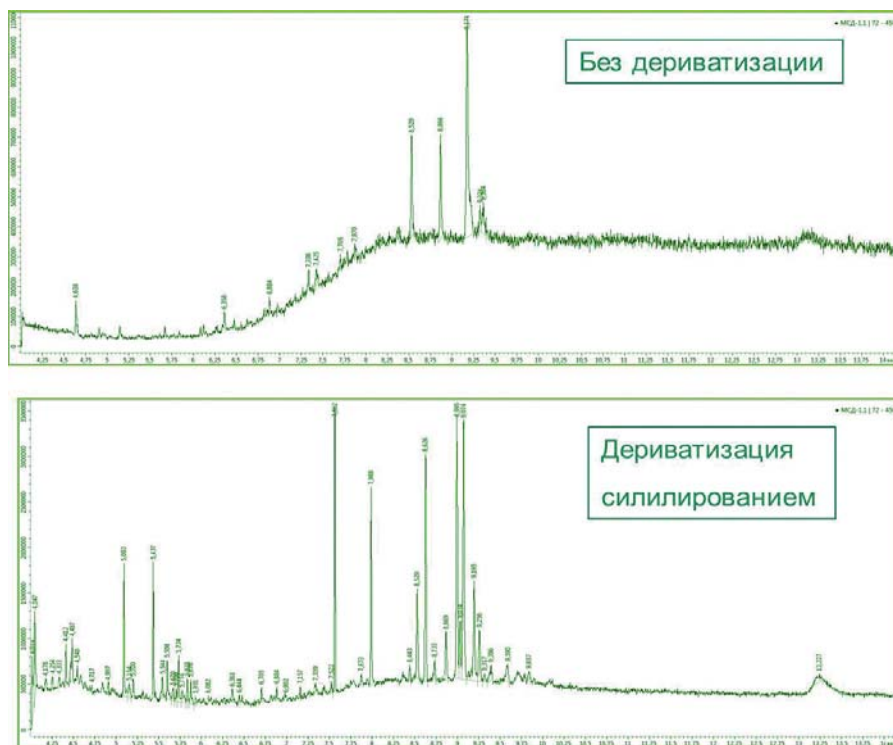


Рис. 6. Профиль хроматограммы ГХ-МС анализа субстанции мускусной железы без и после дериватизации силилированием.

Таблица 2

**Состав ткани мускусной железы кабарги сибирской по классам соединений
(после дериватизации силилированием)**

№ п/п	Группа	Типичные представители	Массовая доля, %
1.	Производные жирных кислот	Октадеканоидная, гексадеканоидная, тетракозаноидная, докозаноидная, гептакозаноидная, нонадеканоидная кислота и их эфиры	52,37
2.	Андростероны	Дегидроизоандростерона ацетат	6,92
3.	Ненасыщенные углеводороды (воска)	Докасен, нонадецен, метилнонадиен	4,59
4.	Стеро́лы (холестеро́лы)	Холестерол, холестеранон, холестаен, холестаенол	8,68
5.	Кетоны и альдегиды (мускон-подобные)	Эфиры бензальдегида, фуранона	4,48
6.	Эйкозаноиды и простаноиды	Арахидоновая кислота, эфиры эйкозаноидной кислоты	3,78
7.	Циклические производные	Производные циклопентанона, циклотетрадекана	7,26
8.	Спирты многоатомные	Пентанол, гептадеканол, нонадеканон, эритритол	2,34
9.	Эпокси-производные жирных кислот	Производные оксирана	2,54
10.	Пирролидины	Пирролифен	1,27
11.	Фумаровые эфиры жирных кислот	Фумаровая кислота, 2-хлорпропилтридециловый эфир	1,23
12.	Эстрогенные фитостеролы	17-Пентатриаконтен	1,02
13.	Пиримидиновые эфиры	5-(1,3-бутадиенил)-5-этил-гексагидропиримидин-2,4,6-трион	0,37
14.	Фенольные производные	3,5-дигидроксibenзойная кислота и её эфиры	0,56
15.	Фенотиазиновые производные	6-гидроксibenзо(а)фенотиазин-5-он	0,11
16.	Неидентифицированные липиды	-	2,48

Анализ состава экстрактов мускусной железы без дериватизации представлен малым количеством компонентов в сравнении с профилем состава с предварительной дериватизацией силилированием (рис. 6).

Состав экстрактов мускусной железы кабарги многообразен и представлен широким классом соединений, типов

их модификаций и имеет 15 основных групп веществ (табл. 2).

Количество определяемых соединений в экстракте мускусной железы в различных условиях экстрагирования и последующей дериватизации достигает 70-90 хроматографически разделяемых компонентов (рис. 7).

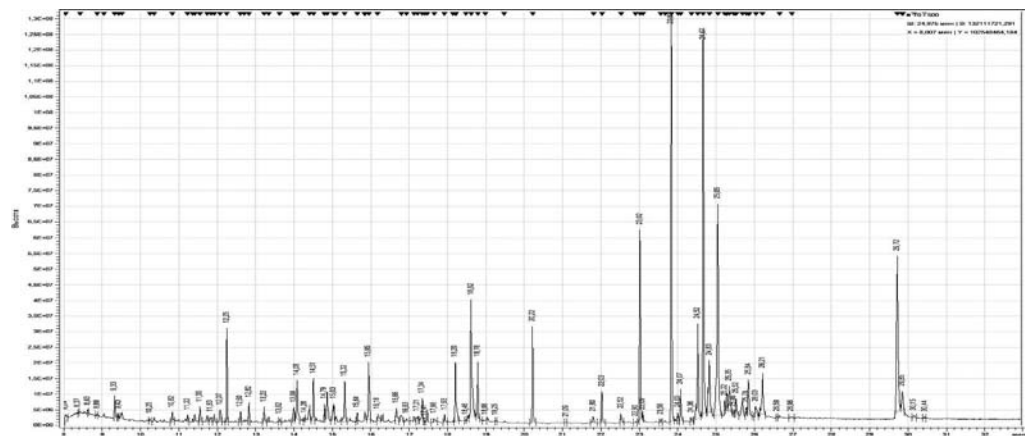


Рис. 7. Типичный вид хроматограммы ГХ-МС анализа экстракта мускусовой железы кабарги сибирской. В ГХ-МС анализе определено 93 соединения.

Определяемые компоненты сгруппированы нами по относительному уровню концентраций на мажорные (более 0,5 отн.%) и минорные (менее 0,5 отн.%) по вкладу площадей всех обнаруживаемых соединений в общий интегральный

пул по полному ионному току ГХ-МС хроматограмм. Доля мажорных компонентов в составе экстрактов ткани достигает 90 отн. %, диаграмма соотношения которых приведена на рис. 8 и в табл. 3.



Рис. 8. Диаграмма относительного содержания (%) мажорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги.

Таблица 3

Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации мажорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской (после дериватизации силилированием)

№ компонента	Содержание, отн. %	Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)	Наименование определяемого компонента
72	12,8	Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 β ,17 β)-, 2TMS derivative	Андростан-3,17-диол (3 α ,5 β ,17 β)
67	12,0	Etiocholanone, TMS derivative	Этиохоланон
74	9,8	Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 α ,17 β)-, 2TMS derivative	Андростан-3,17-диол (3 α ,5 α ,17 β)
89	8,2	Cholesterol, TMS derivative	Холестерол
63	6,0	Dehydroisoandrosterone acetate	Дегидроизоандростерон ацетат
54	5,1	Trimethylsilyl [4-(acetylamino)phenyl]acetate	4-ацетиламинофенилацетат
71	3,8	5 α -Androstan-3 β -ol-17-one, TMS derivative	5 α -Андростан-3 β -ол-17-он
58	2,8	Palmitic Acid, TMS derivative	Пальмитиновая кислота
51	2,5	Hippuric acid, TMS derivative	Бензоилглицин
73	2,5	Androstane-3,17-diol (3 α ,5 β ,17 β)-, 2TMS derivative	Андростан-3,17-диол (3 α ,5 β ,17 β)
19	2,4	5-Trimethylsilyloxy-5-methylhexanoic acid, trimethylsilyl ester	5-триметилгидроксис-5-метилгексановая кислота
39	2,1	4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative	4-гидроксibenзоуксусная кислота
86	2,0	Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative	Андростан-3,11,17-триол (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)
35	1,6	4-Hydroxybutanoic acid, 2TBDMS derivative	4-гидроксibутановая кислота
55	1,5	4-Hydroxyphenyllactic acid, 3TMS derivative	4-гидроксифенилпропионовая кислота
28	1,4	D-(+)-Glucosamine, 4TMS derivative	D-(+)-Глюкозамин
30	1,3	3-Methyladipic acid, 2TMS derivative	3-метиладипиновая кислота
83	1,2	Androst-5-ene-3 β ,17 β -diol, 2TMS derivative	Андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол
32	1,1	2-Ethyl-3-trimethylsilyloxy(trimethylsilyl) valerate	2-этил-3-гидроксивалериановая кислота
77	1,1	Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative	Андростан-3,11,17-триол (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)
60	1,0	Stearic acid, TMS derivative	Стеариновая кислота
69	1,0	Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 α ,17 β)-, 2TMS derivative	Андростан-3,17-диол (3 α ,5 α ,17 β)
90	1,0	Cholestan-3-ol, (3 β ,5 α)-, TMS derivative	Холестан-3-ол (3 β ,5 α)
81	0,9	Pregnane-3,17,20,21-tetrol, (3 β ,5 α ,20R)-, 4TMS derivative	Прегнан-3,17,20,21-тетраол (3 β ,5 α ,20R)
33	0,8	2-Methyl-1,3-pentanediol, 2TMS derivative	2-метил-1,3-пентандиол

№ компонента	Содержание, отн. %	Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)	Наименование определяемого компонента
45	0,7	2-Propylpentanoic acid, 2,3,4,6-tetra(trimethylsilyl)-1-glucopyranoside	2,3,4,6-тетрагидрокси-1-глюкопиранозид-2-пропилпентановая кислота
5	0,6	m-Cresol, TMS derivative	м-крезол
18	0,6	Butanoic acid, dimethyl(ethenyl)silyl ester	Диметилловый эфир бутановой кислоты
80	0,6	Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative	Андростан-3,11,17-триол (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)
85	0,6	Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative	Андростан-3,11,17-триол (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)
14	0,5	Benzeneacetic acid, TMS derivative	Бензолуксусная кислота
22	0,5	1,2-Butanediol, 2TMS derivative	1,2-бутандиол
23	0,5	1,3-Bis(trimethylsilyloxy)pentane	1,3-дигидроксипентан
27	0,5	α -Hydroxyisobutyric acid, 2TMS derivative	1-гидроксиизобутановая кислота
29	0,5	meso-Erythritol, 4TMS derivative	мезо-эритритол

Среди группы минорных компонентов, суммарно составляющих до 10 отн.%, нужно отметить установленное содержание ряда производных с широким спектром биологической активности, таких

как 4-меркаптобензойной кислоты, трифторацетата транс-дегидроандростерона, триметокси-12Н-бензоксипино-изохинолина, 3-цианохиноксалин оксида и некоторых др. (рис. 9, табл. 4).

Минорные компоненты экстракта мускусной железы



Рис. 9. Диаграмма относительного содержания (%) минорных компонентов в экстракте мускусной железы кабарги.

Таблица 4

Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации минорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской (после дериватизации силилированием)

№ компонента	Содержание, отн. %	Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)	Наименование определяемого компонента
61	0,4	trans-Dehydroandrosterone, trifluoroacetate	Транс-дегидроандростерона трифторацетат
10	0,3	Benzoic Acid, TMS derivative	Бензойная кислота
20	0,3	2-Methylpentan-2-ol, trimethylsilyl ether	2-метилпентан-2-ол
37	0,3	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	4-гидроксibenзойная кислота
40	0,3	4-Mercaptobenzoic acid, 2TMS derivative	4-меркаптобензойная кислота
47	0,3	2,5-Dihydroxybenzoic acid, 3TMS derivative	2,5-дигидроксibenзойная кислота
49	0,3	6,9,10-Trimethoxy-12H-benz(6,7)oxepino(2,3,4-i,j)isoquinoline	6,9,10-триметокси-12Н-бенз(6,7)оксепино(2,3,4)изохинолин
59	0,3	Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative	Олеиновая кислота
7	0,2	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid, 2TMS derivative	2-гидроксi-3-метилбутановая кислота
15	0,2	Butanedioic acid, 2TMS derivative	Бутандиовая кислота
16	0,2	3-Cyanoquinoxaline 1-oxide	3-цианохиноксалин оксид-1
34	0,2	3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	3-гидроксibenзойная кислота
42	0,2	Xylitol, 5TMS derivative	Ксилитол
44	0,2	2-Cyclopentene-1-carboxylic acid, 1-(4-methyl-3-pentenyl)-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, ethyl ester	1-(4-метил-3-пентенил)-2-гидроксi этиловый эфир 2-циклопентен-1-карбоксовой кислоты
48	0,2	α -D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate	α -D-глюкопиранозид метил-2-ацетиламино-2-деокси-циклик метилборанат
68	0,2	Androstane-3,17-diol, (3 β ,5 β ,17 β)-, 2TMS derivative	Андростан-3,17-диол (3 β ,5 β ,17 β)
75	0,2	5 α -Androstan-3 β -ol-17-one, TMS derivative	5 α -Андростан-3 β -ол-17-он

Несмотря на низкую представленность минорных компонентов, экспериментально найденных в ходе ГХ-МС анализа, присутствие подобных компонентов даже в микромолярных концентрациях способно значительно влиять на спектр биологической активности и их выраженность.

Молекулярные структуры некоторых классов активных минорных компонентов с предполагаемым наиболее выраженным спектром биологической активности представлены на рис. 10.

В составе препаратов сравнения (коммерческих образцов мускусовой железы кабарги) обнаружен менее выраженный

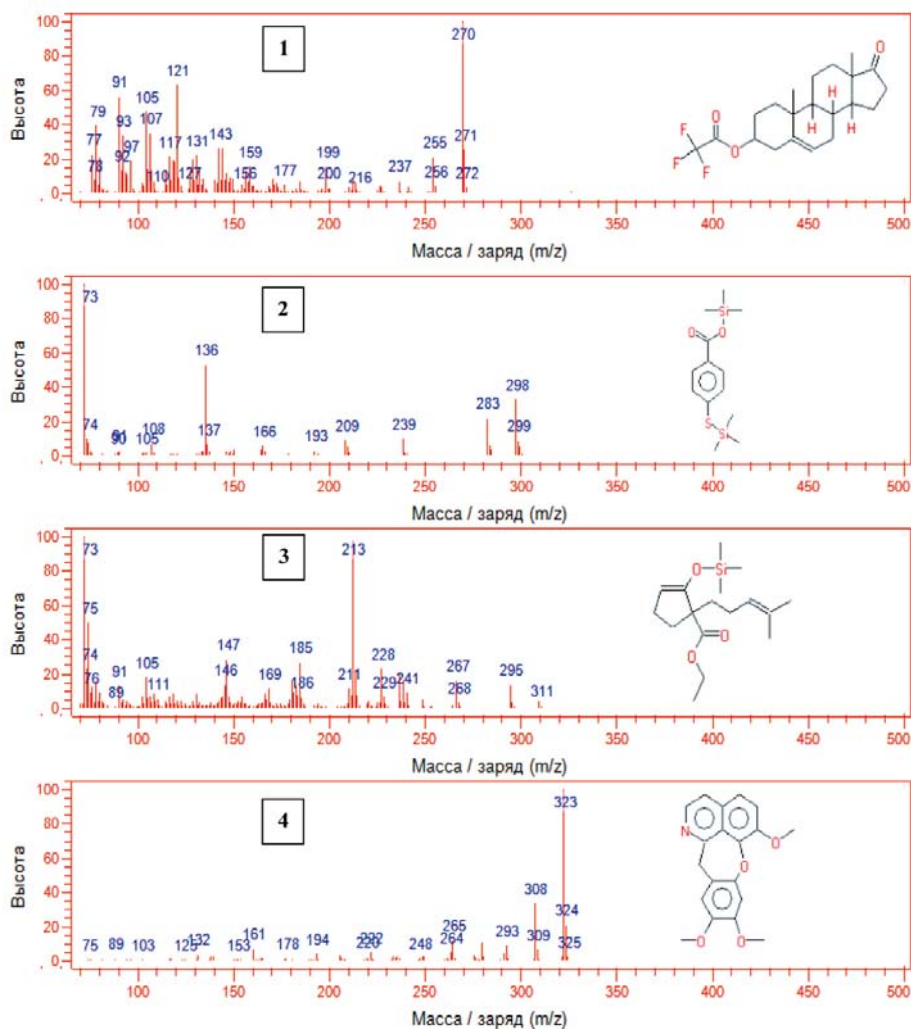


Рис. 10. Структурные формулы и ГХ-МС спектры дериватов минорных компонентов состава мускусовой железы кабарги сибирской.

Обозначения: **1** – Транс-дегидроандростерона трифторацетат; **2** – 4-меркаптобензойная кислота; **3** – 1-(4-метил-3-пентенил)-2-гидрокси этиловый эфир 2-циклопентен-1-карбоксой кислоты; **4** – 6,9,10-триметокси-12Н-бенз(6,7)оксепино(2,3,4)изохинолин. Источник: Library NIST14.

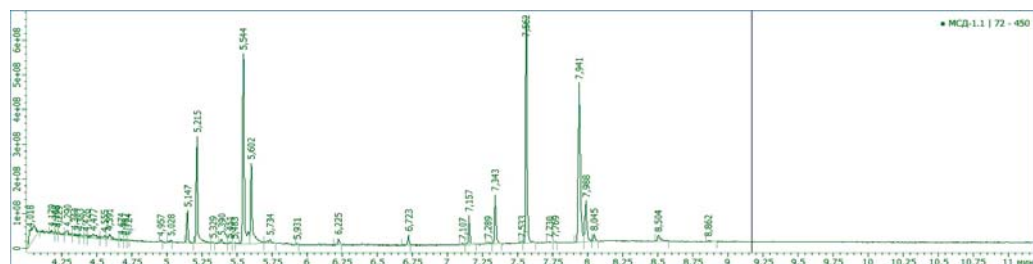


Рис. 11. Типичный вид хроматограммы ГХ-МС анализа экстракта мускусовой железы кабарги китайской. В ГХ-МС анализе определено 29 соединений.

и менее поликомпонентный профиль соединений. Так, в составе экстракта мускусовой железы кабарги китайской (Gold) в условиях экстракции, дериватизации и последующего ГХ-МС анализа обнаружено только 29 соединений (рис. 11).

Примечательно, что наряду с обнаруженными в составе обоих образцов срав-

нения мусконом (3-метилпентадеканон) и тоналидом (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин) – душистыми представителями мусконподобного ряда – установлено полное отсутствие соединений андрогеновой группы стероидов (табл. 5).

Литературный поиск показывает, что наряду с характерным запахом компо-

Таблица 5
Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги китайской (после дериватизации силилированием)

№ п/п	Наименование соединения	Время, мин	Площадь, %
1.	Dasycarpidan-1-methanol, acetate (ester)	4,02	0,11
2.	Benzyl alcohol	4,39	0,06
3.	Sorbic Acid	4,68	3,95
4.	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-	4,99	0,08
5.	Benzoic acid	5,30	23,70
6.	Hexanoic acid, 2-ethoxyethyl ester	5,62	0,17
7.	Pentadecane	5,68	0,09
8.	Thymol	5,73	0,11
10.	Glucosamine, N-acetyl-N-benzoyl-	5,97	0,14
11.	Dodecanal	6,12	0,13
12.	Octanoic acid, 2-ethoxyethyl ester	6,27	0,26
13.	Pentadecane	6,36	0,14
14.	Diethyl Phthalate	6,63	0,33
15.	2-Ethoxyethyl nonanoate	6,77	0,17
16.	Benzophenone	6,81	0,14
17.	Heptacosane	6,89	0,17
18.	1,4-Bis5-(4-bromophenyl)furyl-1-butene	7,00	0,55
19.	Benzyl Benzoate	7,10	1,40
20.	Decanedioic acid, bis(2-ethoxyethyl) ester	7,20	0,64
21.	7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin (Tonalid)	7,30	1,91
22.	Muscone	7,35	42,07
23.	n-Hexadecanoic acid	7,43	3,99
24.	Stearic acid, 2-hydroxy-1-methylpropyl ester	7,62	1,08
25.	Oleic Acid	7,82	1,78
26.	Dasycarpidan-1-methanol, acetate (ester)	7,86	0,38
27.	Stearic acid, 2-hydroxy-1-methylpropyl ester	8,05	8,26
28.	2-Butoxyethyl oleate	8,51	7,60
29.	11H-Dibenzoa,gquinolizin-11-one, 5,6,8,8a,9,10,13,13a-octahydro-2,3-dimethoxy-	8,57	0,19

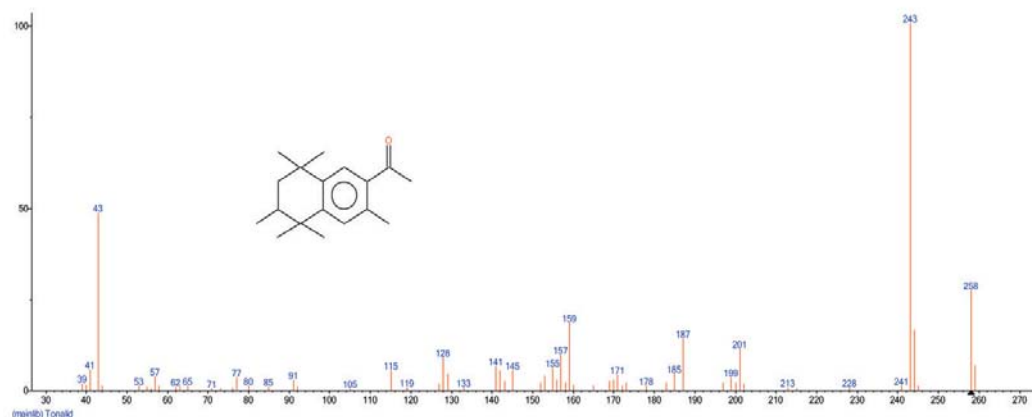


Рис. 12. Молекулярная структура и ГХ-МС спектр тоналида (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин, CAS 1506-02-1). Источник: Library NIST14.

нент тоналид (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин, рис. 12) обладает широким спектром андрогенной активности, проявляя подавляющее действие на ароматазу как ингибитор.

Анализ многокомпонентного профиля всех изученных образцов показал, что наибольшей информативностью обладает ГХ-МС после стадий пробо-

подготовки — экстракции этилацетатом, упаривания, концентрирования и дериватизации силилированием.

Нами предложено использовать группу андростероидов как маркерный показатель состава нативной ткани мускусовой железы кабарги в задачах фенотипирования, идентификации и входного контроля биологического сырья.

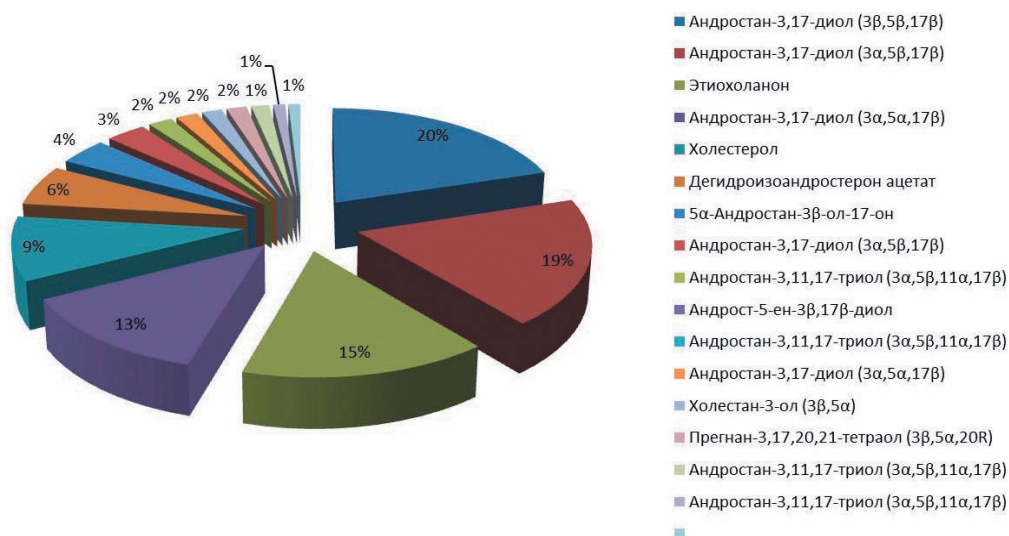
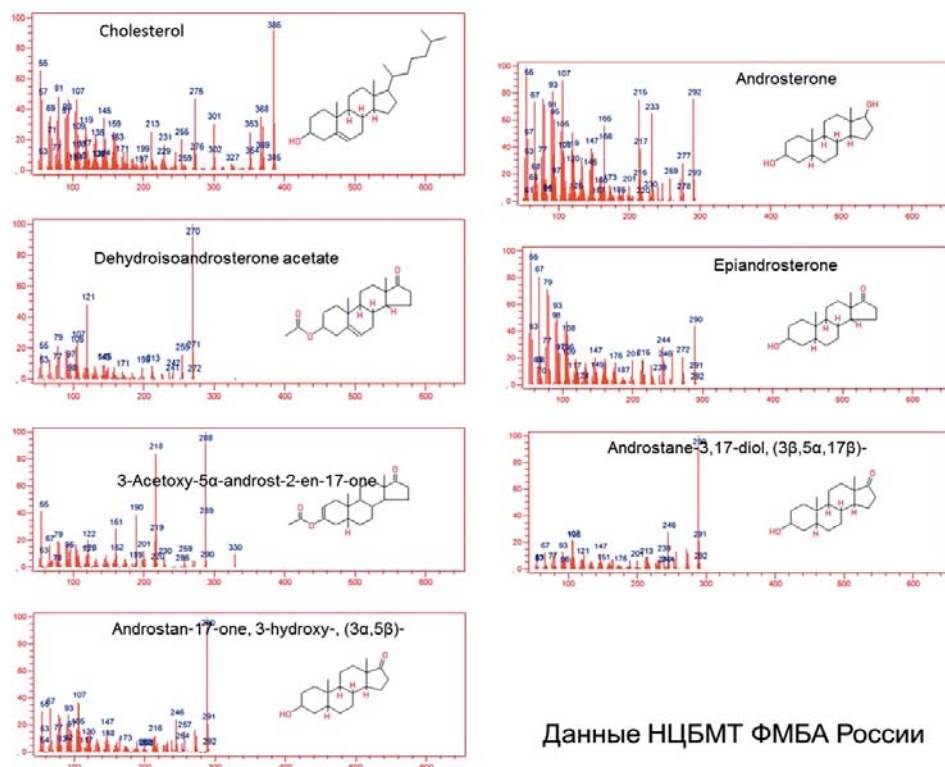


Рис. 13. Стерoidный профиль и относительное соотношение стероидов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской.



Данные НЦБМТ ФМБА России

Рис. 14. Типичные соединения андростероидной группы, обнаруженные в составе экстракта мускусной железы кабарги сибирской. Источник: Library NIST14.

Данный показатель может выступать критерием нормирования в разработке субстанции и лекарственных форм на основе мускусной железы кабарги.

Выбранная группа стероидов и их предшественников представлена 16-тью соединениями, преимущественно содержащимися в экстрактах ткани мускусной железы, каждый из которых в общем составе экстракта составляет более 0,5 отн. % (рис. 13, 14).

Структурные формулы наиболее типичных андростероидных производных, характерных для нативной ткани мускусной железы кабарги сибирской, а также их предшественников, представлены на рис. 14.

Выводы

1. В результате проведения ряда исследовательских работ по изучению состава мускусной железы кабарги отработаны методы пробоподготовки с экстрагированием в среде различных растворителей, условия дериватизации метилированием и силилированием, позволяющие надёжно идентифицировать многокомпонентный состав мускусной железы и проводить количественное определение. Обнаружены особенности биотрансформации мускона и мускон-подобных макроциклических кетонов в результате метаболизма и дециклизации.

2. В составе мускусной железы кабарги сибирской нами идентифицирова-

но 93 компонента. Установлено, что отличительными особенностями состава мускусной железы кабарги является наличие широкого ряда андростероидов, жирных ненасыщенных и насыщенных кислот (и их эфиров), кетонов и альдегидов (мусконподобные производные, придающие мускусной железе специфический запах), ароматических производных и гетероциклического класса соединений (пиримидины, фураны).

3. Предложено использовать группу андростероидов как маркерный показатель состава нативной ткани мускусной железы кабарги в задачах фенотипирования, идентификации и входного контроля биологического сырья. Данный показатель может выступать критерием нормирования в разработке субстанции и лекарственных форм на основе мускусной железы кабарги.

4. На основе результатов выполненной работы могут решаться задачи стандартизации (в т.ч. – биологической) природного сырья, разработки технологии получения эффективных лекарственных форм препаратов и методов контроля их качества. Многие из обнаруженных производных андростеронов, представленные как в группе мажорных, так и минорных компонентов состава, могут быть использованы для определения в биосредах фармакокинетических свойств субстанций и лекарственных форм на основе мускусной железы кабарги на доклинических и клинических стадиях с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

5. Известные из литературы по народной и региональной медицине данные о широком спектре биологической активности связаны с многокомпонентным и разнообразным по классам

соединений составом. Так, составные компоненты м-крезол и фурановые производные оказывают антисептическое и антибактериальное действие. Пиримидиновые производные проявляют иммуностимулирующее и гемостимулирующее действие при ряде инфекционных заболеваний, вялом заживлении ран (регенерационное действие), нарушениях кроветворения (противоанемическое действие). Кроме того, пиримидины являются антимикотиками широкого спектра действия. Производные бензойной кислоты в числе мажорных и минорных компонентов (4-гидроксibenзоуксусная кислота, 4-меркаптобензойная кислота) эффективны при кожных заболеваниях как наружные антисептические (противомикробное действие) и фунгицидные (противогрибковое) средства, а также при трихофитиях и микозах.

6. Обнаруженные жирные кислоты и их производные активно участвуют в обмене веществ у млекопитающих, формируя следующие полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК): пальмитолеиновая, олеиновая, линоленовая, арахидоновая (АК) и эйкозапентаеновая. В тканях мускусной железы определены и др. полиеновые жирные кислоты (C_{20} , C_{22} , C_{24}), образующиеся из линолевой и линоленовой кислот путем удлинения углеродной цепи. В клетках и тканях мускусной железы ПНЖК встречаются не в свободном состоянии, а в составе липидов различных классов: триглицеридов, фосфолипидов, кардиолипина, сфинголипидов, эфиров стеролов и жирных кислот (например, эфиры холестерина, восков). Линолевая (18:2) и α -линоленовая (18:3) ПНЖК являются незаменимыми, или эссенциальными, для человека и должны поступать в

организм с пищей. Именно эти ПНЖК являются предшественниками двух больших семейств длинноцепочечных ПНЖК (ДЦПНЖК) [ω -6 (линолевая) и ω -3 (α -линоленовая кислота)], выполняющих в организме очень важные функции, – пластическую и регуляторную [8]. Такие важнейшие ПНЖК, как линолевая, α -линоленовая и АК, называют витамином F. Биологические эффекты, оказываемые ω -3 ПНЖК, реализуются на клеточном и органном уровнях. Являясь структурным компонентом биологических мембран клеток, ω -3 ПНЖК оказывают непосредственное влияние на текучесть липидного биослоя, проницаемость мембран; мембраносвязанную ферментную активность; функционирование мембранных рецепторов и распознавание антигенов, а также электрофизиологические свойства мембран. Таким образом, ПНЖК оказывают регулирующее влияние на электрофизиологические свойства биомембран и функции мембранных белков, что имеет особое значение в тканях, обладающих высокой электрофизиологической активностью (ткани мозга, сетчатка глаза), и имеют выраженный биологический эффект в состояниях хронического утомления, астении, последствиях черепно-мозговых травм, нарушений мозгового кровообращения. Регулирующее влияние на организм ДЦПНЖК оказывают благодаря тому, что являются предшественниками эйкозаноидов. К ним относятся простаиноиды (простагландины, простациклины, тромбоксаны) и лейкотриены. Эйкозаноиды являются окисленными производными ПНЖК – эйкозатриеновой, АК и эйкозапентаеновой. Биологические эффекты производных ПНЖК ω -3 и ω -6 типов в большинстве своем противоположные,

поскольку ω -3 и ω -6 ПНЖК в организме метаболизируются в эйкозаноиды с участием одних и тех же ферментов, эти процессы идут параллельно и взаимоконкурентно. Правильное соотношение между ω -3 и ω -6 в пище важно для поддержания баланса гормональных, обменных, клеточных и др. процессов.

7. Широкий спектр обнаруженных мажорных и минорных производных андростероидов определяет биологические эффекты в процессах сперматогенеза и полового поведения, а также оказывает влияние на азотистый и фосфорный обмен. Биологическое действие андростероидов наиболее специфично проявляется в тканях-мишенях, где происходит его избирательное накопление: в клетках семенных канальцев, придатке яичка, предстательной железе, семенных пузырьках, гипоталамусе, матке, овариальных фолликулах. Синтез и секреция тестостерона зависит от андростероидов-предшественников и регулируются лютеинизирующим и фолликулостимулирующими гормонами гипофиза. При этом биологически активной формой тестостерона в организме млекопитающих является дигидротестостерон, широко представленный в составе мускусной железы кабарги. Спектр биологических эффектов андростероидной группы производных широко представлен: нейропротекторное, ноотропное, психоэнергизирующее действие, активность в онкологических заболеваниях (иммунный контроль над опухолевым ростом, повышение эффективности и переносимости лучевой и химиотерапии опухолей), токолитическое воздействие, ингибирующее действие на ароматазную активность, а также стимулирующее действие в процессах репродукции.

Список литературы

1. Кабарга: Энциклопедический словарь Брокгауза и Эфрона. – СПб, 1890-1907 гг., 86 томов. DVD-версия. ИДДК ООО «Дистрибьютор», 2010.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В. Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Люблинский С.Л. Очерки спортивной медицины. Т. 3. Векторы фармакорегуляции. – М., СПб: Айсинг, 2014. – 356 с.
3. Приходько В.И. Кабарга. Происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. – М.: Геос, 2003. – 443 с.
4. Уйба В.В., Котенко К.В., Корчажкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. Применение мускуса кабарги в клинической практике: метод. реком. – М., 2013. – 18 с.
5. Штолько В.Н., Золотова Н.Ф., Приходько В.И. Антиокислительная активность мускуса кабарги // Мат-лы конф. «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», Смоленск, 2007. – С. 138-140.
6. Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E. Study on the components of musk. I. Ether soluble components // Chem. Pharm. Bull. – 1975. – Vol. 23. – No. 3. – Pp. 629-635.
7. Eisner T., Grant R. Toxicity odor aversion, and “olfactory aposematism” // Science. – 1981. – No. 213. – Pp. 476-478.
8. Lauritzen L., Hansen H., Jorgensen M., Michaelsen K. The essentiality of long chain ω -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina // Progress in lipid research. – 2001. – No. 40. – Pp. 1-94.
9. Li D., Chen B., Zhang L. The musk chemical composition and microbiota of Chinese forest musk deer males // Scientific Report. – 2016.
10. Morichita S., Mishima Y., Shoji M. Pharmacological properties of musk // Gen. Pharmacol. – 1987. – Vol. 18. – No. 3. – Pp. 253-261.
11. Ruzicka L. Carbon rings VII: Constitution of muscone // Helv. Chim. Acta. – 1926. – Vol. 9. – 715 p.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prichodko V.I., Zinkevich E.P. Musk Deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of Main Lipid Components from Preputial Gland Secretion // J. of Chemical Ecology. – 1987. – Vol. 13. – No. 1. – Pp. 71-83.
13. Thevis M., Schänzer W., Geyer H., et al. Traditional Chinese medicine and sports drug test-

ing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts // Br. J. Sports Med. Published Online First. 2012. doi: 10.1136/bjsports-2012-090988.

14. Wang J.L., Huang H.M. The taxonomy and status of forest musk deer in China // Chem. Abstr. – 1980. – Vol. 180. – Pp. 102-110.
15. Yu D., Das B.C. Structure of hydroxymuscopiperidine A and hydroxymuscopiperidine B, two new constituents of musk // Planta med. – 1983. – Vol. 49. – No. 3. – Pp. 183-184.

References

1. Kabarga: Entsiklopedicheskiy slovar' Brokgauza i Efrona [Kabarga. Encyclopedic Dictionary of Brockhaus and Efron]. Saint-Petersburg, 1890-1907. 86 volumes. DVD-version. IDDK ООО «Distrib'yutor», 2010. (In Russian).
2. Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kotenko K.V., Lyublinskiy S.L. Ocherki sportivnoy meditsiny. T. 3. Vektory farmakoregulirovaniya [Sketches of sports medicine. V. 3. Vectors of pharmacoregulation]. Moscow, Saint-Petersburg: Aysing, 2014. 356 p. (In Russian).
3. Prikhod'ko V.I. Kabarga. Proiskhozhdeniye, sistematika, ekologiya, povedeniye i kommunikatsiya [The musk deer. Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow: Geos, 2003. 443 p. (In Russian).
4. Uyba V.V., Kotenko K.V., Korchazhkina N.B., Petrova N.B., Mikhaylova A.A. Primeneniye muskusa kabargi v klinicheskoy praktike: metod. rekom. [The use of musk musk deer in clinical practice: methodical recommendations]. Moscow, 2013. 18 p. (In Russian).
5. Shtol'ko V.N., Zolotova N.F., Prikhod'ko V.I. Antiokislitel'naya aktivnost' muskusa kabargi [Antioxidative activity of musk of musk deer]. Mat-ly konf. «Aktivnyye formy kisloroda, oksid azota, antioksidanty i zdorov'ye cheloveka» [Proceedings of the conference “Active forms of oxygen, nitrogen oxide, antioxidants and human health”]. Smolensk, 2007. Pp. 138-140. (In Russian).
6. Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E. Study on the components of musk. I. Ether soluble components. Chem. Pharm. Bull. 1975. Vol. 23. No. 3. Pp. 629-635.
7. Eisner T., Grant R. Toxicity odor aversion, and “olfactory aposematism”. Science. 1981. No. 213. Pp. 476-478.

8. Lauritzen L., Hansen H., Jorgensen M., Michaelsen K. The essentiality of long chain ω -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina». Progress in lipid research. 2001. No. 40. Pp. 1-94.
9. Li D., Chen B., Zhang L. The musk chemical composition and microbiota of Chinese forest musk deer males. Scientific Report. 2016.
10. Morichita S., Mishima Y., Shoji M. Pharmacological properties of musk. Gen. Pharmacol. 1987. Vol. 18. No. 3. Pp. 253-261.
11. Ruzicka L. Carbon rings VII: Constitution of muscone. Helv. Chim. Acta. 1926. Vol. 9. 715 p.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prichodko V.I., Zinkevich E.P. Musk Deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of Main Lipid Components from Preputial Gland Secretion. J. of Chemical Ecology. 1987. Vol. 13. No. 1. Pp. 71-83.
13. Thevis M., Schänzer W., Geyer H., et al. Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts. Br. J. Sports Med. Published Online First. 2012. doi: 10.1136/bjsports-2012-090988.
14. Wang J.L., Huang H.M. The taxonomy and status of forest musk deer in China. Chem. Abstr. 1980. Vol. 180. Pp. 102-110.
15. Yu D., Das B.C. Structure of hydroxymuscopiridine A and hydroxymuscopiridine B, two new constituents of musk. Planta med. 1983. Vol. 49. No. 3. Pp. 183-184.

Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector

V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, R.A. Ageldinov,
S.L. Lyublinskiy

The study of the composition of biologically active musk components of musk deer in integrated sample preparation and subsequent determination of composition was made by GC-MS with the use of derivatization by silylation and methylation. Optimal extraction conditions, chromatographic separation and relative quantification of the main components were found. The results of identification and determination of the content of the most significant (major and minor) components in the gland tissue in accordance with the NIST library 2014 and the algorithm of relative normalization are presented in detail. Mechanisms for the transformation of macrocyclic components (muscon, exaltone), associated with the fragrant properties of the musk gland of musk deer, are proposed. Possible links between the components of the drug on the basis of the gland with a biological effect are described. According to the research results the conclusions about the multicomponent nature of the composition of the gland proposed marker ingredients in the musk gland and the possible relationship of the discovered components of the composition with the biological effects.

Key words: musk deer (*Moschus moschiferus*), musk, tissue, gas chromatography, mass spectrometry, derivatization, androsterones.