

Определение специфичных вторичных метаболитов в корневище и надземной массе *Petasites hybridus* методом ВЭЖХ МС/МС

Determination of specific secondary metabolites in the rhizome and aerial parts of *Petasites hybridus* by HPLC-MS/MS

Коновалова И. А., Бердинских А. А., Алалыкин А. А.

Konovalova I. A., Berdinskikh A. A., Alalykin A. A.

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», г. Киров, Россия
E-mail: S-dulcamara@yandex.ru, stud228828@vyatsu.ru, aa_alalykin@vyatsu.ru
Vyatka State University, Kirov, Russia

Реферат. Белокопытник гибридный (*Petasites hybridus* (L.) G. Gaertn., B. Mey. et Scherb.) – западноевропейский вид, интродуцированный на территории Европейской России, который проявляет высокую инвазионную активность и признан видом-трансформером. Несмотря на широкое применение в народной медицине, фитохимический состав растения и возможные аллелопатические механизмы его агрессивного расселения остаются недостаточно изученными. Цель данной работы – определение специфичных вторичных метаболитов в надземных и подземных органах *P. hybridus* методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ МС/МС) для оценки ресурсного потенциала растения. Образцы корневищ и надземной массы собирали в сентябре на территории научно-образовательного центра «Ботанический сад» Вятского государственного университета. Экстракцию проводили метанолом с применением ультразвука, анализ выполняли на системе Shimadzu LCMS-8040 с обратной фазой колонкой. Идентификацию десяти целевых метаболитов осуществляли в режиме мониторинга выбранных ионов (SIM) на основе литературных данных. Установлена выраженная органоспецифичность распределения вторичных метаболитов. В надземной массе доминируют пирролизидиновые алкалоиды (более 93 % от суммы целевых соединений), главным образом сенкиркин (58,7 %) и туссилагин (23,9 %), что обуславливает высокую токсичность этой части растения. Корневище, напротив, накапливает преимущественно флавоноидные гликозиды (свыше 90 %): изокверцитрин (54,8 %) и астрагалин (36,1 %), обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Обнаруженная стратегия распределения метаболитов отражает экологическую адаптацию вида: химическая защита надземных органов от фитофагов и обеспечение устойчивости корневища с помощью антиоксидантов, которые могут также выполнять аллелопатическую функцию, способствуя инвазивному характеру роста. Новизна работы заключается в выявлении органоспецифичного профиля вторичных метаболитов *P. hybridus* и установлении связи между их распределением и экологическими функциями растения. Полученные данные обосновывают дифференцированный подход к использованию различных частей растения: корневища представляют перспективу как источник ценных флавоноидов для фармацевтической и косметической промышленности, тогда как надземная масса требует крайней осторожности из-за высокого содержания гепатотоксичных алкалоидов. Результаты создают основу для дальнейшего изучения биохимических механизмов инвазивности и разработки стандартизированных препаратов на основе корневищ белокопытника гибридного.

Ключевые слова. Высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ МС/МС), вторичные метаболиты, корневище, надземная масса, органоспецифичность, пирролизидиновые алкалоиды, флавоноидные гликозиды, *Petasites hybridus*.

Summary. *Petasites hybridus* (L.) G. Gaertn., B. Mey. et Scherb. is a Western European species introduced to the territory of European Russia, which exhibits high invasive activity and is recognized as a transformer species. Despite its widespread use in folk medicine, the phytochemical composition of the plant and the possible allelopathic mechanisms of its aggressive spread remain insufficiently studied. The aim of this work was to determine specific secondary metabolites in the aboveground and underground organs of *P. hybridus* using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to assess the resource potential of the plant. Samples of rhizomes and aboveground mass were collected in September on the territory of the Research and Educational Center «Botanical Garden» of Vyatka State University. Extraction was carried out with methanol using ultrasound, and analysis was performed on a Shimadzu LCMS-8040 system with a reversed-phase column. Identification of ten target metabolites was carried out in selected

ion monitoring (SIM) mode based on literature data. Pronounced organospecificity in the distribution of secondary metabolites was established. Pyrrolizidine alkaloids dominate in the aboveground mass (more than 93 % of the total target compounds), mainly senkirkin (58.7 %) and tussilagin (23.9 %), which determines the high toxicity of this part of the plant. The rhizome, in contrast, accumulates predominantly flavonoid glycosides (over 90 %): isoquercitrin (54.8 %) and astragalin (36.1 %), which possess antioxidant and anti-inflammatory properties. The detected strategy of metabolite distribution reflects the ecological adaptation of the species: chemical protection of aboveground organs from phytophages and ensuring the resilience of the rhizome with the help of antioxidants, which may also perform an allelopathic function, contributing to the invasive nature of its growth. The novelty of the work lies in identifying the organ-specific profile of secondary metabolites in *P. hybridus* and establishing the relationship between their distribution and the ecological functions of the plant. The obtained data substantiate a differentiated approach to the use of different parts of the plant: the rhizome represents a promising source of valuable flavonoids for the pharmaceutical and cosmetic industries, while the aboveground mass requires extreme caution due to the high content of hepatotoxic alkaloids. The results provide a basis for further study of the biochemical mechanisms of invasiveness and the development of standardized preparations based on the rhizomes of butterbur.

Key words. Aboveground mass, flavonoid glycosides, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), organospecificity, *Petasites hybridus*, pyrrolizidine alkaloids, rhizome, secondary metabolites.

Белокопытник гибридный (*Petasites hybridus* (L.) G. Gaertn., B. Mey. et Scherb.) – это западноевропейский вид, интродуцированный на территории Европейской России (Виноградова и др., 2020). Несмотря на широкое применение в народной медицине в качестве спазмолитического, седативного и противовоспалительного средства, растение обладает выраженным инвазионным потенциалом. В нашей стране *P. hybridus* официально признан видом-трансформером с первым инвазионным статусом (Сенатор, Виноградова, 2023). Его агрессивное расселение обусловлено особенностями структурной организации. Благодаря развитию геофильных побегов *P. hybridus* активно захватывает соседние территории, а система укороченных симподиально нарастающих корневищ способствует закреплению и удержанию освоенной площади (Коновалова и др., 2024). В то же время, фитохимический состав *P. hybridus*, определяющий его биоактивные свойства, а также возможные аллелопатические механизмы инвазии, остается недостаточно изученным. Цель настоящего исследования – определение специфичных вторичных метаболитов в надземных и подземных органах *P. hybridus* методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ МС/МС) для оценки ресурсного потенциала вида.

Корневища и надземную массу (листья с черешками) *P. hybridus* собирали в сентябре на территории Научно-образовательного центра «Ботанический сад» ВятГУ. Сырье измельчали до частиц размером 2 мм. Навеску измельченного сырья массой 0,2 г экстрагировали 2 мл метанола х.ч. в ультразвуковой ванне в течение 30 минут при температуре 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры экстракты фильтровали через шприцевые полиамидные фильтры «Chromafil Xtra PA-20/25» (диаметр пор 0,2 мкм) в хроматографические флаконы.

Анализ выполняли на хромато-масс-спектрометрической системе «Shimadzu LCMS-8040» (Япония). Разделение проводили на обратнофазной колонке «Dr. Maisch Reprosil-Pur Basic C18» (размер 150 × 2,0 мм, диаметр частиц 2,7 мкм) в градиентном режиме. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме мониторинга выбранных ионов (Selected Ion Monitoring, SIM). На основе литературных данных (Ożarowski et al., 2013; Kulinowski et al., 2022) был составлен перечень целевых вторичных метаболитов, характерных для рода *Petasites*, включающий сесквитерпеновые алкалоиды и основные классы фенольных соединений. Для каждого соединения в метод были внесены значения m/z их молекулярных ионов: протонированных $[M+H]^+$ (режим анализа ESI^+) или депротонированных $[M-H]^-$ (для режима ESI^-) в соответствующих временных окнах элюирования. Предварительная идентификация пиков проводилась путем сопоставления экспериментального времени удерживания и зарегистрированного m/z -сигнала с литературными данными.

Методом ВЭЖХ-МС/МС проведено количественное определение десяти целевых вторичных метаболитов в экстрактах корневища и надземной массы *P. hybridus* (табл. 1). В профиле вторичных метаболитов между этими структурами выявлены различия, что указывает на органоспецифичный характер их биосинтеза и накопления.

Таблица 1. Результаты определения специфичных вторичных метаболитов в органах *P. hybridus*

№ п/п	Компонент	Надземная масса		Корневище	
		Площадь	Содержание, %	Площадь	Содержание, %
Пирролизидиновые алкалоиды					
1	7-Ацетил-9-(2,3-диметилбутирил) ретронецин	–	–	11193825	5,488
2	7-Ангелоилретронецин	5443222	2,734	4064827	1,993
3	Интергерримин	4098510	1,787	134914	0,066
4	Сенкиркин	134706604	58,749	572967	0,281
5	Симфитин	14312543	6,242	242295	0,119
6	Туссилагин	54702274	23,857	334339	0,164
Флавоноидные гликозиды					
7	Изокверцитрин	4652094	2,029	111726558	54,774
8	Астрагалин	5813198	2,535	73601954	36,084
9	Кверцетин	3794728	1,655	1748745	0,857
10	Афзелин	1767238	0,771	356076	0,175
Всего:		229290413	100	203976500	100

Надземная масса *P. hybridus* характеризуется исключительно высоким содержанием пирролизидиновых алкалоидов, суммарно составляющих более 93 % от всех обнаруженных целевых метаболитов. Доминирующим компонентом является сенкиркин (58,7 %) – макроциклический диэфир, относящийся к наиболее гепатотоксичным и канцерогенным алкалоидам (Schenk et al., 2015). Второй по значимости – туссилагин (23,9 %), также обладающий выраженной токсичностью. Присутствие других алкалоидов, таких как симфитин, интергерримин и 7-ангелоилретронецин, дополнительно формирует высокий токсикологический характер надземных частей (Ożarowski et al., 2014). Эти данные свидетельствуют, что надземная масса белокопытника гибридного не может рассматриваться в качестве безопасного лекарственного сырья из-за высокой концентрации гепатотропных токсинов.

В то же время корневище растения демонстрирует иную картину. Оно является основным депо для флавоноидных гликозидов, суммарная доля которых превышает 90 % искомым компонентов. Ключевыми метаболитами здесь выступают изокверцитрин (54,8 %, 3-О-глюкозид кверцетина) и астрагалин (36,1 %, 3-О-глюкозид кемпферола). Данные соединения известны своими мощными антиоксидантными, противовоспалительными, капилляроукрепляющими и потенциально нейропротективными свойствами (Kim et al., 2008; Kulinowski et al., 2022). Корневище также содержит уникальный для этого органа алкалоид – 7-ацетил-9-(2,3-диметилбутирил)ретронецин (5,5 %), однако общий уровень токсичных алкалоидов в нем на порядки ниже, чем в надземной части.

Полученные данные иллюстрируют стратегию химической адаптации *P. hybridus*, где распределение вторичных метаболитов строго соответствует экологическим функциям разных органов растения. Доминирование пирролизидиновых алкалоидов, в первую очередь сенкиркина и туссилагина, в надземной массе связано с защитными задачами. Эти соединения, обладая выраженной гепатотоксичностью и горьким вкусом, эффективно защищают побеги от фитофагов. Кроме того, их участие в окислительно-восстановительных реакциях может способствовать поддержанию клеточного гомеостаза и устойчивости к окислительному стрессу, вызванному активным фотосинтезом (Kulinowski et al., 2022).

Корневище, как подземный запасующий орган, обеспечивающий вегетативное размножение особи, накапливает преимущественно флавоноидные гликозиды. Их основная роль для растения связана с мощной антиоксидантной активностью, направленной на нейтрализацию активных форм кис-

лорода в тканях подземных органов, поддержанием ионного баланса и, возможно, модуляцией сигнальных путей, регулирующих рост и взаимодействие с почвенной микрофлорой. Важно отметить, что многие фенольные соединения, включая обнаруженные, обладают известной аллелопатической активностью. Это свойство, наряду с особенностями структурной организации подземных органов, может быть одним из биохимических механизмов, способствующих инвазивному характеру роста *P. hybridus*, позволяя ему формировать плотные монодоминантные заросли.

Выявленная органоспецифичность требует дифференцированного подхода к использованию органов *P. hybridus* в качестве сырья. Надземная масса, несмотря на опыт применения в народной медицине в виде настоев от кашля или припарок при болезнях суставов и кожных поражениях, в современной фитотерапии представляет значительный риск из-за неустраняемого высокого содержания гепатотоксичных и потенциально канцерогенных алкалоидов. Ее применение может быть допустимо только в виде строго стандартизированных экстрактов для наружного использования или после фармакологического удаления алкалоидов. Корневище, напротив, представляет гораздо большую перспективу как сырье для фармацевтической, пищевой и косметической отрасли. Высокое содержание изокверцитрина и астрагалина, соединений с доказанной антиоксидантной, противовоспалительной, нейропротекторной и кардиопротекторной активностью, открывает возможности для разработки гепатопротекторных средств, противовоспалительных препаратов и функциональных добавок. Однако и здесь необходим тщательный контроль остаточного количества алкалоидов для гарантии безопасности.

Таким образом, органоспецифичный профиль метаболитов у *P. hybridus* является отражением его экологической стратегии: химическая защита надземных органов токсичными алкалоидами и обеспечение устойчивости корневища с помощью фенольных антиоксидантов, которые могут также выполнять аллелопатическую функцию, способствуя конкурентному преимуществу. Для человека это определяет двойственный потенциал растения: надземные части – биологически активный ресурс, требующий крайней осторожности; корневища – более безопасное и перспективное сырье для получения ценных флавоноидов, что задает вектор для селекции и разработки новых стандартизированных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

Виноградова Ю. К., Майоров С. Р., Яценко И. О. Спонтанная флора территории Главного ботанического сада как отражение динамики внедрения чужеродных видов растений в естественные экосистемы. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2020. – 385 с.

Коновалова И. А., Скоробогатая М. Н., Бердинских А. А. Структурная организация *Petasites hybridus* (L.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb. // Промышленная ботаника, 2024. – Вып. 24, № 3. – С. 72–77. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14112963>

Сенатор С. А., Виноградова Ю. К. Инвазионные растения России: результаты инвентаризации, особенности распространения и вопросы управления // Успехи современной биологии, 2023. – Т. 143, № 4. – С. 393–402.

Kim M.-Y., Yi J.-H., Hwang Y., Song K.-S., Jun M. Isolation and identification of antioxidant substances from the stems of butterbur (*Petasites japonicus*) // Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2008. – Vol. 37. – P. 979–984. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.8.979>

Kulinowski Ł., Vlad Luca S., Minceva M., Skalicka-Woźniak K. A review on the ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of butterbur species (*Petasites* L.) // Ethnopharmacol, 2022. – Vol. 15:293. – P. 115263. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115263>

Ożarowski M., Przysanowicz J., Adamczak A. Phytochemical, pharmacological and clinical studies of *Petasites hybridus* (L.) P. Gaertn., B. Mey. et Scherb. A review // Herba Polonica, 2013. – Vol. 59(4). – P. 108–128. <https://doi.org/10.2478/hepo-2013-0028>

Schenk A., Siewert B., Toff S., Drewe J. UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in *Petasites hybridus* extract // Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed., 2015. – P. 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.027>