

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова».

На правах рукописи



Фалёв Данил Иванович

**СКРИНИНГ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ
ТРИТЕРПЕНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМИ
МЕТОДАМИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
доцент, Косяков Д.С.

Архангельск
2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Общие сведения о пентациклических тритерпеноидах	12
1.2 Методы экстракции пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья	14
1.2.1. Традиционные методы экстракции	15
1.2.2. Ультразвуковая экстракция (УЗЭ)	16
1.2.3. Микроволновая экстракция (МВЭ)	18
1.2.4. Сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ)	19
1.2.5. Жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД)	20
1.3 Методы определения пентациклических тритерпеноидов	22
1.3.1 Методы газовой хроматографии	22
1.3.2 Методы жидкостной хроматографии	24
1.3.3 Особенности разделения ПЦТТ в ВЭЖХ	27
1.3.4 Скрининг и идентификация ПЦТТ	29
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	31
2.1 Оборудование	31
2.2 Реагенты и материалы	32
2.3 Растительное сырье	34
2.4 Экстракция ПЦТТ из растительного сырья	34
2.5 Характеристика компонентного состава субкритических экстрактов	35
2.6 Определение ПЦТТ методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС	36
2.7 Скрининг ПЦТТ в растительном сырье методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме сканирования ионов-предшественников	37
2.8 Скрининг ПЦТТ методом МАЛДИ-МС	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1 Разработка способа жидкостной экстракции ПЦТТ из растительного сырья	39

3.2 Характеристика субкритических экстрактов коры березы	44
3.3 Разработка подхода к определению ПЦТТ в коре березы методом обращенно-фазовой ВЭЖХ – тандемной масс-спектрометрии.....	50
3.3.1 Выбор метода ионизации.....	50
3.3.2 Оптимизация параметров ионного источника.....	51
3.3.3 Диссоциация тритерпеноидов, активированная соударениями	52
3.3.4 Оптимизация условий хроматографического разделения.....	53
3.3.5 Анализ субкритического экстракта коры березы.....	56
3.4 Определение широкого круга ПЦТТ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ – тандемной масс-спектрометрии	57
3.4.1 Масс-спектры ПЦТТ	60
3.4.2 Хроматографическое разделение ПЦТТ на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis.....	62
3.4.3 Метрологическая характеристика и валидация методики определения ПЦТТ в растительном сырье методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС	64
3.4.4 Анализ биомассы растений	67
3.5 Применение неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания для определения ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС	72
3.5.1 Влияние состава подвижной фазы.....	74
3.5.2 Влияние pH и ионной силы подвижной фазы	77
3.5.3 Оптимальные условия хроматографического разделения	79
3.5.4 Метрологическая характеристика и валидация методики	81
3.5.5 Анализ биомассы растений	85
3.6 Скрининг тритерпеноидов в растительном сырье методом ВЭЖХ- МС/МС в режиме сканирования ионов-предшественников	88
3.6.1 Выбор иона-продукта.....	88
3.6.2 Сканирование ионов-предшественников ПЦТТ в экстрактах растений	89
3.6.3 Определение ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП с применением стандартных образцов.....	93
3.6.4 Полуколичественное нестандартное определение ПЦТТ	97

3.7 Быстрый скрининг ПЦТТ в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ	100
3.7.1 Характеристика масс-спектров МАЛДИ пентациклических тритерпеноидов	100
3.7.2 Полуколичественное определение ПЦТТ методом МАЛДИ-МС	103
3.7.3 Анализ экстрактов растительного сырья	104
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	110

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем текстовом документе применяются следующие определения, обозначения и сокращения:

ЖХ	жидкостная хроматография
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
СФХ	сверхкритическая флюидная хроматография
ГХ	газовая хроматография
ОФ	обращенная фаза
МС	масс-спектрометрия
ПЦТТ	пентациклические тритерпеноиды
УФ	ультрафиолетовый
МАЛДИ	матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
ХИАД	химическая ионизация при атмосферном давлении
ФХИАД	фотохимическая ионизация при атмосферном давлении
ИЭР	ионизация электрораспылением
МЗР	мониторинг заданных реакций
ПО	предел обнаружения
НПОК	нижний предел определяемых концентраций
ЛД	летальная доза
ЖЭД	жидкостная экстракция под давлением
СКФЭ	сверхкритическая флюидная экстракция
МВЭ	микроволновая экстракция
УЗЭ	ультразвуковая экстракция
СИП	сканирование ионов-предшественников
МВИ	мониторинг выбранного иона
ПИД	пламенно-ионизационный детектор
Б	бетулин
Э	эритродиол
У	уваол
Ф	фриделин
Л	лупеол

βА	β-амирин
αА	α-амирин
БК	бетулиновая кислота
ОК	олеаноловая кислота
УК	урсоловая кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Пентациклические тритерпеноиды (ПЦТТ) являются вторичными метаболитами растений и широко распространены в природе. Их содержание наиболее велико в кожуре фруктов, листьях и коре растений и может достигать нескольких процентов и даже десятков процентов [1, 2]. ПЦТТ привлекают устойчивое внимание исследователей в связи с их высокой биологической активностью, выражающейся в гепатопротекторных, антибактериальных и противовирусных свойствах, а также жаропонижающем и ранозаживляющем действии [3, 4]. Особое значение имеет противоопухолевая активность этих соединений, которая, в сочетании с низкой токсичностью, обуславливает их применение для создания противораковых препаратов [4-6]. В связи с этим, большое значение приобретает разработка подходов к экспрессному и высокочувствительному определению, а также скринингу ПЦТТ в биомассе растений, включая создание способов максимально полного извлечения ПЦТТ из растительного сырья для последующего анализа.

Учитывая многообразие ПЦТТ, отсутствие в их структуре хромофоров с интенсивным поглощением излучения в ближней УФ-области, а также сложность компонентного состава биомассы растений, предпочтительными для их определения являются хромато-масс-спектрометрические методы. Вследствие малой летучести аналитов и необходимости их дериватизации при использовании газохроматографического разделения, наиболее перспективным представляется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, обеспечивающим высокую селективность и чувствительность анализа.

При решении задач быстрого обнаружения и скрининга ПЦТТ с минимальными пробоподготовкой и затратами реагентов особая роль может принадлежать методам масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ), отличающимся возможностью анализа больших массивов образцов и исключительной толерантностью к наличию различных посторонних соединений и примесей.

Среди многочисленных методов аналитического экстрагирования ПЦТТ из растительного сырья первостепенное значение имеет жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД), позволяющая максимально ускорить и автоматизировать процесс извлечения целевых компонентов и применяемая все более широко как для решения аналитических задач, так и создания технологий извлечения ценных природных соединений из биомассы растений в промышленных масштабах. Этот метод также известен как субкритическая экстракция.

Целью работы является разработка и совершенствование методов и подходов к скринингу и определению широкого перечня пентациклических тритерпеноидов различных классов в растительном сырье хроматографическими и масс-спектрометрическими методами.

Достижение поставленной цели предусматривает решение следующих практических задач:

- Поиск и создание методического подхода для экспрессного и эффективного извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья;
- Изучение хроматографического поведения различных классов пентациклических тритерпеноидов в условиях ВЭЖХ-анализа и разработка условий их экспрессного хроматографического разделения;
- Разработка подходов для быстрого скрининга ПЦТТ в растительном сырье с применением методов высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии МАЛДИ.
- Разработка методик ВЭЖХ определения ПЦТТ в растительном сырье методами высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии;
- Апробация разработанных методик скрининга и определения различных классов пентациклических тритерпеноидов в реальных объектах.

Научная новизна выполненных исследований и полученных результатов заключается в:

- Разработана аналитическая схема хроматографического и масс-спектрометрического скрининга и определения широкого перечня ПЦТТ различных классов в растительном сырье.
- Изучены влияние природы экстрагента, температуры и особенности извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья методом жидкостной экстракции под давлением;
- Установлены закономерности удерживания ПЦТТ различных классов в условиях жидкостной хроматографии на неподвижной фазе со смешанным механизмом удерживания и оптимизированы условия разделения аналитов;
- Получены данные об особенностях ионизации ПЦТТ в условиях МАЛДИ и на этой основе разработан новый подход к обнаружению и скринингу аналитов в экстрактах растений.

Практическая значимость полученных результатов заключается в разработке комплекса методических решений для быстрого и высокочувствительного определения и скрининга широкого круга ПЦТТ в растительном сырье.

Разработанные методики и подходы могут быть использованы при контроле сырья, полученной из него продукции, оптимизации технологических процессов.

Разработанный подход к высокоэффективному извлечению пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья методом жидкостной экстракции под давлением (субкритической экстракции) может быть успешно использован при создании новых технологий переработки биомассы растений.

На защиту выносятся следующие положения:

- Способ экстракционного извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья субкритическими растворителями.
- Методика одновременного определения десяти пентациклических тритерпеноидов (бетулин, эритродиол, уваол, фриделин, лупеол, β -амирин, α -амирин, бетулиновая кислота, олеаноловая кислота и урсоловая кислота) методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии.
- Закономерности хроматографического разделения пентациклических тритерпеноидов на неподвижной фазе со смешанным механизмом удерживания.

Методика экспрессного одновременного определения десяти тритерпеноидов методом жидкостной хроматографии со смешанным механизмом удерживания – тандемной масс-спектрометрии.

- Подходы к скринингу пентациклических тритерпеноидов методами жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии в режиме сканирования ионов-предшественников и МАЛДИ масс-спектрометрии.

Публикации. По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, индексируемых в базе Web of Science (Core Collection), а также 13 тезисов докладов.

Апробация работы. Результаты работы представлены в виде докладов и прошли апробацию на следующих научных конференциях: VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев 2014» (2014, Санкт-Петербург), XXIV Менделеевская конференция молодых ученых (2014, Волгоград), V Всероссийская школа – конференция молодых ученых «Сверхкритические флюидные технологии в решении экологических проблем» (2014, Соловки), IV Всероссийский симпозиум с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (2014, Краснодар), VI Международная конференция «Физикохимия растительных полимеров» (2015, Архангельск), VI Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (2015, Москва), VII Международная конференция «Физикохимии растительных полимеров» (2017, Архангельск), Третий съезд аналитиков России (2017, Москва), V Всероссийский симпозиум с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (2018, Краснодар). VIII Международная конференция «Физикохимии растительных полимеров» (2019, Архангельск), IX Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (2019 г., Москва).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 123 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков и 28 таблиц, в списке цитируемой литературы 123 источника.

Личный вклад соискателя заключается в том, что он, с учётом рекомендаций руководителя, непосредственно участвовал во всех этапах диссертационного исследования, в том числе планировании научной работы, постановке ее цели и задач, углубленном анализе научной литературы по теме диссертации, анализе и интерпретации полученных данных, их систематизации, подготовке публикаций по теме исследования. Экспериментальная работа в полном объеме выполнена лично соискателем.

Работа выполнена в рамках конкурсной части государственного задания Минобрнауки РФ (проект № 4.2518.2017/ПЧ) с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о пентациклических тритерпеноидах

Пентациклические тритерпеноиды – это кислородсодержащие органические соединения, состоящие из пяти карбоциклов, молекулы которых построены из шести изопреноидных звеньев, углеродный скелет соответственно состоит из тридцати углеродных атомов. Данные соединения являются вторичными метаболитами растений и широко распространены в растительном мире. Из них наиболее часто встречаются производные лупана, олеанана, урсана и фриделана, представленные на рисунке 1 [7].

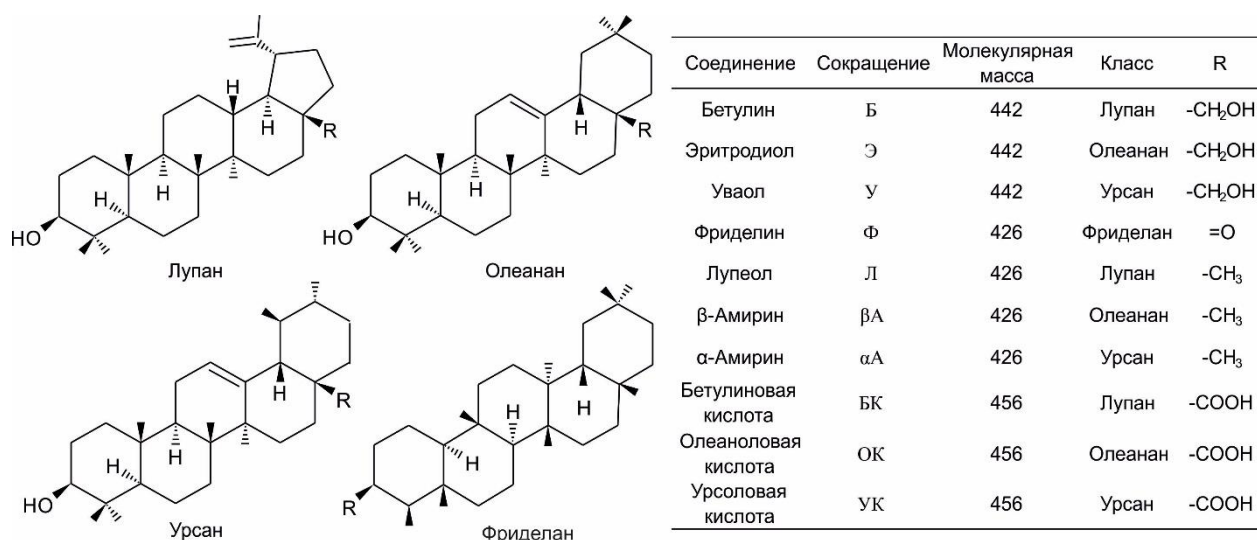


Рисунок 1. Структурные формулы основных классов пентациклических тритерпеноидов

Пентациклические тритерпеноиды, наряду с доступностью, обладают высокой биологической активностью. Ряд свойств пентациклических тритерпеноидов, связанных с биологической активностью, был известен еще в 19 веке. Так, в 1899 г. Вилер указал на антисептические свойства бетулина [8], благодаря чему его стали применять для стерилизации ран, порезов в виде пластырей, а в 1926 г. было сообщено об антирахитном действии бетулина [9].

За последние десятилетия появилось множество работ, посвященных фармакологическим свойствам тритерпеноидов. Одним из наиболее значимых

свойств данных соединений является противоопухолевая активность. Существует большое количество публикаций, посвященных изучению цитотоксичности или ингибирующей активности в отношении роста различных типов опухолевых клеток. Отмечается, что наиболее выраженной противоопухолевой активностью при этом обладает бетулиновая кислота и ее природные и синтетические производные [10-14].

Другими значимыми проявлениями биологической активности тритерпеноидов являются антивирусное действие, в том числе анти-ВИЧ активность, а также гепатопротекторные, противовоспалительные, антиоксидантные, антигиперлипидемические, противоязвенные, антимикробные, антикариогенные и другие свойства [15-23].

Оценить токсичность тритерпеноидов можно на примере бетулина, минимальная летальная (ЛД₁₆) и среднелетальная (ЛД₅₀) дозы для которого составляют 6500 мг/кг и 9000 мг/кг соответственно, что, согласно международной классификации, относит его к 4 классу малотоксичных веществ [24]. Благодаря низкой токсичности, ценность и значимость тритерпеноидов для медицины и фармацевтики дополнительно возрастает.

Бетулин был одним из первых выделенных тритерпеноидов в 1788 году Ловицем из березовой коры путем сублимации [25]. С тех пор растительное сырье остается основным источником ПЦТТ. В первую очередь, речь идет о богатых тритерпеноидами породах деревьев (высокое содержание в коре, листьях и других частях) семейства березовых, к которым относятся род ольхи (ольха черная, серая и другие) [26,27] и род березы (береза повислая, пушистая, белая, бумажная, плосколистная, желтая-аллеганская, новоаляскинская, карликовая, полезная и многие другие) [28-35]. При этом содержание бетулина и других пентациклических тритерпеноидов во внешней коре березы составляет от 10 до 40 % в зависимости от вида березы, места и условий её произрастания, возраста дерева. Наиболее распространениями видами на территории России и Евразии являются березы видов повислая (*Betula pendula*) и пушистая (*Betula pubescens*).

Помимо упомянутого древесного сырья, источниками ПЦТТ являются также многие лекарственные и пищевые растения, такие как каштан, алоэ вера, толокнянка, календула лекарственная, золототысячник, кофе арабийский, кизил, боярышник, эвкалипт, лаванда узколистная, яблоня домашняя, мелисса

лекарственная, нериум олеандр, базилик душистый, олива европейская, душица майорана, душица обыкновенная, анис, подорожник большой, платан кленолистный, вишня, груша, розмарин лекарственный, шалфей лекарственный, бузина черная, чабер горный, томат, сирень, гвоздичное дерево, тимьян, вербена лекарственная, омела белая, виноград культурный, трutowик лакированный, прутняк китайский, клюква, черника и многие другие. Пентациклические тритерпеноиды в них обнаруживались в различных частях растения, но с различной концентрацией в зависимости от вида и условий произрастания. Следует отметить, что в недревесных растениях в компонентном составе ПЦТТ большую долю занимают тритерпеновые кислоты, на которые может приходиться до 10 % от массы части растений растительного сырья [36-39].

1.2 Методы экстракции пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья

Исследования, направленные на поиск, идентификацию и определение любых биологически активных соединений в растительном сырье, являющемся чрезвычайно сложной матрицей, в первую очередь должны основываться на выборе эффективного метода экстракции и его оптимизации для максимально полного извлечения целевых аналитов (или классов аналитов). Являясь первым этапом аналитической процедуры, экстрагирование растительного материала играет решающую роль в достижении правильного результата анализа [40]. Наиболее распространенными факторами, влияющими на эффективность и скорость экстрагирования, являются свойства растительной матрицы, природа и характеристики экстрагента, температура, давление и продолжительность экстрагирования.

К настоящему времени, помимо традиционных методов экстрагирования (настаивание, экстракция по Сокслету и пр.) в практику химического анализа внедрены новые и более эффективные техники извлечения, которые более безопасны для окружающей среды благодаря уменьшению использования синтетических и органических химикатов, сокращению продолжительности

экстракции и улучшению выхода и качества экстракта. К ним относятся, прежде всего, экстракция ультразвуком, экстракция импульсным электрическим полем, микроволновая экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция и ускоренная экстракция субкритическими растворителями (жидкостная экстракция под давлением, субкритическая экстракция). В тоже время, некоторые традиционные методы, такие как экстракция по Сокслету, по-прежнему используются и считаются эталонными при разработке аналитических методик и оценки их эффективности.

1.2.1. Традиционные методы экстракции

Пентациклические тритерпеноиды могут быть извлечены из растительного сырья различными традиционными методами экстракции. Большинство из этих методов основаны на извлекающей способности различных используемых растворителей при атмосферном давлении и температурах, не превышающих точку кипения растворителя. Для повышения скорости процесса часто используется перемешивание или циркуляция экстрагента. Для извлечения ПЦТТ из растений наиболее значимыми традиционными методами экстракции являются экстракция по Сокслету и мацерация (настаивание).

При извлечении ПЦТТ из растительного сырья с использованием экстракции по Сокслету, продолжительность процесса, как правило, превышает 8 часов, а предпочтительными экстрагентами являются алифатические спирты (метанол или этанол) [41-43]. Как уже упоминалось выше, экстракция по Сокслету для извлечения пентациклических тритерпеноидов используется как эталонный метод, обеспечивающий практически количественное извлечение [44, 45].

Мацерация (настаивание) является наиболее простым экстракционным методом, однако, реже используется для извлечения ПЦТТ по сравнению с экстракцией по Сокслету [46-48], при этом выход ПЦТТ из растительного сырья вследствие малой растворимости этих соединений оказывается существенно (до двух раз) ниже при неприемлемо большой продолжительности процесса (длительность мацерации может достигать 72 ч).

Принимая во внимание данные обстоятельства, экстракцию по Сокслету в следует рассматривать как наиболее предпочтительный традиционный метод. В

случае ПЦТТ, оптимальными условиями для проведения исчерпывающей экстракции являются использование в качестве экстрагента этанола и продолжительности экстракции 12 ч.

Основными проблемами традиционных методов экстракции являются длительное время экстракции, потребность в больших объемах растворителей, испарение значительных количеств экстрагента и низкая селективность экстракции [49]. Чтобы преодолеть эти ограничения традиционных методов экстракции, разрабатываются новые и перспективные методы. Наиболее часто используемыми и значимыми подходами к извлечению ПЦТТ из растительного сырья являются ультразвуковая экстракция, микроволновая экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция и ускоренная экстракция субкритическими растворителями, которую также называют жидкостной экстракцией под давлением.

1.2.2. Ультразвуковая экстракция (УЗЭ)

Механизм извлечения ультразвуком включает два основных типа физических явлений: (а) диффузию через клеточную стенку и (б) вымывание содержимого клетки после разрушения стенок [50]. Содержание влаги в образце, степень измельчения, размер частиц и растворитель являются очень важными факторами для достижения высокой эффективности экстракции. Температура, частота ультразвука и время обработки при этом играют определяющую роль в оптимизации метода извлечения аналитов.

Преимуществами УЗЭ являются сокращение времени экстракции, затрат энергии и органического растворителя. Подвод ультразвуковой энергии для экстракции также способствует эффективному перемешиванию смеси образца и растворителя, более быстрой передаче энергии, уменьшенным температурным градиентам и возможности проведения процесса при пониженных температурах, селективному извлечению, уменьшенному размеру оборудования, более быстрому отклику системы на изменение параметров процесса, быстрому запуску, увеличению производства и устранению технологических этапов [51].

УЗЭ считается эффективным методом экстракции для извлечения ПЦТТ из растительного сырья. Авторы работы [52] показали эффективность экстракции

тритерпеноидов (тараксерол, β -амирин, α -амирин, лупеол, фриделин и др.) из трех видов растения рода *Chresta*. Обнаружено, что выход ПЦТТ при ультразвуковой экстракции гексаном в ультразвуковой ванне при частоте 60 Гц, мощности 125 Вт и температуре 30 °С, сопоставим с мацерацией в гексане при продолжительности экстракции 24 часа. В работе [53] авторы проводили экстракцию ПЦТТ (бетулина и других соединений) из древесины двух видов берез с помощью ультразвука с использованием ультразвукового зонда при 20 кГц и 750 Вт, в качестве экстрагента использовали дихлорметан. Во время работы варьировались следующие параметры: интенсивность ультразвука, продолжительность экстракции, пульсации, температура и соотношение экстрагент/растительный материал. Результаты сравнивались с выходом ПЦТТ при экстракции по Сокслету. Лучшие результаты были получены после 30–50 мин экстракции, при соотношении растворитель/древесная мука на уровне 150 мл растворителя на 1 г древесной муки, при 30 °С наблюдается максимум содержания ПЦТТ в экстрактах, а при повышении температуры до 40 °С выход тритерпеноидов снижается. Выход ПЦТТ при УЗЭ оказался примерно в 4 раза больше по сравнению с экстракцией по Сокслету дихлорметаном в течение 6 часов. Ультразвуковая экстракция для извлечения олеаноловой и урсоловой кислоты из гриба вида *L. lucidum* проводилась в работе [54]. Экстракцию проводили в ультразвуковой ванне при частоте 40 Гц, мощности 600 Вт. Показано, что лучшие результаты достигаются при использовании в качестве экстрагента 95% этанола, соотношение экстрагента к материалу при 20:1 и экстракции в течение 10 мин при 40 °С. Олеаноловая и урсоловая кислоты были извлечены из растения вида *Rabdosia rubescens* с использованием УЗЭ, процесс экстракции был оптимизирован с учетом растворителя, температуры и времени экстракции [55]. Экстракцию проводили в ультразвуковой ванне при частоте 43 Гц, мощности 250 Вт, варьировались температура экстракции, соотношение экстрагента к материалу, продолжительность экстракции и концентрация этанола как экстрагента. Оптимальными условиями экстракции олеаноловой и урсоловой кислоты является использование 70 и 90 % этанола соответственно, при температуре 55 °С в течении 40 мин. При этом результаты УЗЭ при оптимальных условиях сопоставимы с методом настаивания при встряхивании (90 % этанола при 80 °С в течении 60 мин). Бетулин, олеаноловую и бетулиновую кислоты экстрагировали из

коры березы плосколистной с использованием метода УЗЭ этанолом при 40 Гц, мощности ультразвука 100 Вт, времени воздействия 15 мин и температуры экстракции 60 °С [56].

Таким образом, можно сделать вывод, что ультразвуковая экстракция позволяет извлекать ПЦТТ из растительного сырья, при этом оптимальным экстрагентом является этанол (концентрация более 90 %), при продолжительности экстракции более 40 мин и при небольших температурах (40-60 °С). Метод характеризуется простотой используемого оборудования - достаточно использования ультразвуковой ванны.

1.2.3. Микроволновая экстракция (МВЭ)

Предполагается, что механизм экстракции при действии микроволнового излучения включает три последовательных этапа: во-первых, отделение растворенных веществ от активных участков матрицы образца при повышенных температуре и давлении; во-вторых, диффузия растворителя через матрицу образца; в-третьих, высвобождение растворенных веществ из матрицы образца в растворитель [57].

Для экстракции олеаноловой и урсоловой кислот из корня растения вида *A. Deliciosa* использовали МВЭ при варьировании четырех переменных, которые могли потенциально повлиять на эффективность экстракции: концентрации этанола, продолжительности экстракции, соотношения экстрагент/материал и мощности [58]. Оптимальными условиями были концентрация этанола 73 %, микроволновая мощность 362 Вт, соотношение экстрагент/твердое вещество (объем на массу) 15:1 и время экстракции 30 мин. Выход при экстракции ПЦТТ (олеаноловой, урсоловой и бетулиновой кислот, а также уваола и эритродиола) из листьев оливы, полученный за 5 минут с использованием метода МВЭ при 180 Вт и 80% этанола, был выше, чем при мацерации в течение 8 часов [59]. Авторы работы [60] показали повышенную эффективность метода МВЭ для извлечения олеаноловой и урсоловой кислот из плодов растений вида *C. Sinensis*, по сравнению с традиционными методами экстракции, которая выражалась в более быстрой экстракции с более высоким выходом и меньшим расходом растворителя. Оптимальными условиями были

мощность 600 Вт, температура 52 °С, соотношение растворителя и материала 32 мл к 1 г и время экстракции 7 мин. В работе [61] экстрагировали олеаноловую и урсоловую кислоты из растения вида *Ligustrum lucidum*. Оптимальными условиями экстракции были 80% водный раствор этанола, соотношение материала к экстрагенту составляло 1:15 и экстракции в течение 30 минут при 70 °С при мощности 500 Вт. МВЭ была применена для выделения ПЦТТ (бетулина, лупеола, бетулиновой кислоты и эритродиола) из внешней коры березы [62], определено что оптимальными условиями является использование этанола, при температуре 150 °С и продолжительности экстракции 30 мин, при этом выход ПЦТТ сопоставим с экстракцией по Сокслету. Отмечено что использование лимонена в качестве растворителя позволяет извлекать наиболее чистую фракцию бетулина.

Таким образом, микроволновая экстракция является приемлемым методом для экстракции ПЦТТ из растительного сырья, чаще всего используется в качестве растворителя этанол, при температуре до 150°С, мощности до 600 Вт и продолжительности экстракции до 30 мин.

1.2.4. Сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ)

Развитие сверхкритических флюидных технологий в последние годы привело к их расширяющемуся применению в экологических, фармацевтических и полимерных технологиях, а также анализе пищевых продуктов [63]. Широко известно применение техники СКФЭ в течение многих лет в индустрии переработки кофе для извлечения из зерен кофеина сверхкритическим диоксидом углерода [64].

Успешное извлечение биологически активных соединений из растительного сырья зависит от нескольких параметров СКФЭ, которые необходимо точно контролировать для максимизации преимуществ этой техники. Основными переменными, влияющими на эффективность экстракции, являются температура, давление, размер частиц и содержание влаги в исходном материале, время экстракции, скорость потока CO₂ и отношение растворителя к сырью [65].

В работе [39] авторы применяли СКФЭ для выделения фриделина из листьев растения вида *Maytenus aquifolium Martius*. Извлечение проводили сверхкритическом CO₂ при температуре 50 °С и давления 100 атм. Установлено, что

лучшие результаты достигаются при использовании в качестве модификатора 10% этанола или 10% метанола, при этом выход фриделина оказался в 1,2 и 1,8 раз больше, чем при использовании экстракции по Сокслету и мацерации, соответственно. Сверхкритический диоксид углерода в чистом виде, без добавок модифицирующего растворителя, дает более низкие выходы β -амирина (в 1,5-2 раза) из корня одуванчика, чем экстракция по Сокслету этанолом [66]. СКФЭ успешно использовалась для извлечения тритерпеноидов из грибов вида *Ganoderma lucidum* [67]. Оптимальными условиями экстракции были давление 25 МПа, температура 45 °С, продолжительность процесса 1,5 часа, а также применение в качестве модификатора этанола. Авторы работы [26] использовали СКФЭ для экстракции 11 пентациклических тритерпенов из коры ольхи, и наилучшие значения извлечения были при давлении 300 бар, температуры 60 °С и модификатора 10% этанола, при времени экстракции 1 час. При этом выход экстрактов был в 1,5 раза больше по сравнению с экстракцией по Сокслету гексаном. СКФЭ использовали также для извлечения ПЦТТ (бетулиновая, урсоловая, олеаноловая кислоты и другие) из коры эвкалипта, наилучшими результатами является использование модификатора 8% этанола при 160 бар и 40 °С. При этом достигнутый выход ПЦТТ был ниже, чем при экстракции по Сокслету дихлорметаном [68].

Таким образом, можно сделать вывод что использование СКФЭ возможна для экстракции ПЦТТ из растительного сырья, но только при использовании полярных модификаторов, чаще всего 10% этанола. Учитывая низкую растворяющую способность диоксида углерода по отношению к ПЦТТ и наличие среди них соединений с полярными группами, использование данного метода, как правило, не обеспечивает полное извлечение ПЦТТ из растительного сырья. Вероятно, эффективность сверхкритической экстракции может быть повышена за счет замены диоксида углерода другим растворителем, что, однако, ведет к усложнению аппаратного оформления метода.

1.2.5. Жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД)

Ускоренная экстракция субкритическими растворителями получила широкое распространение в аналитической практике с 90-х г.г. XX века. Этот метод также

известен как жидкостная экстракция под давлением. Концепция ЖЭД заключается в применении высокого давления для сохранения растворяющей жидкости выше нормальной температуры кипения. Высокое давление облегчает процесс экстракции. Возможность максимальной автоматизации, наряду с уменьшением времени экстракции и требований к растворителям, является важной причиной быстрого развития методов на основе ЖЭД. Техника ЖЭД требует небольших количеств экстрагента из-за сочетания высокого давления и температур, что обеспечивает более быструю и эффективную экстракцию. Высокая температура экстракции способствует повышению растворимости ананта, повышению скорости массообмена, снижению вязкости и поверхностного натяжения растворителей, изменению их полярности и донорно-акцепторных свойств за счет разрушения межмолекулярных связей, тем самым повышая эффективность экстракции.

Жидкостная экстракция под давлением при работе с биомассой растений часто демонстрирует наилучшие результаты по сравнению с СКФЭ за счет возможности выбора широкого круга экстрагентов с различной полярностью и использования весьма высоких температур. В последнее время данный метод находит все более широкое применение в аналитической практике. Так, имеется значительное количество публикаций по выделению флавоноидов, полифенолов, фенольных соединений, лигнанов, каротиноидов, масел и липидов, эфирных масел и других соединений из растительного сырья органическими растворителями при повышенных температурах и давлениях [69-73]. Несмотря на это, в литературе практически отсутствуют систематические исследования по влиянию различных факторов на процессы извлечения тритерпеноидов в субкритических условиях. Исключением является лишь работа Коскелы с соавторами [74], посвященная жидкостной экстракции под давлением и изучению антиоксидантных свойств экстрактивных веществ коры березы. Единственным определяемым соединением в ней являлся бетулин, а в качестве экстрагентов рассматривались вода и этанол. Было установлено, что бетулин составляет около 26 % от массы бересты, оптимальные условия его экстракции достигаются при использовании этанола, температуре 120 °С и давлении 50 атм. С использованием воды даже при высоких температурах (до 200 °С) достигается незначительное извлечение бетулина.

Жидкостную экстракцию под давлением можно рассматривать как наиболее перспективный метод извлечения ПЦТТ из растительного материала в аналитических масштабах и, соответственно, решения поставленных в настоящей работе задач.

1.3 Методы определения пентациклических тритерпеноидов

Если методы экстракции тритерпеноидов активно разрабатывались и широко описаны в литературе в связи с необходимостью решения практических производственных задач по получению фармацевтического сырья из биомассы растений, то разработке методов обнаружения, идентификации, скрининга и определения ПЦТТ в тканях растений посвящено относительно скромное количество публикаций.

В настоящее время в аналитической практике при определении ПЦТТ используются исключительно хроматографические методы, включающие как газовую, так и жидкостную хроматографию с различными вариантами детектирования.

1.3.1 Методы газовой хроматографии

Газохроматографический метод доминирует при определении ПЦТТ несмотря на ряд существенных недостатков и трудностей в его реализации. Прежде всего, к ним относятся необходимость предварительной дериватизации аналитов и проведение разделения при высоких температурах (более 300 °С). Первый фактор приводит к увеличению трудоемкости и продолжительности анализа, а также снижению его воспроизводимости. Низкая летучесть ПЦТТ и, как следствие, использование высоких температур, негативно отражается на сроке жизни хроматографических колонок, а также увеличивает уровень химических шумов на хроматограммах за счет фоновых сигналов фрагментов неподвижной фазы, элюирующихся с колонки (т.н. колоночный блидинг). В качестве детекторов при газохроматографическом определении ПЦТТ используют пламенно-

ионизационный (ПИД), а также масс-спектрометрический (МС), а разделение проводят на капиллярных колонках с неполярными неподвижными фазами.

Для определения тритерпеновых кислот (олеаноловой, урсоловой и бетулиновой) в растительном масле методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором использовалась дериватизация силилирующим агентом. Разделение происходит при 320 °С за 20 мин на капиллярной колонке SGL-5 (5% дифенил и 95% полидиметилсилоксан) [75]. Для определения бетулиновой кислоты в древесине и коре дерева вида *Platanus acerifolia* методом ГХ-ПИД также использовалась дериватизация силилирующим реагентом, разделение при этом проводилось при 310 °С в течение 15 мин на капиллярной колонке HP-5 (5% дифенил и 95% полидиметилсилоксан). Предел обнаружения составлял 20–200 мкг на 1 г растительного материала [76]. Использование метода ГХ с пламенно-ионизационным детектором при 300 °С позволило определить олеаноловую и урсоловую кислоты в 88 таксонах семейства растения *Lamiaceae* при времени анализа каждой пробы 22 мин. на капиллярной колонке HP-5 [77]. Для определения четырех ПЦТТ (олеаноловая кислота, урсоловая кислота, уваол и эритродиол) в листьях оливы методом ГХ-МС использовался аналогичный описанным выше подход, включающий силилирование и последующее разделение при 300 °С за 50 мин на капиллярной колонке VF-5 (5% дифенил и 95% полидиметилсилоксан). Предел обнаружения в экстрактах составлял 0,075 мг/л для кислот и 0,15 мг/л для диолов [78]. Применение метода ГХ-МС с предварительной дериватизацией позволило определять тритерпеновые кислоты в продуктах питания. При этом ПО для урсоловой кислоты составил 3 мг/кг [79]. В работе [68] определяли ПЦТТ в коре эвкалипта методом ГХ-МС на капиллярной колонке DB-1 (100% полидиметилсилоксан), с предварительной дериватизацией силилирующим агентом. Разделение осуществлялось при 290 °С за 70 мин. Аналогично, для определения широкого круга ПЦТТ в ягодах [80, 81] также использовали метод ГХ-МС, при разделении на капиллярной колонке HP-5, при 290 °С за 50 мин. Для дериватизации в этом случае использовали метилирование, затраты времени на которое достигали 24 ч.

Таким образом, применение газовой хроматографии с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектированием позволяет

проводить определение ПЦТТ в экстрактах растительного сырья при использовании предварительной дериватизации (как правило, силилирования). Разделение ПЦТТ проводится в основном на неподвижных фазах, содержащих 5% дифенила и 95% полидиметилсилоксана, при этом продолжительность анализа при определении нескольких компонентов может достигать 50-70 мин, а пределы обнаружения при этом составляют 0,075-0,15 мг/л.

1.3.2 Методы жидкостной хроматографии

Разделение ПЦТТ с использованием жидкостной хроматографии не требует предварительной дериватизации, что существенно упрощает аналитическую процедуру. Вследствие малой полярности большинства ПЦТТ, среди методов жидкостной хроматографии для их определения наибольшее применение находит обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) на октадецильных (C18) неподвижных фазах. Из методов детектирования до активного внедрения масс-спектрометрии наиболее часто использовалось спектрофотометрическое детектирование [55, 82-89]. Отсутствие в структуре ПЦТТ хромофорных групп, обладающих интенсивным поглощением в ближней УФ-области, вынуждает вести детектирование в коротковолновой области спектра (в диапазоне 205–210 нм) на фоне высокого поглощения растворителя, что затрудняет применение градиентного элюирования и ухудшает воспроизводимость анализа. Кроме того, данный метод характеризуется невысокой чувствительностью (пределы обнаружения находятся на уровне 0,19-7,35 мг/л), а также проблемами при анализе сложных матриц вследствие недостаточной селективности.

Такая же низкая чувствительность характерна и для использования ВЭЖХ систем с испарительным детектором светорассеяния (ИДС), значения ПО при этом находятся на уровне 0,3–6,8 мг/л [90–92].

Для понижения пределов обнаружения ПЦТТ использовалось сочетание ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием, при этом могут быть достигнуты величины ПО в диапазоне 0,5-1,36 мкг/л [1, 93]. Метод применим только для определения тритерпеновых кислот и предполагает введение дополнительной

стадии пробоподготовки – дериватизации аналитов с введением в их структуру флуорофоров.

В качестве очевидной альтернативы спектрофотометрическому, флуоресцентному и ИДС детектированию, обеспечивающей высокую чувствительность анализа без применения дериватизации аналитов в жидкостной хроматографии, следует рассматривать масс-спектрометрию, отличающуюся, помимо низких пределов обнаружения, исключительной селективностью и большим динамическим диапазоном.

В работе [94] предложен способ определения и идентификации 15 стероидов и двух ПЦТТ класса диолов (эритродиол и уваол) в омыленных растительных маслах методом ВЭЖХ-МС с химической ионизацией при атмосферном давлении (ХИАД) в режиме регистрации положительных ионов. Использование ВЭЖХ-МС с ионизацией электрораспылением (ИЭР) в отрицательном режиме для определения олеаноловой и урсоловой кислот в плазме крови крыс показало возможность достижения величин ПО в диапазоне 0,43-0,47 мкг/л [95] несмотря на исключительную сложность матрицы. Для выявления и количественного определения четырех пентациклических тритерпеноидов (бетулиновая кислота, урсоловая кислота, α -амирин и β -амирин) в экстрактах лекарственного растения вида *Souroubea sympetala* был разработан быстрый (продолжительность хроматографического анализа 28 мин) способ ВЭЖХ-ХИАД-МС [96], позволивший разделить две пары структурно близких соединений (кислоты и изомеры амирина) и наглядно показать преимущества масс-спектрофотометрического детектирования перед спектрофотометрическим. При определении бетулиновой кислоты, урсоловой кислоты, лупеола, β -амирина и α -амирина методом ВЭЖХ-ХИАД-МС в работе [97] достигаются значения ПО в диапазоне 0,01–6,6 мг/л для кислот и 300–610 мг/л для моноолов. Высокие значения пределов обнаружения связаны с применением режима сканирования полного масс-спектра, на порядки уступающего в чувствительности детектированию в режиме мониторинга выбранных ионов (МВИ) на квадрупольных масс-анализаторах, но обеспечивающему большие возможности для нецелевого анализа образцов. Подход на основе ВЭЖХ-МС в режиме МВИ с регистрацией отрицательных ионов был разработан для определения семи тритерпеновых кислот [98]. Показано, что использование ХИАД обеспечивает

более высокие интенсивности сигналов аналитов по сравнению с ИЭР несмотря на способность кислот к диссоциации - величины ПО составили 7,5-12 мкг/л. Аналогичный подход использовался и для одновременного определения семи тритерпеновых кислот в образцах плазмы крыс [99] в концентрациях от 0,67-1,08 мкг/л. Сравнение эффективности трех вариантов ионизации при атмосферном давлении (ХИАД, ИЭР и ФХИАД – фотохимическая ионизация при атмосферном давлении) для определения ПЦТТ показало несомненное преимущество ФХИАД и ХИАД, позволяющих достичь наименьших пределов обнаружения аналитов в ВЭЖХ-МС [100]. Авторами данной работы показано, что в качестве допанта для ФХИАД-МС оптимальным является использование толуола. Пределы обнаружения в режиме МВИ составили 3,6-24 мкг/л для ФХИАД и 0,6-252 мкг/л для ХИАД, при ПО при использовании режима сканирования оказались в 2,5-333 раза больше по сравнению с режимом МВИ.

Обобщая имеющиеся в литературе публикации, можно констатировать, что использование метода ВЭЖХ-МС предпочтительно в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении, при этом для тритерпеновых кислот достигается наиболее высокая чувствительность, остальные ПЦТТ демонстрируют типичные пределы обнаружения на уровне сотен мкг/л.

Инструментом для повышения чувствительности и, особенно, селективности определения тритерпеноидов при анализе сложных матриц, является тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС). Данный метод использовался в работах [59, 101–103] для определения тритерпеновых кислот с ионизацией электрораспылением, при этом были достигнуты значения ПО в диапазоне 10–91 мкг/л. В работе [104] разработан подход к ВЭЖХ-ФХИАД-МС/МС определению ПЦТТ, а значения ПО для различных ПЦТТ лежали в диапазоне 0,5–157,9 мкг/л. Применение метода ВЭЖХ-ХИАД-МС/МС для определения ПЦТТ в литературе до сих пор практически не встречалось, несмотря на широкую распространенность ХИАД в методиках ВЭЖХ-МС [94, 96–99]. Такое положение обусловлено приоритетностью определения тритерпеновых кислот в силу их более высокой биологической активности, дающих приемлемую интенсивность сигналов в ИЭР как более доступном и распространенном способе ионизации. Именно тритерпеновым кислотам посвящено подавляющее большинство доступных в литературе

исследований в области аналитической химии ПЦТТ. В качестве исключения можно рассматривать работу [105], в которой преимущества метода ВЭЖХ-ХИАД-МС/МС продемонстрированы на примере родственных ПЦТТ стероидов (тетрациклических тритерпеноидов) и лупеола, при этом для последнего удалось достичь величины ПО на уровне 2 мкг/л.

Таким образом, для проведения дальнейших исследований в области разработки и совершенствования методологии определения ПЦТТ наиболее перспективным следует признать применение жидкостной тандемной хроматомакс-спектрометрии в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении.

1.3.3 Особенности разделения ПЦТТ в ВЭЖХ

Учитывая наличие среди ПЦТТ большого количества изомерных соединений с идентичными молекулярными массами, применение любых масс-спектрометрических методов детектирования аналитов не позволяет обеспечить селективность анализа без предварительного хроматографического разделения изомеров. В связи с этим, разработка и оптимизация хроматографического разделения является ключевым моментом в разработке ВЭЖХ-МС методик определения ПЦТТ.

Как уже отмечалось выше, при разделении ПЦТТ методом ВЭЖХ преимущественно используются неполярные неподвижные фазы. При разделении на них основной проблемой является большое различие в полярности между отдельными классами ПЦТТ - кислотами (такими как бетулиновая, олеаноловая и урсоловая кислоты), содержащими полярные ионогенные карбоксильные группы, диолами (такими как бетулин, эритродиол и уваол) с двумя полярными гидроксильными группами и сильно удерживаемыми неполярными моноолами (такими как лупеол, α -амирин и β -амирин). Одновременное определение представителей данных классов аналитов требует реализации градиентного элюирования и значительной продолжительности анализа. Еще одним важным аспектом проблемы разделения ПЦТТ на классической обращенной неподвижной фазе является необходимость достижения достаточного хроматографического

разрешения между структурно-близкими изомерными соединениями внутри каждого из упомянутых классов ПЦТТ. Примерами являются эритродиол/уваол, α -амирин/ β -амирин и олеаноловая/урсоловая кислота, которые отличаются по структуре только положением метильной группы [100]. В этом случае, решение задачи сокращения времени разделения различных классов аналитов за счет применения градиентного элюирования ведет к потере разрешения между представителями каждого класса. Наоборот, попытки разделить структурные изомеры за счет снижения элюирующей силы подвижной фазы оказываются несовместимыми с решением задачи разделения отдельных классов ПЦТТ за приемлемое время. Вследствие этого, большинство доступных в литературе работ по определению ПЦТТ методом ВЭЖХ ориентировано на разделение узких групп аналитов, близких по своим свойствам, например, тритерпеновых кислот [83, 106, 107].

Преодоление указанных проблем возможно за счет использования неподвижных фаз с иной по сравнению с классическим октадецильным сорбентом селективностью. Простейшим примером такого подхода является использование обращенно-фазовых сорбентов с поперечно сшитой (полимеризованной на поверхности) октадецильной фазой, например, Zorbax Eclipse PAF, которые часто используются для разделения структурно близких полициклических ароматических углеводородов. Их успешное применение для разделения ПЦТТ оливкового дерева (четырёх тритерпеновых кислот и двух диолов) при продолжительности анализа 35 мин. описано в работах [108, 109]. Следует отметить, что среди выбранных аналитов отсутствовали наименее полярные моноолы, включение которых в список определяемых соединений привело бы к неприемлемому увеличению продолжительности разделения при использовании предложенной подвижной фазы вода-метанол (17:83).

Очевидно, что для обеспечения высокой скорости и эффективности разделения сильно отличающихся по свойствам классов ПЦТТ и соединений внутри каждого класса необходим принципиально иной подход, основанный на отказе от классических обращенных фаз в пользу мультифункциональных сорбентов со смешанным механизмом удерживания, которые обеспечивают удерживание по обращенно-фазовому, слабому анионообменному (для тритерпеновых кислот) и

гидрофильному механизмам с варьированием их вкладов в зависимости от состава подвижной фазы. В литературе известно успешное применение подобных сорбентов для разделения стевиола и его гликозидов [110], гербицида глифосата и родственных ему соединений [111].

Таким образом, перспективным является разработка подхода для определения пентациклических тритерпеноидов методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии с неподвижных фаз со смешанным механизмом удерживания. Решение такой задачи является одним из основных направлений настоящего исследования.

1.3.4 Скрининг и идентификация ПЦТТ

Ввиду многообразия ПЦТТ и их производных (например, сапонинов), синтезируемых растениями, помимо целевого определения приоритетных аналитов большое значение имеет решение задач нецелевого скрининга ПЦТТ без использования стандартных образцов. С этой целью невозможно использовать описанные выше подходы к масс-спектрометрическому детектированию, основанные на регистрации сигналов конкретных целевых ионов в режимах МВИ или МЗР. Анализ литературных данных показывает, что при использовании широко распространенных масс-спектрометров с тройными квадрупольными масс-анализаторами и других типов тандемных масс-спектрометров для решения задач скрининга соединений с общими структурными фрагментами наиболее эффективным является режим сканирования ионов-предшественников (СИП). Суть метода заключается в выборе общего для исследуемого класса аналитов иона, образующегося в ходе активированной соударениями диссоциации (ДАС) и мониторинге его сигнала в исследуемом образце при сканировании масс-спектра первого поколения ионов (MS^1). Детектируемые сигналы в этом случае будут соответствовать массам исходных соединений, дающих в ходе ДАС целевой характеристичный для аналитов фрагмент. Метод успешно применяется для скрининга различных природных соединений [112, 113], в то же время в литературе полностью отсутствуют публикации, посвященные его адаптации к скринингу

ПЦТТ. Учитывая, что пентациклические тритерпеноиды и их производные имеют схожий углеродный тритерпеновый скелет, перспективность метода масс-спектрометрии в режиме СИП для их поиска, идентификации и полуколичественного определения не вызывает сомнений и является одной из поставленных нами задач экспериментального исследования.

Еще одним перспективным методом быстрого скрининга ПЦТТ в сложных матрицах является масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ), которая отличается простотой и экспрессностью анализа, возможностью работать с малыми количествами исследуемых образцов и растворителей, а также исключительно толерантностью к наличию примесей. Несмотря на это, в литературе имеется очень ограниченный круг публикаций по применению МАЛДИ-МС для обнаружения тритерпеноидов, которые сосредоточены в основном на решении задач исследования состава растительных лаков и изучения процессов их старения [114–117]. В работе [114] сравнивали графит и 2,5-дигидроксибензойную кислоту в качестве матриц для МАЛДИ тритерпеноидов, при этом показано, что лучшее соотношение сигнал/шум достигается при использовании в качестве матрицы графита. Для эффективной генерации ионов в условиях активируемой графитом лазерной десорбции/ионизации используется катионирование ионами натрия [115]. В работах [116, 117] в качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту, дающую минимальное количество матричных пиков в низкомолекулярной области спектра. Еще один перспективный подход к получению МАЛДИ масс-спектров низкомолекулярных природных соединений заключается в применении в качестве матриц углеродных нанопокровов с толщиной порядка 50 нм, формируемых в ходе вакуумного осаждения паров углерода на металлической мишени. В сочетании с катионизацией солями лития, данный способ позволил зарегистрировать интенсивные сигналы ряда тестовых соединений, среди которых был бетулин [118]. Развитие данных подходов для широкого круга ПЦТТ также является задачей диссертационной работы.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование

В работе использовалось следующее основное аналитическое оборудование:

- Система ВЭЖХ-МС/МС, состоящая из tandemного масс-спектрометра с тройным квадруполем LCMS-8040, оснащенного источниками ИЭР и ХИАД, а также жидкостного хроматографа LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония), включающего два насоса LC-30AD с формированием градиента на стороне высокого давления, пятиканальный дегазатор DGU-A5, автосамплер LC-30AC, термостат колонок СТО-30А, диодноматричный спектрофотометрический детектор SPD-M30А. Управление системой ВЭЖХ-МС/МС, сбор и обработка данных осуществлялись с помощью программного пакета LabSolutions 5.65 (Shimadzu, Япония).
- Масс-спектрометр МАЛДИ Axima Resonance (Shimadzu-Biotech, Великобритания), оснащенный квадрупольной ионной ловушкой и времяпролетным масс-анализатором (QIT-TOF) с двухстадийным рефлектроном, а также азотным лазером (337 нм) с энергией вспышки 120 мкДж и продолжительностью 3 нс. Управление масс-спектрометром МАЛДИ, сбор и обработка данных осуществляли с помощью программного пакета Launchpad 2.9 (Shimadzu-Biotech, Великобритания).

Для характеристики экстрактов растительного сырья использовалось следующее вспомогательное аналитическое оборудование:

- Масс-спектрометр высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США) с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки, оснащенный источником ХИАД. Управление масс-спектрометром, сбор и первичная обработка данных осуществлялись с помощью программного пакета XCalibur 3.1.
- ЯМР-спектрометр высокого разрешения AVANCE III (Bruker, Германия) с резонансной частотой для протонов 600 МГц под управлением программного пакета TopSpin.

- Система газовой хроматографии – масс-спектрометрии QP-2010 Ultra (Shimadzu, Япония) с ионизацией электронами, оснащенная автодозатором AOC-5000 (Shimadzu, Япония).

Для подготовки проб использовалось следующее оборудование:

- Система ускоренной экстракции субкритическими растворителями ASE-350 с рабочим давлением 100 атм. (Dionex, США).
- Ультразвуковая ванна Elmasonic S15H (Elma, Германия).
- pH-метр HI 2215 (Hanna Instruments, Германия).

2.2 Реагенты и материалы

В работе использовали следующие реактивы: десять коммерчески доступных (Aldrich, Германия) пентациклических тритерпеноидов: бетулин ($\geq 98\%$), эритродиол ($\geq 97\%$), уваол ($\geq 95\%$), фриделин (техн.), лупеол ($\geq 90\%$), β -амирин ($\geq 98,5\%$), α -амирин ($\geq 98,5\%$), бетулиновая кислота ($\geq 97\%$), олеаноловая кислота ($\geq 97\%$) и урсоловая кислота ($\geq 90\%$), структурные формулы показаны на рисунке 2.

Исходные растворы аналитов в метаноле с концентрацией 250 мг/л готовили из точно взвешенных порций и хранили в темноте при 4°C не более одной недели. Рабочий и градуировочные растворы с концентрациями каждого соединения в диапазоне 25,0-0,0125 мг/л готовили путем смешивания и последовательного разбавления исходных растворов метанолом непосредственно перед экспериментом.

Для приготовления подвижной фазы использовались: ацетонитрил для градиентной хроматографии (0 сорт, «Криохром», Россия), метанол (HPLC grade, Merck, Германия), муравьиная кислота ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, США), формиат аммония (10 М, Sigma-Aldrich, США), деионизованная вода с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см, полученная с использованием системы Simplicity UV (Millipore, Франция).

В качестве растворителей для экстракции использовались: деионизованная вода, метанол (HPLC grade, Merck, Германия), этанол ($\geq 96\%$, ректификат), изопропанол ($\geq 99,9\%$, для хроматографии, «Компонент-Реактив», Россия), ацетонитрил (сорт 0, «Криохром», Россия), хлороформ ($\geq 99\%$, «Компонент-

Реактив», Россия), дихлорметан ($\geq 99,8\%$, Lab-Scan, Польша), ацетон ($\geq 99,8\%$, «Компонент-Реактив», Россия), гексан (сорт 1, «Криохром», Россия).

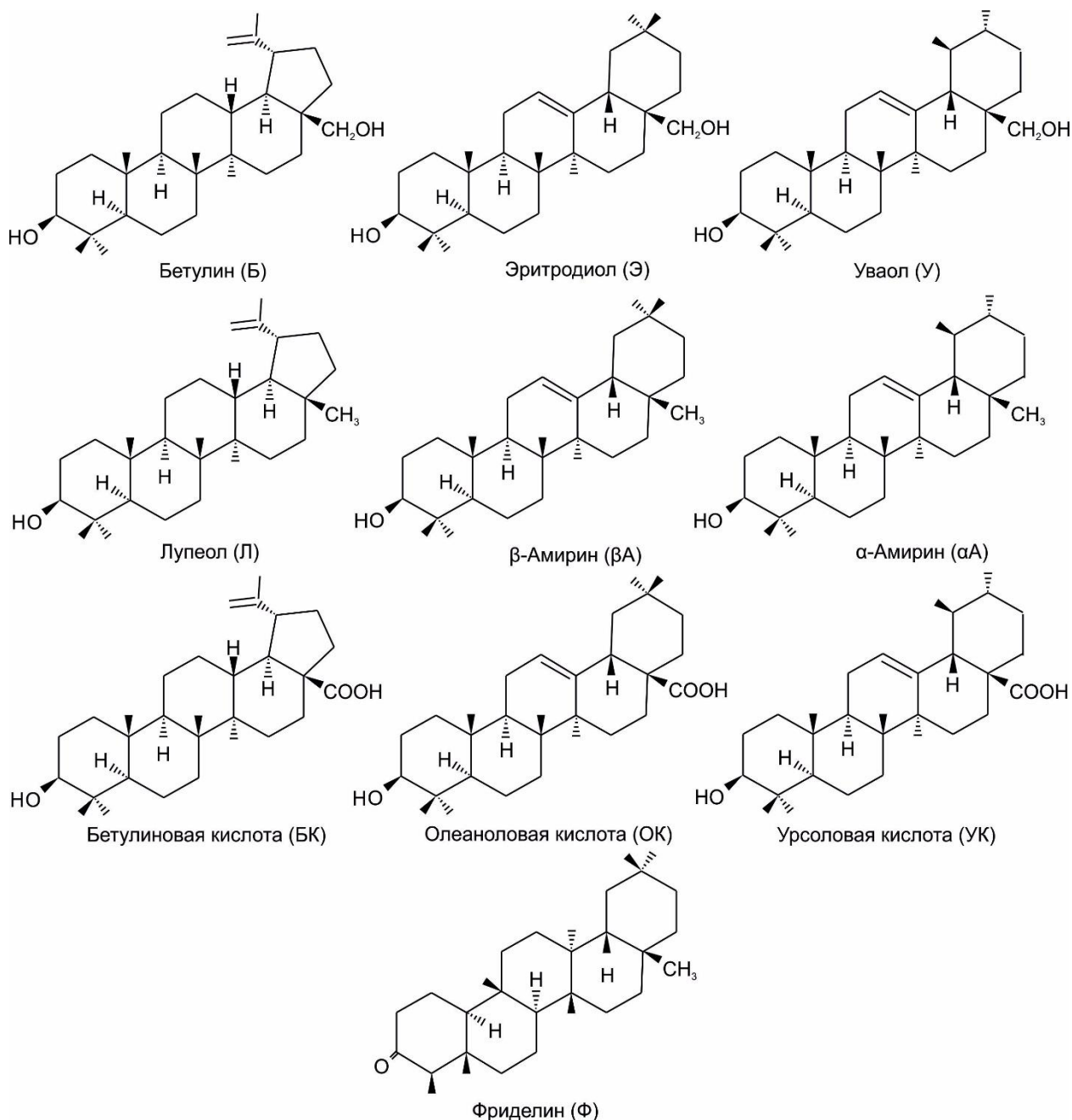


Рисунок 2. Структурные формулы пентациклических тритерпеноидов

В качестве катионизирующих агентов использовали трифторацетат лития (95%, Sigma Aldrich, США), трифторацетат натрия (98%, Sigma Aldrich, США) и хлорид калия (ACS reagent, 99,0 – 100,5%, Sigma Aldrich, США). Во всех экспериментах МАЛДИ-МС использовали стандартные мишени из нержавеющей стали (Kratos, Великобритания).

2.3 Растительное сырье

В качестве объектов исследования (образцов растительного сырья) использовали внешний слой коры березы повислой (*Betula pendula*) являющийся промышленным источником ПЦТТ, а также растения богатые данными соединениями и используемые в качестве продуктов питания и фармацевтического сырья: кожура ягод клюквы (*Vaccinium oxycoccos*) и брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), кожура яблок сортов «Golden Delicious» и «Red Delicious» и приобретенный в аптечной сети корень солодки (*Glycyrrhiza glabra*). Образцы высушивались в течение суток при температуре 50°C, после чего хранились в темноте в эксикаторе над силикагелем.

2.4 Экстракция ПЦТТ из растительного сырья

Жидкостную экстракцию под давлением (ЖЭД) проводили на системе ускоренной экстракции субкритическими растворителями ASE-350 (Dionex, США). Образец измельченного (до размера частиц 0,5-1 мм) сухого растительного материала (1 г) смешивали с 1 г диспергатора (диатомитовая земля) и помещали в 10-мл экстракционную ячейку из нержавеющей стали. Два цикла экстракции (10 мин каждый) проводили различными растворителями при температуре от 100 до 200°C и давлении 100 бар в атмосфере азота высокой чистоты (99,99%). Полученный экстракт (~ 30 мл) доводили до объема 50 мл, а затем аликвоту разбавляли в 10 раз метанолом, пропускали через нейлоновый мембранный фильтр (0,22 мкм) и подвергали хроматографическому анализу.

Исчерпывающую экстракцию по Сокслету проводили этанолом (200 мл) в течение 12 часов. В целлюлозную экстракционную гильзу помещали 5 г образца в смеси с 5 г гранулированного диатомитового наполнителя.

Ультразвуковую экстракцию проводили в ультразвуковой ванне Elmasonic (Elma, Германия) при температуре 50°C в течение 3 часов в этаноле (20 мл на 1 г образца).

2.5 Характеристика компонентного состава субкритических экстрактов

Исследования методом ГХ-МС проводили с использованием системы GC-MS QP2010Plus (Shimadzu, Япония). Условия хроматографирования: колонка капиллярная Rtx-5MS, диаметр 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм, длина 30 м. Ввод пробы с делением потока 1:50 Температура устройства ввода 280 °С. Газ-носитель – гелий. Управление потоком газа – постоянная скорость. Поток через колонку 1 мл/мин. Начальная температура термостата 60 °С, изотерма 5 мин, подъем со скоростью 20 °С/мин до 200 °С, подъем со скоростью 10 °С/мин до 300 °С, изотерма 20 мин. Температура устройства сопряжения 280 °С. Температура ионного источника 250 °С. Энергия ионизации 70 эВ. Напряжение на детекторе 0,8 кВ. Режим работы масс-детектора: Scan (сканирование диапазона). Диапазон сканирования: m/z 50 - 600. Идентификацию соединений проводили с использованием библиотек масс-спектров NIST-14 и Wiley.

Определение антиоксидантной активности экстрактов проводили фотохимическим методом (тушение люминесценции) с использованием анализатора Photochem (Analytik Jena, Германия). Градуировка прибора осуществлялась по тролоксу.

Регистрацию ^1H спектров ядерного магнитного резонанса проводили на ЯМР-спектрометре AVANCE III (Bruker, Германия) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Навески исследуемых образцов тритерпеноидов массой 20 мг растворяли в 0,8 мл CDCl_3 .

Масс-спектры высокого разрешения получали с использованием масс-спектрометра Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США) при разрешении 70000 FWHM в режиме ХИАД с детектированием положительных ионов. Применяли прямой ввод (5 мкл) растворов исследуемых образцов в ионный источник масс-спектрометра с потоком растворителя (ацетонитрил, 300 мкл/мин), создаваемым хроматографическим насосом LC-30AD (Shimadzu, Япония). Масс-спектры записывали в диапазоне m/z 50–750 с вычитанием фонового сигнала растворителя. Использовали оптимальные параметры ионного источника, обеспечивающие максимальную интенсивность масс-спектров: напряжение на капилляре – 5 кВ, поток осушающего, распыляющего газов и газа-завесы (N_2) – 25, 5 и 2

относительных единиц соответственно, температура линии десольватации – 250°C, температура распыляющего газа – 500°C, радиочастотное напряжение на S-линзе – 55 относительных единиц. Градуировку прибора проводили по пикам кластеров формиата натрия в исследуемом диапазоне масс. Погрешность определения m/z не превышала 3 ppm. На основе точных масс ионов определяли брутто-формулы компонентов экстрактов.

Для сравнения масс-спектров различных экстрактов применяли метод анализа главных компонент с использованием программного обеспечения Marker View (ABSciex, Канада). Предварительно проводилось выравнивание положений пиков в масс-спектрах при допустимом отклонении 3 ppm. Использовался тип нормализации Pareto.

2.6 Определение ПЦТТ методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС

При определении ПЦТТ использовали ВЭЖХ-МС/МС систему LCMS-8040. Разделение проводили на следующих хроматографических колонках:

- Shim-pack XR-ODS II, 30×3,0 мм, размер частиц сорбента 2,2 мкм (Shimadzu, Япония), октадецильная обращенная фаза;
- Nucleodur C18 Isis, 150×2,0 мм, размер частиц сорбента 1,8 мкм (Macherey-Nagel, Германия), обращенная фаза с поперечно сшитыми октадецильными группами;
- Zorbax Eclipse Plus C18, 150×3,0 мм, размер частиц сорбента 3,5 мкм (Agilent, США), октадецильная обращенная фаза;
- Zorbax SB-Aq, 150×3,0 мм, размер частиц сорбента 3,5 мкм (Agilent, США), октадецильная обращенная фаза с полярным эндкеппингом;
- Nucleodur PolarTec 150×2,0 мм, размер частиц сорбента 1,8 мкм (Macherey-Nagel, Германия), силикагелевая обращенная фаза с привитыми полярными функциональными группами (амид) и октадецильными концевыми группами;
- Acclaim Mixed-Mode WAX-1 150×2,1мм, размер частиц сорбента 3,0 мкм (Thermo Scientific, Sunnyvale, США), трифункциональная неподвижная фаза со смешанным механизмом удерживания, сочетающим анионообменные, гидрофильные и гидрофобные взаимодействия;

- Nucleodur HILIC, 150×3,0 мм, размер частиц сорбента 3,0 мкм (Macherey-Nagel, Германия), цвиттерионная неподвижная фаза с сульфобетаиновыми привитыми группами.

Хроматографическое разделение осуществлялось при температуре 40°C. Скорость потока элюента 0,4 мл/мин (для Shim-pack XR-ODS II: 0,6 мл/мин, Zorbax Eclipse Plus C18 и Zorbax SB-Aq: 0,8 мл/мин). Объем вводимой пробы составлял 2 мкл (для Shim-pack XR-ODS II – 10 мкл).

Исследования проводились в режимах ИЭР и ХИАД. Параметры режима ИЭР: температуры нагревательного блока и линии десольватации - 250°C; расходы распыляющего и осушающего газов – 3 л/мин и 15 л/мин соответственно; напряжение на капилляре 3,5 кВ. Параметры режима ХИАД: температура ионного источника - 350°C, температура нагревательного блока и линии десольватации - 250°C, напряжение коронного разряда – 3,5 кВ; расходы распыляющего и осушающего газов – 4 л/мин и 15 л/мин соответственно. В качестве газа в ячейке соударений tandemного масс-спектрометра использовался аргон с входным давлением 230 кПа.

2.7 Скрининг ПЦТТ в растительном сырье методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме сканирования ионов-предшественников

Использовали систему ВЭЖХ-МС/МС LCMS-8040. Разделение проводили на колонке Nucleodur C18 Isis при температуре 40°C. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. В режиме Q1-scan (сканирование на первом квадруполе) масс-спектры были записаны в диапазоне m/z 300-1200 в режимах регистрации отрицательных и положительных ионов.

Для определения относительных факторов отклика (f) готовили растворы аналитов на пяти уровнях концентрации и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП. Величины f каждого аналита рассчитывали по уравнению:

$$f = \sum \left(\frac{H_{Si} C_{xi}}{H_{xi} C_{Si}} \right) / 5 \quad (1)$$

H_s - интенсивность сигнала (площадь пика) иона эталона; H_x - интенсивность сигнала (площадь пика) иона аналита; C_s - концентрация эталона; C_x - концентрация аналита; i - уровень концентрации (1–5).

2.8 Скрининг ПЦТТ методом МАЛДИ-МС

Масс-спектры МАЛДИ записывались в режиме рефлектрона с использованием гибридного масс-спектрометра Axima Resonance (Shimadzu-Biotech, Великобритания) в диапазоне m/z : 300–500. Аккумулировались данные 200 вспышек лазера (100 профилей по 2 вспышки), собранные с разных точек мишени. Калибровка шкалы масс выполнялась с применением иодида цезия (analytical standard for high-resolution mass spectroscopy, Fluka, США) по образующимся кластерам ионов $[Cs_xI_{x-1}]^+$ и $[Cs_xI_{x+1}]^-$.

Для получения углеродных нанопокровтий (УНП) использовали технологию электротермической атомизации углерода в вакууме (при температуре $\sim 3000\text{K}$ и остаточном давлении $<10^{-4}$ Па), широко применяемую для формирования токопроводящих покрытий в электронной микроскопии. Данный подход позволяет получать мишени для масс-спектрометрии МАЛДИ, характеризующиеся высокой гидрофобностью, облегчающей качественное нанесение образцов в органических растворителях, а также минимальным количеством наносимого углерода (масса покрытия на лунке в несколько раз меньше типичных количеств графита или углеродных нанотрубок, наносимых традиционными способами). Высокая прочность углеродного слоя предотвращает диспергирование материала покрытия в ходе лазерной десорбции, радикально снижая риск контаминации масс-спектрометра. Равномерность покрытия поверхности мишени, обеспечивает получение качественных масс-спектров аналитов [118].

Растворы стандартных соединений с различной концентрацией готовили в метаноле. На подготовленную мишень наносили 0,5 мкл катионизирующего агента и сразу же 0,5 мкл аналита, смесь высушивали на воздухе.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка способа жидкостной экстракции ПЦТТ из растительного сырья

В качестве растительного материала использовали наружный слой березовой коры, заготовленной в Архангельской области в 2015 г. В качестве известных, эталонных методов экстракции ПЦТТ для сравнения получаемых результатов нами использованы экстракция по Сокслету и ультразвуковая экстракция этанолом (см. разд. 1.2.1, 1.2.2).

Анализ экстрактов на содержание ПЦТТ проводили методом жидкостной хроматографии – tandemной масс-спектрометрии в режиме МЗР, позволившем эффективно устранить любые интерференции со стороны сложной матрицы (см. разд. 3.3). Пример получаемой хроматограммы экстракта бересты представлен на рис. 3.

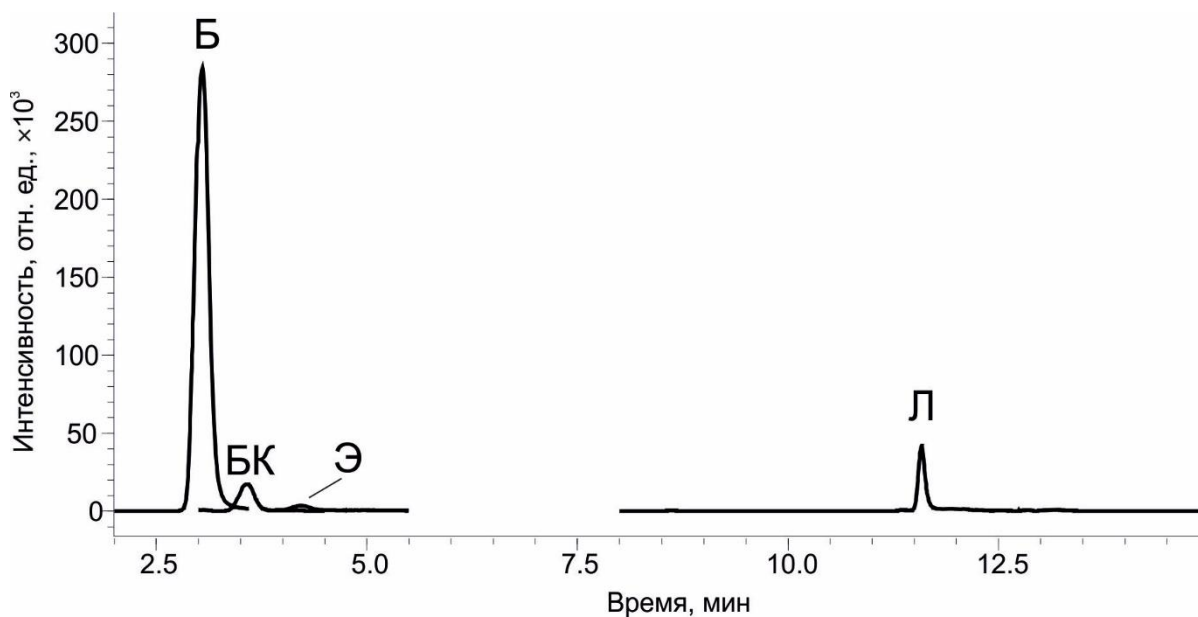


Рисунок 3. ВЭЖХ МС/МС хроматограмма субкритического экстракта березовой коры

Результаты хроматомасс-спектрометрического анализа полученных экстрактов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Извлечение тритерпеноидов (г/кг бересты) этанолом методами экстракции по Сокслету и ультразвуковой экстракции, при $P=0,95$ ($n=3$)

Метод экстракции	Бетулиновая кислота	Бетулин	Эритродиол	Лупеол
По Сокслету	15±1	200±10	2,5±0,1	6,0±0,2
Ультразвуковая	4,6±0,2	60±3	0,73±0,05	4,2±0,3

Очевидно, что воздействие ультразвука в достаточно мягких условиях (50°C) не обеспечивает значительного повышения скорости экстракции и приемлемой степени извлечения целевых компонентов. Получаемые выходы тритерпеноидов оказываются в 1,3–3 раза ниже по сравнению с экстракцией по Сокслету. Вследствие весьма низкой растворимости тритерпеноидов в этаноле, даже увеличение продолжительности УЗЭ до 12 часов не позволило нам кардинально изменить ситуацию. В связи с этим, дальнейшие исследования были сосредоточены на разработке способа жидкостной экстракции ПЦТТ под давлением, способной существенно повысить эффективность извлечения анализов из растительного материала.

Предварительные эксперименты по экстракции под давлением (100 атм.) при температурах ниже точки кипения растворителя при нормальных условиях, также продемонстрировали крайне низкую эффективность извлечения (степень извлечения бетулина при экстракции 50°C метанолом составляет 196 г/кг, что сопоставимо с результатами при экстракции по Сокслету) даже при осуществлении трех последовательных циклов обработки растворителем.

Определяющим фактором при извлечении ПЦТТ из растительных тканей является температура экстрагента, повышение которой с переходом жидкости в субкритическое состояние ведет как к росту растворимости экстрактивных веществ. Дополнительным немаловажным фактором, связанным с повышением температуры, является изменение свойств растворителя и обрабатываемого материала, способствующее лучшей пропитке его жидкостью и ускорению процессов диффузии извлекаемых компонентов в раствор. Применение температур в диапазоне от 100 до 200°C позволило резко повысить эффективность экстракции и добиться высоких выходов ПЦТТ с использованием большинства протестированных растворителей

Таблица 2. Извлечение тритерпеноидов (г/кг бересты) субкритическими органическими растворителями при различных температурах (P=100 атм, 2 цикла экстракции), при P=0,95 (n=3)

Экстрагент	Бетулиновая кислота			Бетулин			Эритродиол			Лупеол		
	100°C	150°C	200°C	100°C	150°C	200°C	100°C	150°C	200°C	100°C	150°C	200°C
Вода	-*	-	0,011±0,001			0,42±0,02	-	-	-	-	-	-
Метанол	17±1	14±1	12±1	282±13	256±14	237±9,9	5,1±0,2	3,2±0,2	2,2±0,1	8,1±0,2	7,4±0,4	6,5±0,2
Этанол	16±1	15±1	12±1	264±14	236±12	237±9,0	4,8±0,3	4,6±0,2	2,9±0,2	7,7±0,4	6,2±0,3	5,0±0,2
Изопропанол	16±1	15±1	13±1	252±15	244±14	242±13	5,1±0,2	5,0±0,3	4,5±0,2	8,3±0,3	8,1±0,4	7,4±0,3
Ацетонитрил	9,1±0,5	13±1	16±1	206±13	234±15	268±14	3,6±0,2	4,4±0,2	5,4±0,2	7,8±0,4	8,2±0,5	8,6±0,4
Хлороформ	12±1	16±1	13±1	236±13	261±6,3	245±13	4,2±0,3	4,8±0,3	4,3±0,2	7,3±0,3	7,7±0,4	7,6±0,3
Дихлорметан	9,5±0,4	14±1	11±1	190±8,9	242±7,5	226±8,7	3,4±0,2	4,8±0,2	3,4±0,1	7,6±0,4	8,3±0,3	8,1±0,2
Ацетон	17±1	17±1	16±1	268±18	269±14	265±11	3,5±0,1	4,9±0,2	3,5±0,2	7,7±0,3	7,8±0,3	7,7±0,4
Гексан	1,3±0,1	9,9±0,3	13±1	40±1,5	197±8,7	226±10	1,6±0,1	2,0±0,1	3,9±0,2	8,1±0,4	8,6±0,4	8,7±0,5

Примечание: * - менее ПО

(табл. 2). Исключением является вода, которая несмотря на существенное снижение диэлектрической проницаемости в субкритических условиях, растворяет лишь незначительные количества бетулина и бетулиновой кислоты, содержащих две гидроксильных и карбоксильную полярные группы соответственно.

Наилучшими экстрагентами в субкритических условиях являются алифатические спирты и ацетон, позволяющие извлекать пентациклические тритерпеноиды в количествах, соответствующих литературным данным [2] по их максимальному содержанию в коре и заметно превышающих значения, достигаемые при проведении экстракции по Сокслету. Несколько худшие результаты при 100°C демонстрируют ацетонитрил, хлороформ и дихлорметан, которые, однако, также позволяют достичь практически полного извлечения аналитов при повышении температуры до 200°C. Гексан, являющийся при 100°C плохим экстрагентом для всех соединений кроме неполярного лупеола, отличается исключительным ростом эффективности экстракции с увеличением температуры. Так, степень извлечения бетулина при достижении максимальной температуры возрастает более чем в 5 раз, а для бетулиновой кислоты наблюдается рост на порядок. При температуре 200°C количества тритерпеноидов, извлекаемые всеми исследованными органическими растворителями, становятся сопоставимыми. По-видимому, в жестких условиях, несмотря на различие в сольватирующей способности различных растворителей, данный параметр не является лимитирующим фактором, определяющим эффективность экстракции при использованных нами продолжительности процесса и объеме прокачиваемого экстрагента. Изучение влияния числа циклов ЖЭД на выход тритерпеноидов (рисунок 4) показало, что при оптимальных температурах для достижения максимального извлечения достаточно двух экстракционных циклов. Объем получаемого экстракта в этом случае составляет около 30 мл.

Значительный интерес вызывает аномальное поведение спиртов как экстрагентов ПЦТТ – с ростом температуры наблюдаемая степень извлечения резко снижается. Данный эффект особенно ярко выражен в случае метанола, который при 200°C извлекает в 2,3 раза меньше эритродиола, чем в более мягких условиях при 100°C.

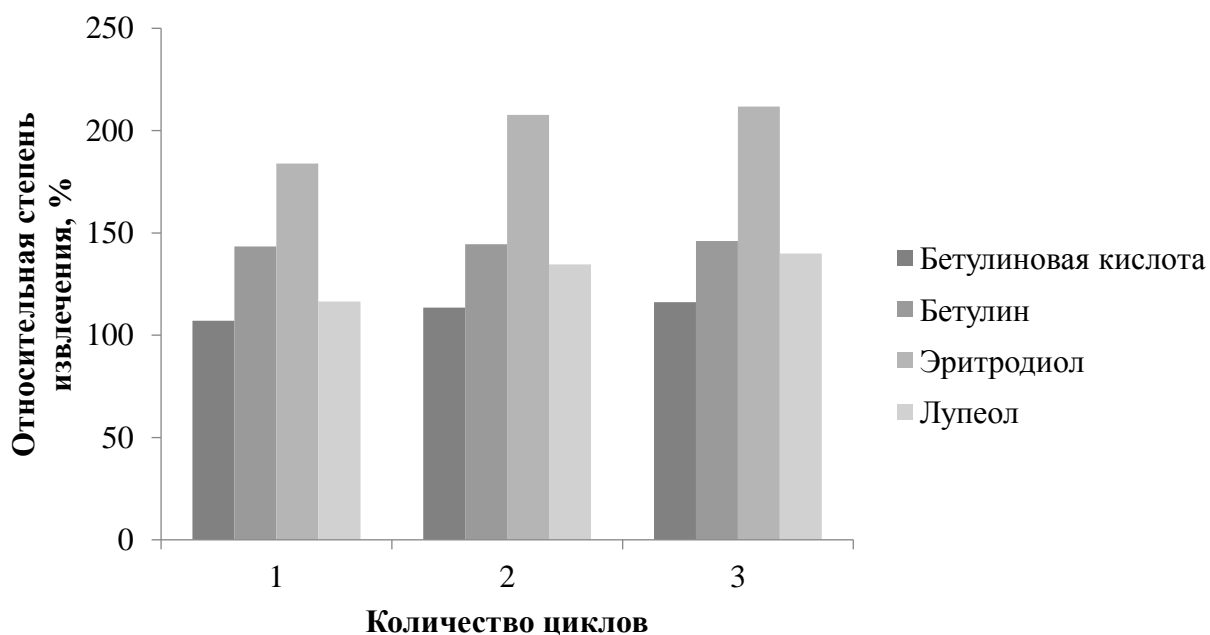


Рисунок 4. Извлечение ПЦТТ субкритическим метанолом при 100°С в зависимости от числа циклов экстракции (в процентах от результатов экстракции по Сокслету)

Учитывая, что одной из вероятных причин является химическое взаимодействие тритерпеноидов со спиртами (алкилирование) при высоких температурах, нами проведены модельные эксперименты по обработке изучаемых ПЦТТ метанолом при 200°С в установке ЖЭД по программе, идентичной использованной в ходе экстракции растительного материала. Дополнительно выполнялись эксперименты по изучению взаимодействия тритерпеноидов с метанолом в непроточных стальных автоклавах при той же температуре в течение 6 ч. Результаты, полученные методом ЯМР спектроскопии, показали полную идентичность спектров протонного магнитного резонанса для ПЦТТ до и после субкритической обработки. Подтверждением невозможности метилирования гидроксильных групп является также отсутствие сигнала с химическим сдвигом 3.48 м.д., соответствующего протонам метоксильной группы. Объяснением экстремальной степени извлечения тритерпеноидов при температуре 100°С могут служить такие факторы, как нежелательное набухание растительной ткани в спиртах при высоких температурах, приводящее к снижению проницаемости для экстрагента, а также понижение растворимости ПЦТТ с ростом температуры. Последнее предположение подтверждается результатами расчета параметров

растворимости Хансена [119], приведенными в литературе [74]. В соответствии с ними, максимальная растворимость бетулина в этаноле достигается при температуре 90°С, близкой к найденному нами оптимуму.

Таким образом, экстракция субкритическими растворителями является наиболее экспрессным и эффективным методом извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья. Наибольшей экстракционной способностью по отношению к тритерпеноидам обладают алифатические спирты, ацетонитрил, ацетон и хлороформ. Применение метанола в качестве экстрагента при температуре 100°С позволяет выделять бетулин, лупеол, эритродиол и бетулиновую кислоту из коры березы в количествах порядка 30% от массы растительного сырья, что существенно превосходит показатели экстракции по Сокслету при существенном сокращении затрат времени и растворителя.

3.2 Характеристика субкритических экстрактов коры березы

Для понимания специфики действия различных экстрагентов, возможных матричных интерференций, создания новых аналитических методик определения различных компонентов, а также разработки путей дальнейшего использования получаемых экстрактов при масштабировании процесса необходимо иметь информацию о химическом составе и свойствах экстрактивных веществ, выделенных методом ЖЭД.

В табл. 3 приведены данные об общем выходе экстрактивных веществ при извлечении различными растворителями при оптимальных температурах, а также величины их антиоксидантной активности (АА), являющейся интегральной характеристикой присутствия в экстрактах целого ряда ценных биологически активных соединений (прежде всего, фенольной природы). Общий выход экстрактивных веществ для большинства органических растворителей лежит в довольно узком диапазоне 39–45%, при этом 28–31% приходится на четыре важнейших тритерпеноида (табл. 2). Неполярный гексан демонстрирует существенно меньшую эффективность извлечения экстрактивных веществ. В особенности это относится к соединениям, не относящимся к ПЦТТ. Указанные

закономерности отражаются и в антиоксидантных свойствах экстрактов, АА которых коррелирует с содержанием нетерпеноидной фракции.

Таблица 3. Выход экстрактивных веществ и антиоксидантная активность экстрактов бересты в единицах тролокса

Экстрагент	Т, °С	Выход экстрактивных веществ, г/кг			Содержание антиоксидантов, мг/г	
		Всего	ПЦТТ	Другие	Береста	Сухой экстракт
Вода	200	97,7	0,44	97,3	58,6	600
Метанол	100	448	312	136	118	265
Этанол	100	408	292	116	115	283
Изопропанол	100	405	281	124	114	282
Ацетонитрил	200	415	298	117	160	387
Хлороформ	150	393	289	104	97,7	249
Дихлорметан	150	373	269	104	91,4	245
Ацетон	150	445	298	147	123	278
Гексан	200	309	252	57,4	30,3	98,0

Особого внимания, как селективный экстрагент ценных побочных соединений с антиоксидантными свойствами, заслуживает субкритическая вода, позволяющая выделять максимальное количество полифенольных компонентов и обеспечивать величину АА экстракта, сопоставимую с таким эталоном как тролокс. Извлечение водой около 10 % экстрактивных веществ (от массы коры) позволяет применять ее для предварительной обработки растительного сырья с последующей экстракцией тритерпеноидов органическими растворителями и выделением очищенной фракции ПЦТТ.

Предположительная идентификация индивидуальных компонентов экстрактов методом ГХ-МС (рис. 5) показала, что все органические растворители в оптимальных условиях дают близкие наборы соединений, относящихся в основном к классам углеводов (главным образом C₁₁–C₁₇), сесквитерпенов (α -бергамотен, α -сантален и др.) жирных спиртов и кислот (генэйкозанол, 1,2-дипальмитин, 1,3-дипальмитин, α -моностеарин, 2-монопальмитин и др.), а также стероидов

(ланостерин, стигмастерин, β -ситостерин) и пентациклических тритерпеноидов (табл. 4).

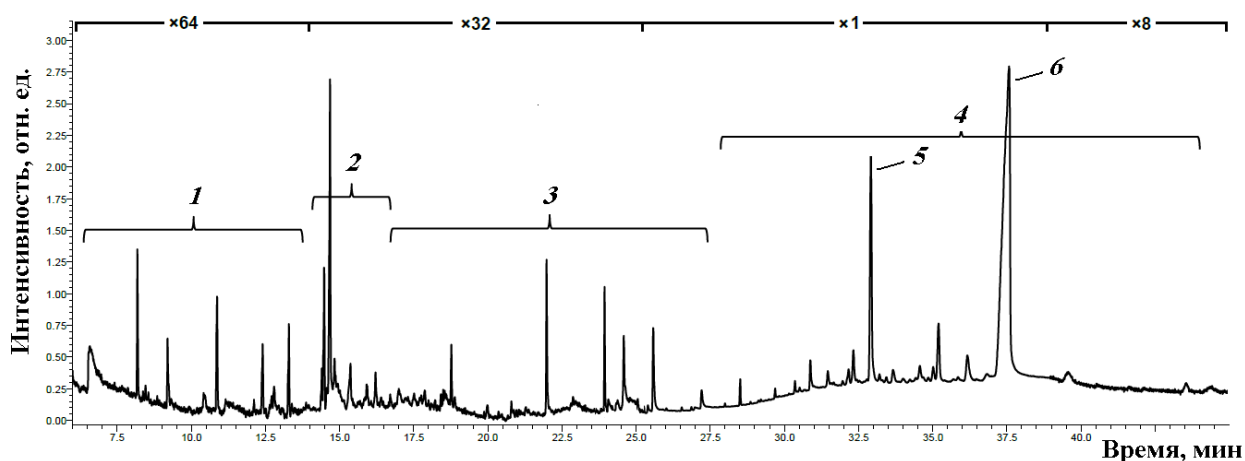


Рисунок 5. ГХ-МС хроматограмма метанольного экстракта березовой коры (1- углеводороды, 2 - сесквитерпены, 3 - жирные спирты и кислоты, 4 - стероиды и тритерпеноиды, из которых: 5 - лупеол, 6 - бетулин)

Таблица 4. Содержание основных групп веществ в экстрактах бересты (в процентах от суммы углеводов, сесквитерпенов, жирных спиртов и кислот, стероидов и тритерпеноидов по площадям хроматографических пиков)

Экстрагент	T, °C	Углеводороды, %	Сесквитерпены, %	Жирные спирты и кислоты, %	Стероиды и тритерпеноиды, %
Метанол	100	0,15	0,49	3,26	96,1
Этанол	100	0,13	0,66	2,91	96,3
Изопропанол	100	0,10	0,84	2,96	96,1
Ацетонитрил	200	0,24	0,39	2,03	97,3
Хлороформ	150	0,13	0,92	1,67	97,3
Дихлорметан	150	0,07	0,73	1,76	97,5
Ацетон	150	1,17	0,70	3,76	94,4
Гексан	200	0,05	0,36	1,93	97,7

Учитывая естественные ограничения газохроматографического анализа, связанные с невозможностью изучения термолабильных, высокомолекулярных и нелетучих соединений, для более полной характеристики экстрактов использован

метод масс-спектрометрии высокого разрешения на основе орбитальной ионной ловушки с химической ионизацией при атмосферном давлении. В получаемых масс-спектрах надежно обнаруживается порядка 900 пиков ионов протонированных молекул, соответствующих индивидуальным соединениям. При этом, как и в случае ГХ-МС анализа, компонентные составы экстрактов, полученных с применением органических растворителей, оказались весьма близкими. Визуализация элементных составов экстрактивных веществ с помощью диаграмм ван Кревелена [120] представлена на рисунке 6.

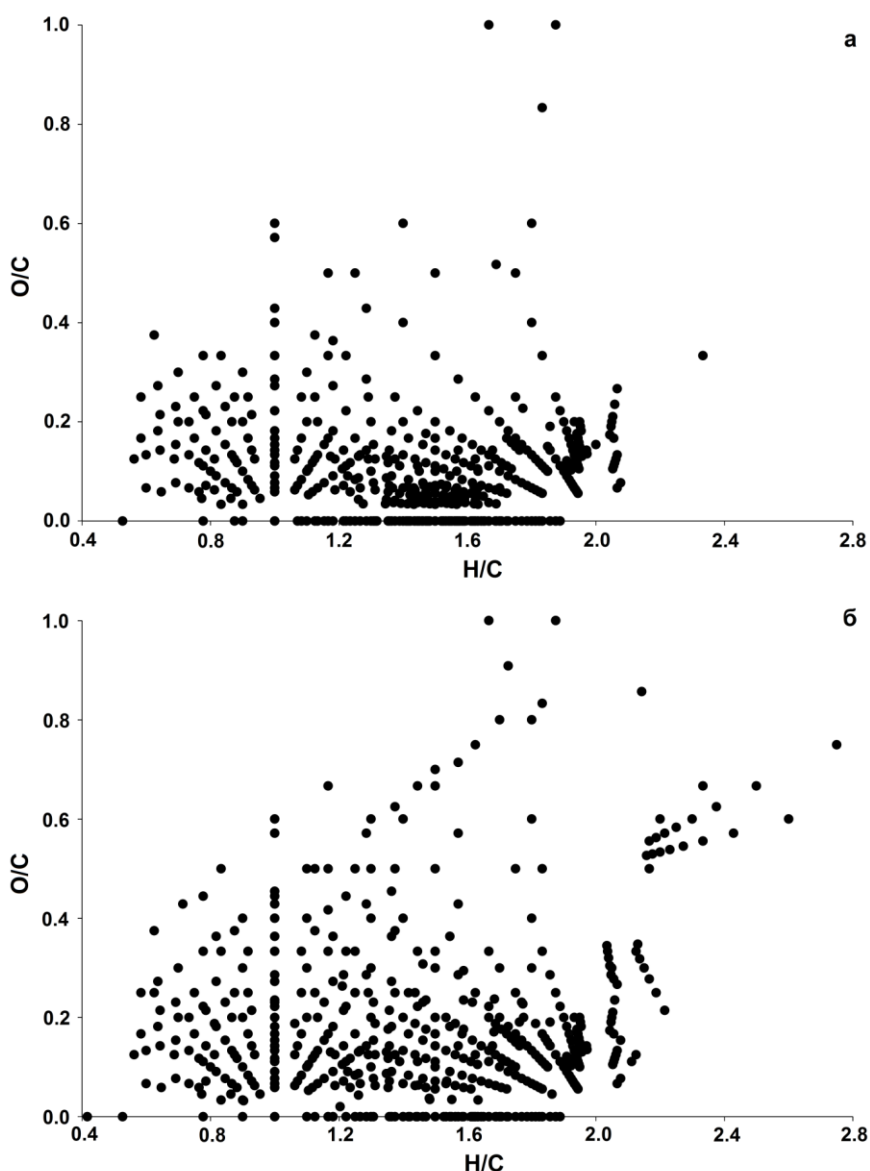


Рисунок 6. Диаграммы ван Кревелена элементных составов компонентов метанольного (а) и водного (б) экстрактов бересты по данным ХИАД-МС

Естественно, что наибольшие отличия характерны для водных экстрактов (рис. 9а), содержащих множество полярных соединений с соотношением чисел атомов кислорода и углерода в молекулах (О/С) более 0,4. К ним могут относиться как полифенольные соединения, так и их гликозилированные производные. Количество углеводов с Н/С от 1 до 2 и О/С = 0 в водных экстрактах, напротив, невелико по сравнению даже с метанольными.

Для выявления небольших различий в чрезвычайно сложных масс-спектрах органических экстрактов нами использован хемометрический метод главных компонент [121]. Диаграммы счетов и нагрузок, представленные на рисунке 6, показывают, что для адекватного анализа данных достаточно рассмотрения двух главных компонент (РС1 и РС2), охватывающих в сумме 66% всех наблюдаемых различий. При этом наблюдается закономерная группировка растворителей в зависимости от их свойств (рисунок 7а). По данным графика нагрузок (рисунок 7б) алифатические спирты наиболее сильно отличаются присутствием в масс-спектрах экстрактов ионов с m/z 177,1273, 331,2841 и 359,3152, относящимся к соединениям с брутто-формулами $C_{12}H_{16}O$, $C_{19}H_{38}O_4$ и $C_{21}H_{42}O_4$ соответственно. Первое может быть приписано множеству алкилзамещенных фенольных структур, а два других, по видимому, являются глицериновыми эфирами жирных кислот. Специфика неполярных экстрагентов (дихлорметан, гексан) наиболее сильно проявляется в извлечении наиболее липофильных тритерпеноидов (моноолов) с брутто-формулой $C_{30}H_{48}O$, дающих протонированные молекулы с m/z 425,3776. Ацетон, сильно выделяющийся среди растворителей по величине компоненты РС2, проявляет большую избирательность в извлечении ряда низкомолекулярных веществ, например C_6H_8O и $C_7H_{10}O_2$ (m/z 97,0647 и 127,0754), имеющих, вероятно, фурановую природу.

Таким образом, применение методов газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и масс-спектрометрии высокого разрешения с химической ионизацией при атмосферном давлении позволило дать характеристику компонентного состава субкритических экстрактов коры березы. Установлено, что исследованные органические растворители в оптимальных условиях извлекают сходный набор экстрактивных веществ, отличаясь при этом

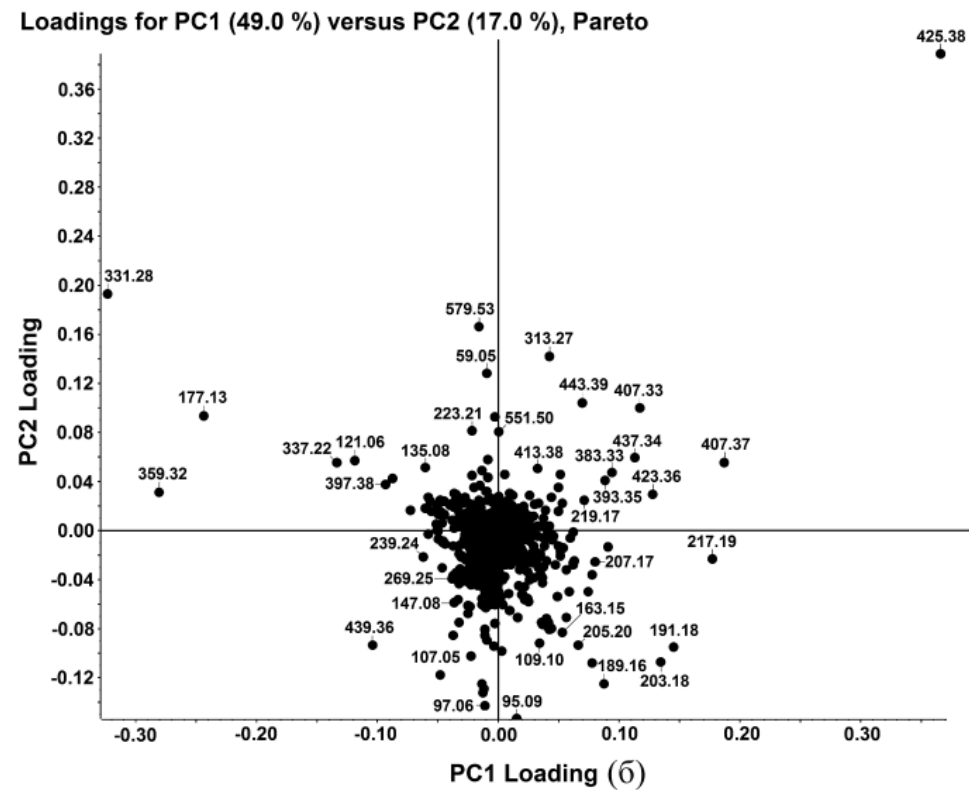
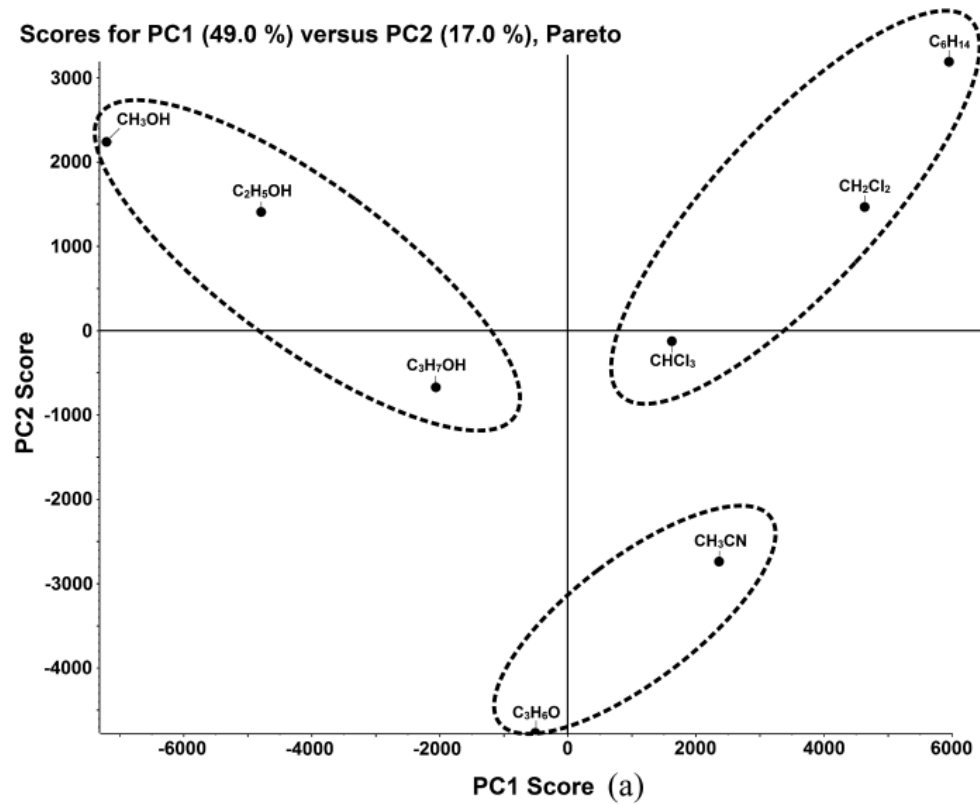


Рисунок 7. Сравнение масс-спектров ХИАД экстрактов бересты, полученных с использованием различных растворителей, методом анализа главных компонент. Диаграммы счетов (а) и нагрузок (б)

определенной избирательностью по отношению к определенным классам соединений.

Субкритическая вода является плохим растворителем пентациклических тритерпеноидов. Тем не менее, ее применение в качестве экстрагента позволяет селективно извлекать фенольные соединения с высокой антиоксидантной активностью, что имеет большое значение для разработки способов их определения в растительном сырье.

3.3 Разработка подхода к определению ПЦТТ в коре березы методом обращенно-фазовой ВЭЖХ – тандемной масс-спектрометрии

Кора березы (береста), являющаяся важнейшим промышленным источником ряда ПЦТТ, отличается сравнительно небогатым компонентным составом соединений данного класса. Среди них преобладают четыре компонента (бетулин, эритродиол, лупеол и бетулиновая кислота), относящиеся к ПЦТТ лупанового, олеананового и урсанового типов [2]. В связи с этим, хроматографическое разделение ПЦТТ в экстрактах бересты может быть реализовано в обращенно-фазовом режиме.

3.3.1 Выбор метода ионизации

Пентациклические тритерпеноиды характеризуются малой полярностью, что делает предпочтительным для их хромато-масс-спектрометрического определения метод химической ионизации при атмосферном давлении, используемый в большинстве описанных в литературе исследований (см. разд. 1.3.2). В ходе экспериментов по сравнению эффективности ионизации в режимах ИЭР и ХИАД нами также установлено, что при применении химической ионизации достигается как повышение интенсивности сигнала, так и снижение уровня шума на хроматограммах, что выражается в повышении чувствительности определения примерно на порядок. В связи с этим, во всех дальнейших исследованиях использовался метод ХИАД.

3.3.2 Оптимизация параметров ионного источника

Путем дискретного ввода растворов стандартных образцов исследуемых соединений (10 мг/л) объемом 10 мкл с потоком элюента в масс-спектрометр без использования хроматографической колонки и регистрации масс-спектров в режиме Q1 Scan (сканирование на первом квадруполе) проведена оптимизация параметров работы ионного источника. Установлено, что при повышении температуры источника выше 350°C и напряжения на игле коронного разряда выше 3,5 кВ уровень шума заметно возрастает, а интенсивность линий потенциальных ионов-предшественников в масс-спектре резко снижается вследствие их фрагментации. Отмечено, что использование метода ХИАД-МС в режиме генерации положительно заряженных ионов дает набор характеристичных ионов-предшественников с большей интенсивностью. Исключение составляет бетулиновая кислота, для которой интенсивности сигналов в положительном и отрицательном режиме ионизации сопоставимы. При использовании режима регистрации положительно заряженных ионов для всех исследуемых соединений генерируются протонированные молекулы, интенсивности линий которых для соединений лупанового ряда незначительна независимо от условий ионизации.

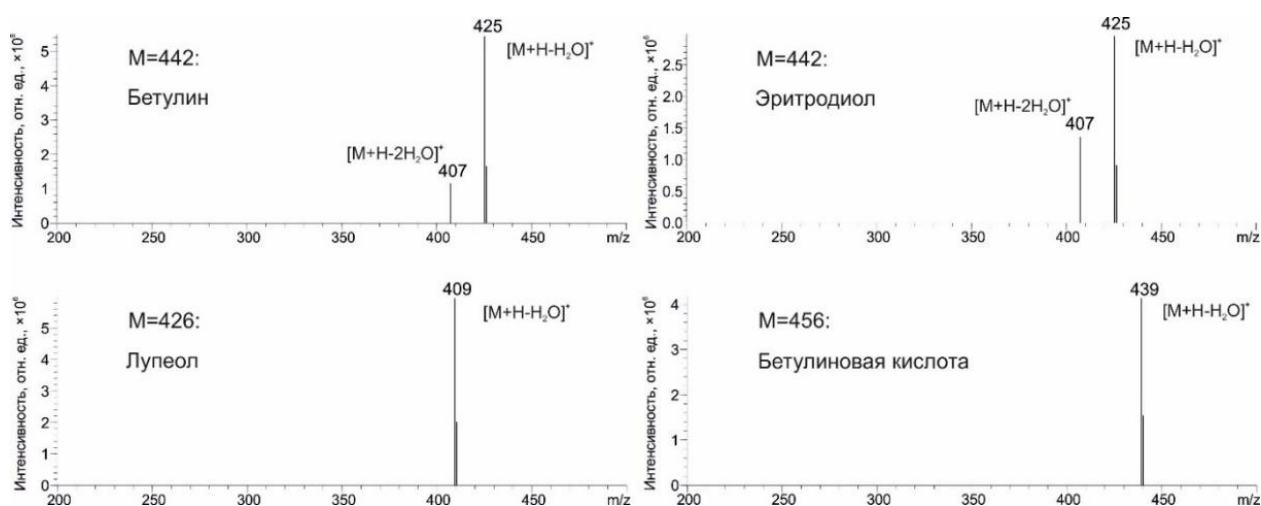


Рисунок 8. Масс-спектры ХИАД бетулина, эритродиола, лупеола и бетулиновой кислоты

Доминирующим побочным процессом в источнике ионов при ХИАД является дегидратация тритерпеноидов – ионы $[M+H-H_2O]^+$ дают наиболее интенсивные пики в спектрах МС¹ (сканирование на первом квадруполе) и могут быть успешно использованы в качестве ионов-предшественников для определения аналитов в режиме мониторинга заданных реакций (МЗР). Благодаря наличию двух гидроксильных групп, в масс-спектрах бетулина и эритродиола присутствуют пики, соответствующие отщеплению двух молекул воды от иона $[M+H]^+$ (рис. 8).

3.3.3 Диссоциация тритерпеноидов, активированная соударениями

Тандемные масс-спектры (МС/МС), полученные в ходе ДАС для соответствующих ионов-предшественников $[M+H-H_2O]^+$ (рис. 9).

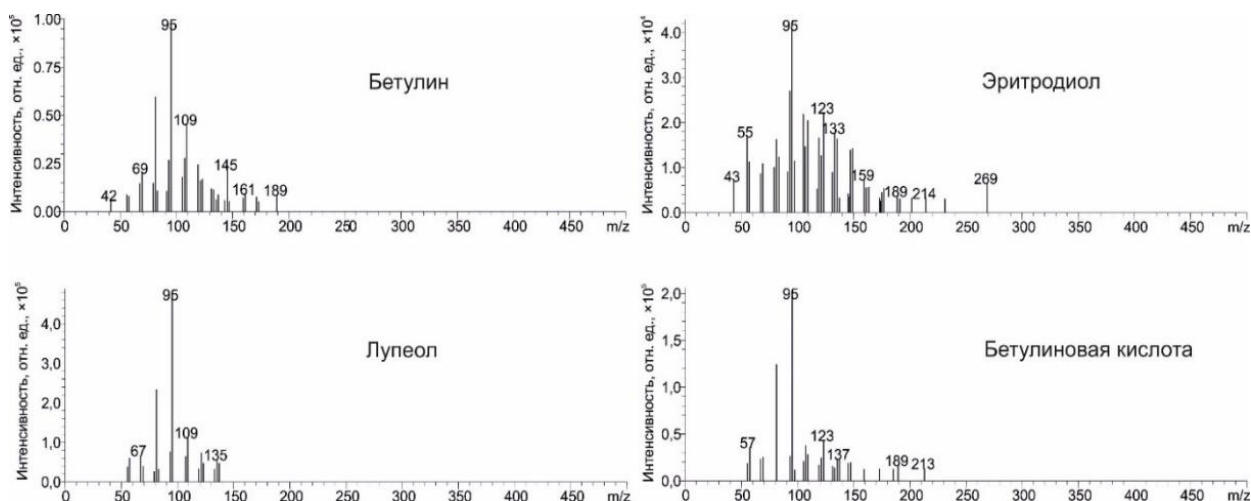


Рисунок 9. Тандемные масс-спектры бетулина, эритродиола, лупеола и бетулиновой кислоты при энергии соударения 40 эВ

Очевидно, что для всех исследованных компонентов наблюдается определенное сходство путей диссоциации в ячейке соударений. При этом для ПЦТТ характерна наибольшая интенсивность ионов с низкими значениями m/z (81, 95, 109, 123, 137). Структурные формулы предполагаемых фрагментов с одним из нескольких возможных вариантов локализации заряда, полученные с помощью программного обеспечения ACD Fragmenter (ACD/Labs, Канада), представлены на рис. 10.

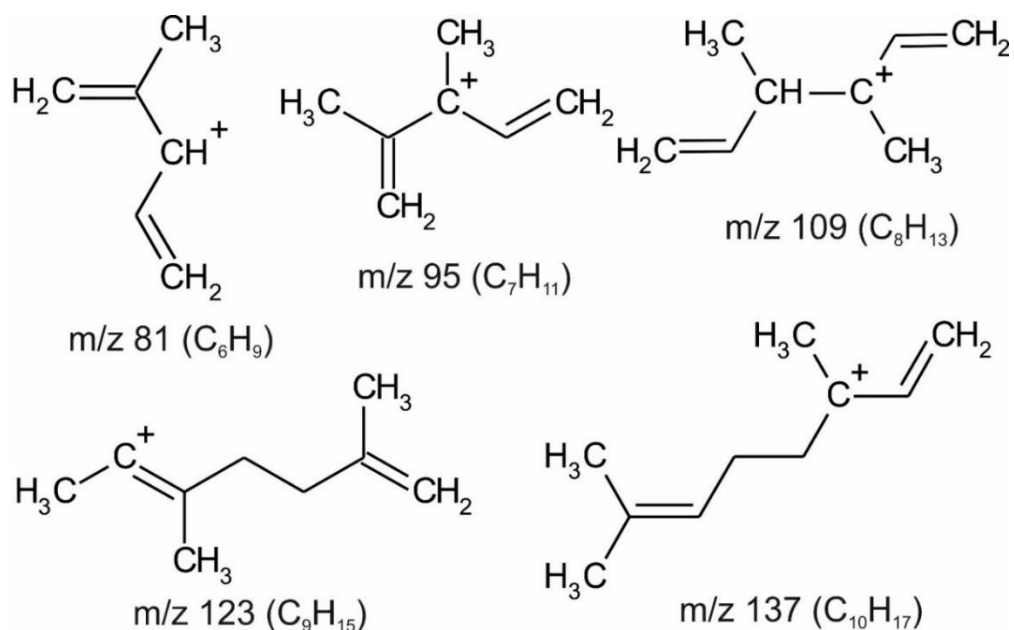


Рисунок 10. Предполагаемые фрагменты ПЦТТ, образующиеся в ячейке соударений

Для проведения количественного определения тритерпеноидов методом мониторинга множественных реакций для каждого соединения выбраны два ионных перехода с наибольшей интенсивностью сигналов, один из которых используется в качестве аналитического, а второй – подтверждающего. Проведена оптимизация параметров ионной оптики (потенциальные барьеры на предквадруполях) и энергии соударений для получения максимально интенсивных сигналов, полученные результаты приведены в таблице 5.

3.3.4 Оптимизация условий хроматографического разделения

В качестве неподвижной фазы использовали Shim-pack XR-ODS II, которая представляет собой классическую обращенную фазу (C18). Для хроматографического разделения в качестве элюента использовалась смесь 0,5% водного раствора муравьиной кислоты (раствор А) с метанолом (раствор В). Выбор метанола в качестве органического компонента подвижной фазы обусловлен применением ионизации в режиме генерирования положительных ионов, эффективность которой значительно возрастает при использовании протонодонорных растворителей.

Таблица 5. Оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования бетулина, эритродиола, лупеола и бетулиновой кислоты в режиме МЗР.

Аналит	Молекулярная масса, Да	Ион-предшественник, m/z	Ионный переход	Потенциал на предквадруполе Q1, В	Энергия соударений, эВ	Потенциал на предквадруполе Q2, В
Б	442	425	425→95	-25,8	41	-18,1
			425→137*	-25,8	22	-14,2
Э	442	425	425→191	-11,6	16	-20,6
			425→217*	-11,6	16	-25,8
БК	456	439	439→137	-40,0	26	-14,2
			439→95*	-40,0	45	-20,6
Л	426	409	409→137	-7,8	25	-18,1
			409→81*	-7,8	33	-12,9

Примечание: * - Подтверждающий ионный переход

Для сокращения продолжительности анализа использовано градиентное элюирование по следующей программе: 0 - 5 мин - 80% В, 12 мин – 100% В. Общее время анализа при этом составило 15 минут. Хроматограмма стандартной смеси тритерпеноидов приведена на рис. 11.

Для повышения соотношения сигнал/шум путем увеличения времени накопления сигнала использована временная программа регистрации ионных переходов, в соответствии с которой детектирование ионных переходов бетулина осуществлялось в диапазоне 2–4 мин, бетулиновой кислоты – 3–4,5 мин, эритродиола – 3,5–5,5 мин, лупеола – 8–15 мин.

Анализ стандартных образцов показал, что градуировочные зависимости линейны для всех исследуемых компонентов в диапазоне концентраций 0,0125–25 мг/л, при этом коэффициент корреляции (R^2) составил более 0,999. По полученным результатам рассчитаны пределы обнаружения (ПО) для изучаемых соединений на основе 3σ критерия, а также нижние пределы определяемых концентраций (НПОК) (табл. 6).

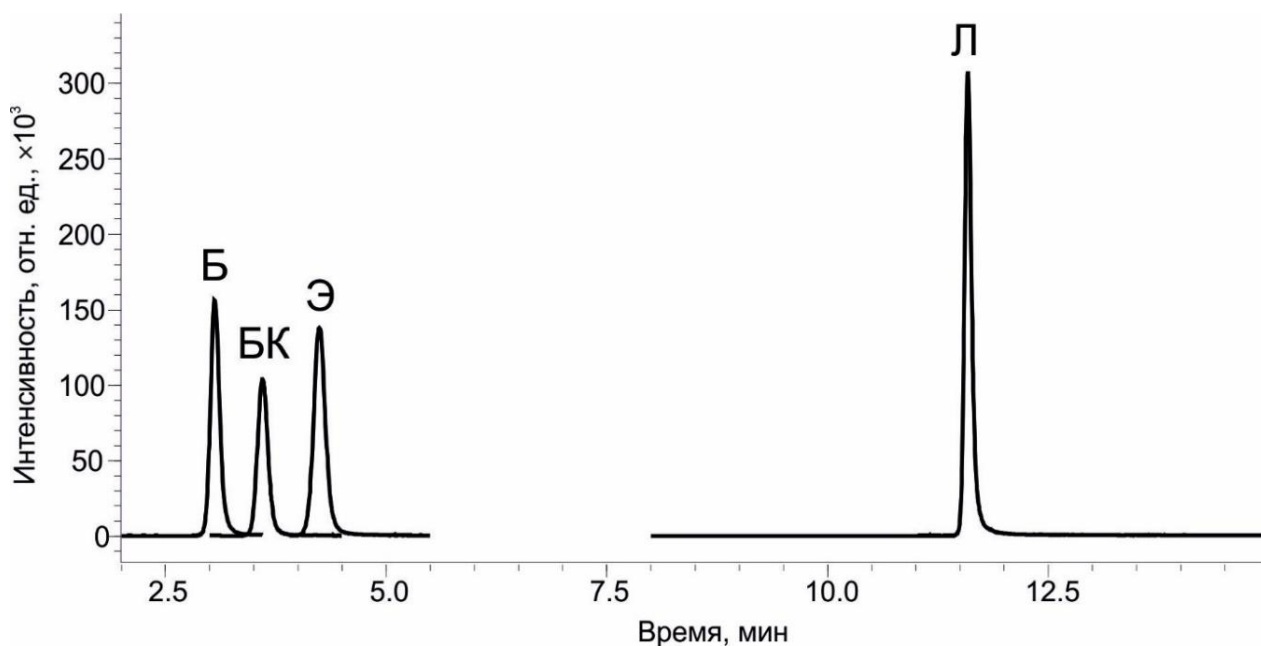


Рисунок 11. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма стандартной смеси (2,5 мг/л) четырех ПЦТТ на неподвижной фазе Shim-pack XR-ODS II

Таблица 6. Градуировочные зависимости ($y=sx+a$) для зависимости площади хроматографического пика от концентрации аналита, ПО и НПОК четырех ПЦТТ методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС на неподвижной фазе Shim-pack XR-ODS II

Соединение	Линейный диапазон концентраций, мкг/л	s	a	R ²	ПО, мкг/л	НПОК, мкг/л
Б	3,3-25000	541074	1418	0.999	1	3
БК	5,9-25000	366056	534	0.999	2	6
Э	5,6-25000	658079	1582	0.999	2	6
Л	2,4-25000	748000	655	0.999	1	2

Достигнутая чувствительность анализа оказывается существенно выше по сравнению с методиками, предложенными в литературе и основанными на применении ВЭЖХ-МС (разд. 1.3.2). Характеристики хроматографического разделения исследуемых аналитов (время удерживания t_R (мин), фактор удерживания k , количество теоретических тарелок N , коэффициент селективности α и разрешение R_s) при указанных условиях разделения представлены в табл. 7. Достигнутое полное разделение четырех ПЦТТ иллюстрируется значениями α (> 1) и R_s ($> 1,5$).

Таблица 7. Характеристики хроматографического разделения четырех ПЦТТ на неподвижной фазе Shim-pack XR-ODS II в оптимизированных условиях

Соединение	t_r	k	α	N	R_s
Б	3,05	6,62		5140	
БК	3,61	8,03	1,21	7224	3,33
Э	4,28	9,69	1,21	4502	3,14
Л	11,59	27,97	2,89	74392	34,51

3.3.5 Анализ субкритического экстракта коры березы

Для апробации разработанного подхода на реальном объекте исследовался экстракт наружного слоя березовой коры. В качестве метода пробоподготовки использовалась экстракция субкритическим метанолом при 100°C (разд. 3.1). Экстракт разбавлялся метанолом в 500 раз, фильтровался через мембранный нейлоновый фильтр и вводился в хроматографическую систему. Полученная хроматограмма представлена на рис. 12.

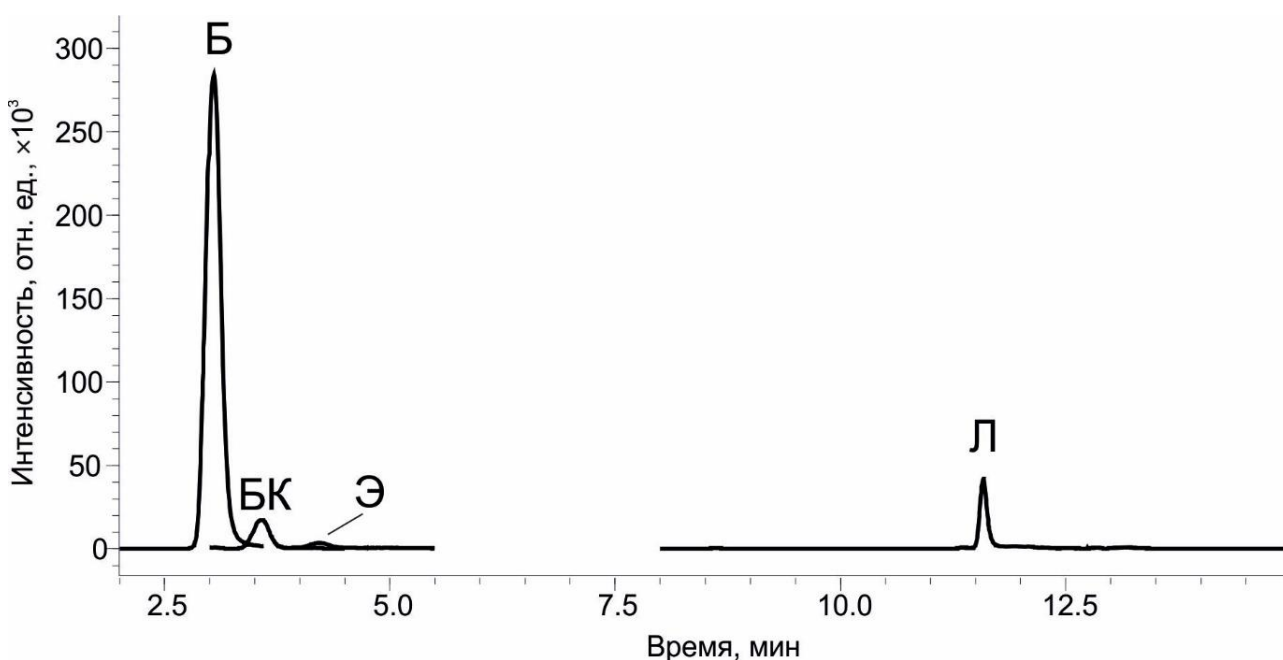


Рисунок 12. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического экстракта коры березы на неподвижной фазе Shim-pack XR-ODS II

В экстракте присутствуют все определяемые соединения, при этом их содержание в исходном сырье составляет: бетулин – 320 ± 10 мг/г, бетулиновая кислота – 32 ± 2 мг/г, эритродиол – $3,5 \pm 0,2$ мг/г, лупеола – 17 ± 1 мг/г, при $P=0,95$ ($n=3$).

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что применение жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии позволяет значительно повысить чувствительность определения пентациклических тритерпеноидов по сравнению с методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС, обеспечив высокую селективность анализа.

3.4 Определение широкого круга ПЦТТ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ – tandemной масс-спектрометрии

При одновременном определении более широкого круга аналитов, представленного выбранными нами десятью тестовыми соединениями различных классов (бетулин, эритродиол, уваол, фриделин, лупеол, β -амирин, α -амирин, бетулиновая, олеаноловая и урсоловая кислоты), принадлежащими к четырем группам ПЦТТ и включающими структурно близкие изомеры (особенно эритродиол/уваол, α/β -амирин и олеаноловая/урсоловая кислоты), задача хроматографического разделения значительно усложняется и не может быть решена с использованием «классической» обращенной неподвижной фазы. Применение октадецильных сорбентов при варьировании состава элюента и профиля градиента в широких пределах не позволило разделить две из упомянутых выше пар аналитов - эритродиол/уваол и олеаноловую/урсоловую кислоты, тогда как для слабополярных изомеров амирина, которые отличаются только положением метильной группы в кольце E, приемлемое разделение достигается в определенных условиях (рис. 13).

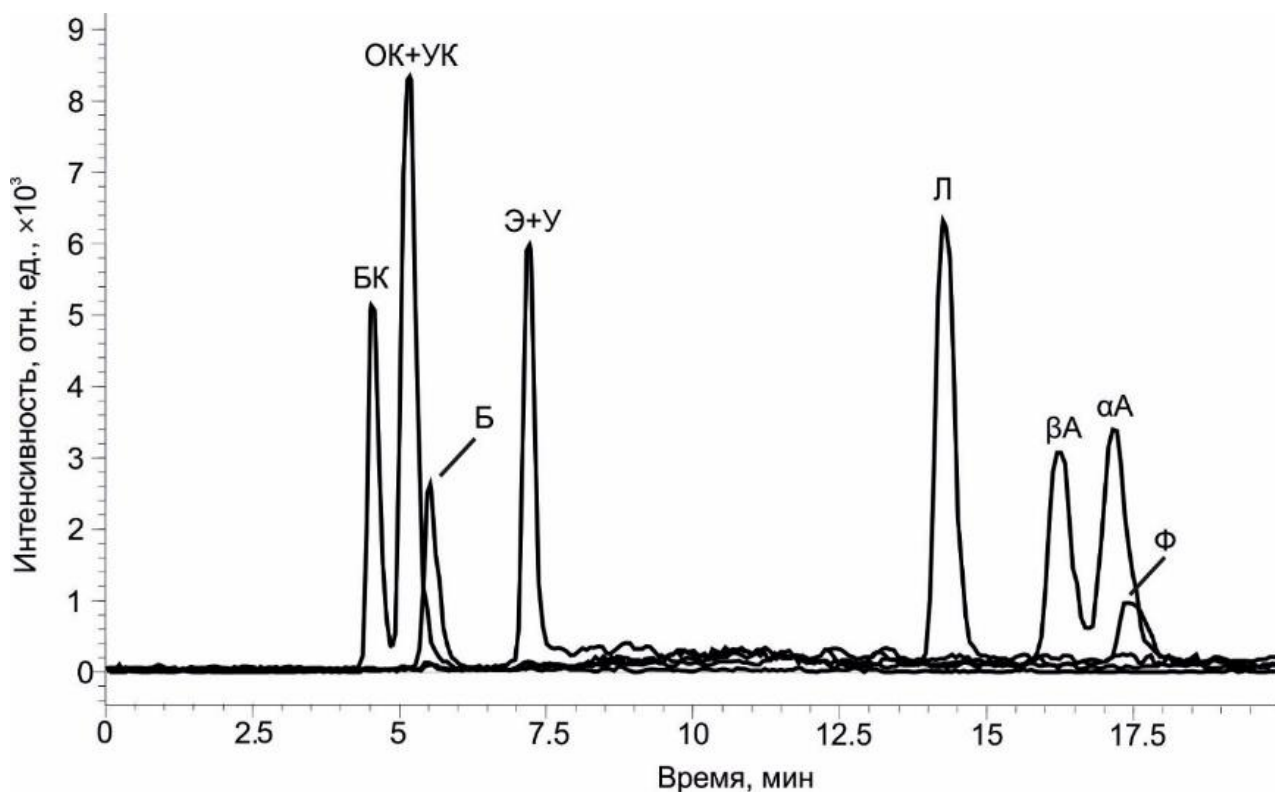


Рисунок 13. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси десяти ПЦТТ (0,5 мг/л) на неподвижной фазе Zorbax Eclipse Plus C18 (В - ACN (0,5% HCOOH), А - Вода (0,5% HCOOH). В-80%: 0-5 мин, В-100%: с 7 мин)

Разрешающая способность для критических пар более полярных аналитов оказалась настолько малой, что их компоненты невозможно разделить, уменьшая элюирующую силу при сохранении приемлемого времени выхода менее полярных ПЦТТ. Примечательно, что разделение значительно ухудшилось вместе с уменьшением удерживания аналитов при использовании обращенной неподвижной фазы Zorbax SB-Aq с несколько отличающейся селективностью для соединений с полярными группами (рис. 14).

Наилучшие результаты для моноолов и диолов были получены при использовании октадецильной фазы с внедренными полярными амидными группами Nucleodur PolarTec (рис. 15). Тем не менее, несмотря на хорошее удерживание на данной неподвижной фазе тритерпеновых кислот, селективность при их разделении была совершенно недостаточной независимо от состава подвижной фазы.

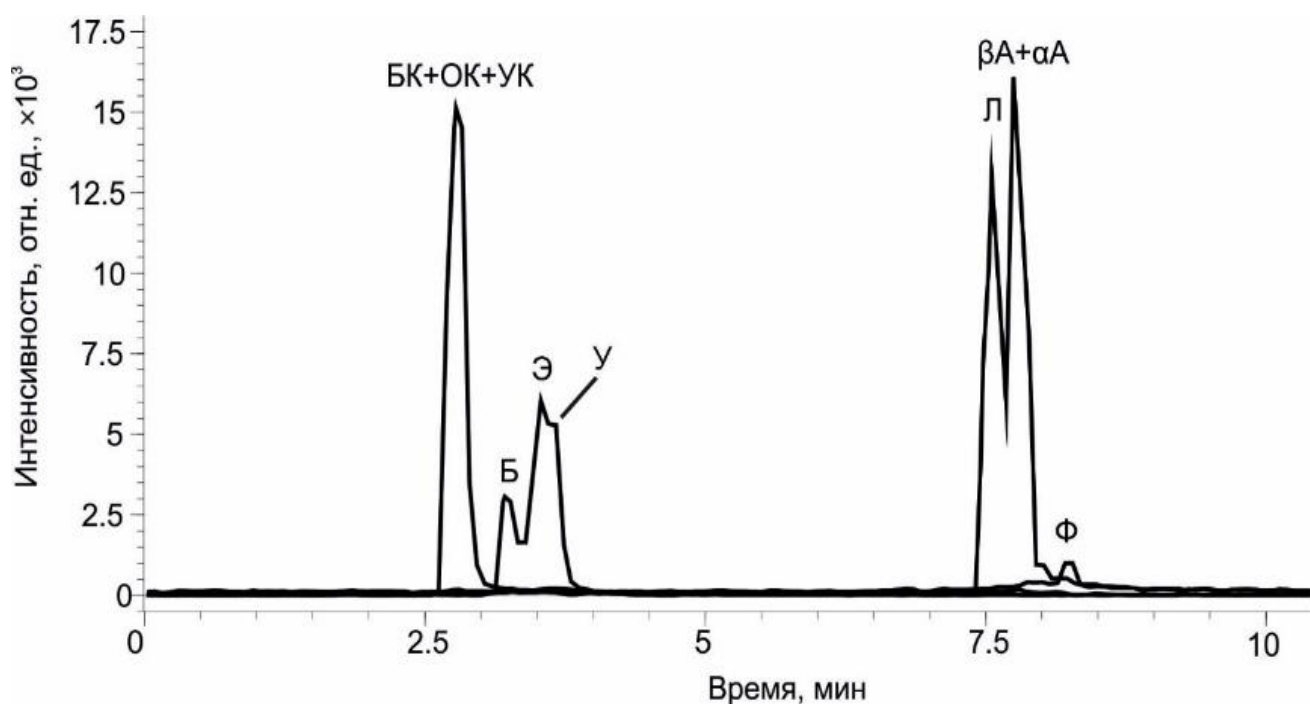


Рисунок 14. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси десяти ПЦТТ (0,5 мг/л) на неподвижной фазе Zorbax Sb – Aq (В - АСN (0,5% НСООН), А - Вода (0,5% НСООН). В-80%: 0-5 мин, В-100%: с 7 мин)

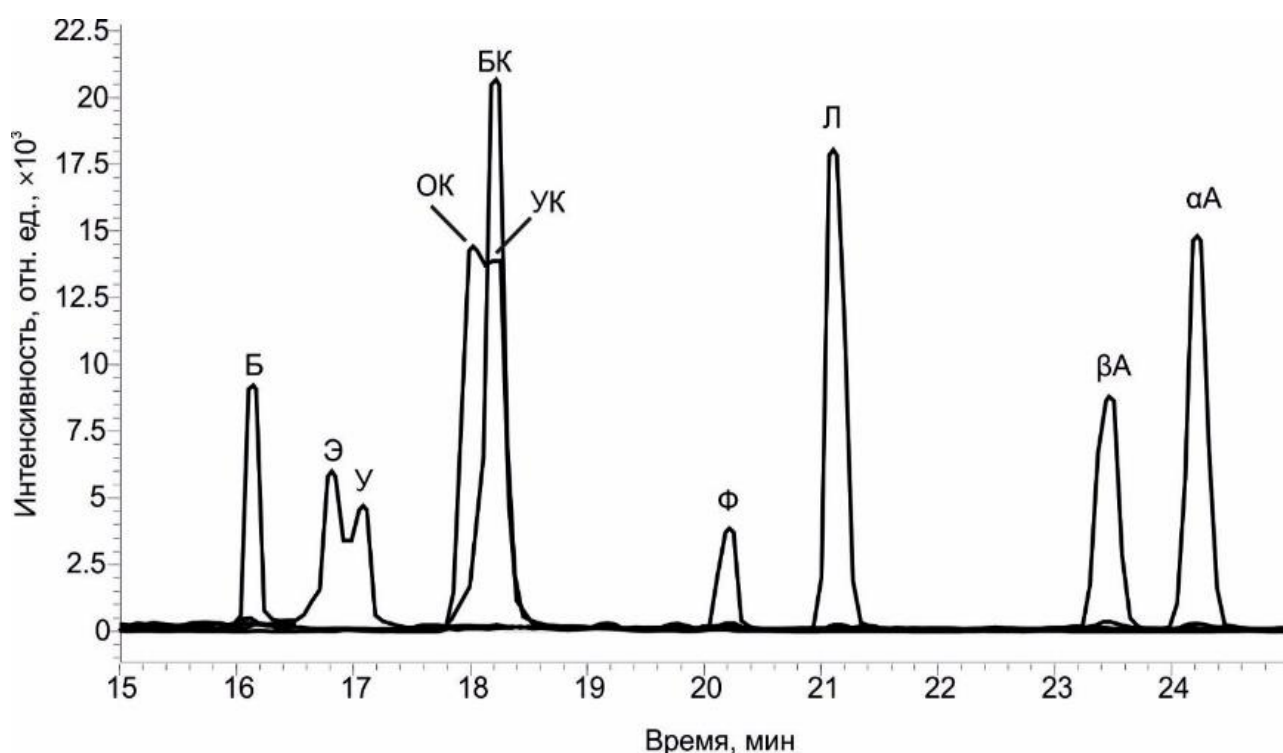


Рисунок 15. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси десяти ПЦТТ (0,5 мг/л) на неподвижной фазе NUCLEODUR PolarTec (В - АСN (0,5% НСООН), А - Вода (0,5% НСООН). В-50%: 0-10 мин, В-100% с 13 мин)

Обнадеживающие результаты при использовании обращенной неподвижной фазы были получены только для сорбента Nucleodur C18 Isis, который содержит привитую на силикагель поперечно сшитую октадецильную фазу (рис. 16), препятствующую взаимодействиям аналитов с остаточными силанольными группами на поверхности сорбента. Представленные в данном разделе исследования были направлены на разработку метода одновременного определения десяти аналитов, основанного на сочетании ВЭЖХ разделения на данной неподвижной фазе с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

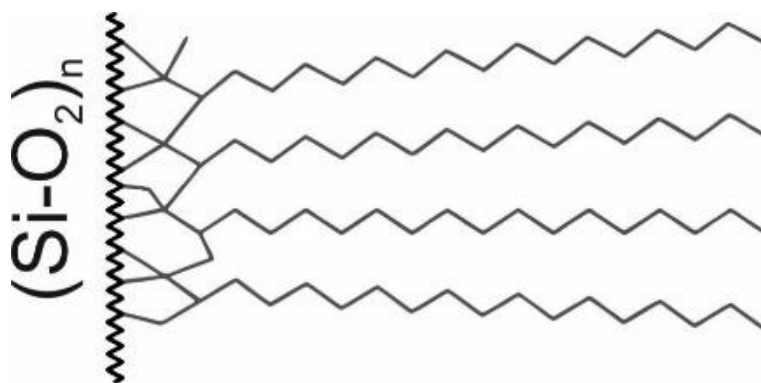


Рисунок 16. Неподвижная фаза Nucleodur C18 Isis

3.4.1 Масс-спектры ПЦТТ

Как и в случае четырех представителей ПЦТТ, исследованных в разд. 3.3, в ходе ХИАД в источнике ионов протекает дегидратация тритерпеноидов – ионы $[M+H-H_2O]^+$ дают наиболее интенсивные сигналы в получаемых масс-спектрах и могут быть успешно использованы в качестве ионов-предшественников для определения аналитов в режиме МЗР (рис. 17). Исключением является кетон фриделин, не содержащий гидроксильных групп и дающий при ионизации исключительно протонированную молекулу $[M+H]^+$.

Тандемные масс-спектры (рис. 18) уваола, фриделина, α - и β -амиринов, олеаноловой и урсоловой кислот, полученные для иона-предшественника $[M+H-H_2O]^+$ (в случае фриделина – $[M+H]^+$) показывают сходство со спектрами рассмотренных ранее четырех аналитов (разд. 3.3). Для всех соединений характерны ионы-продукты со значениями m/z 81, 95, 109, 123, 137 (рис. 10).

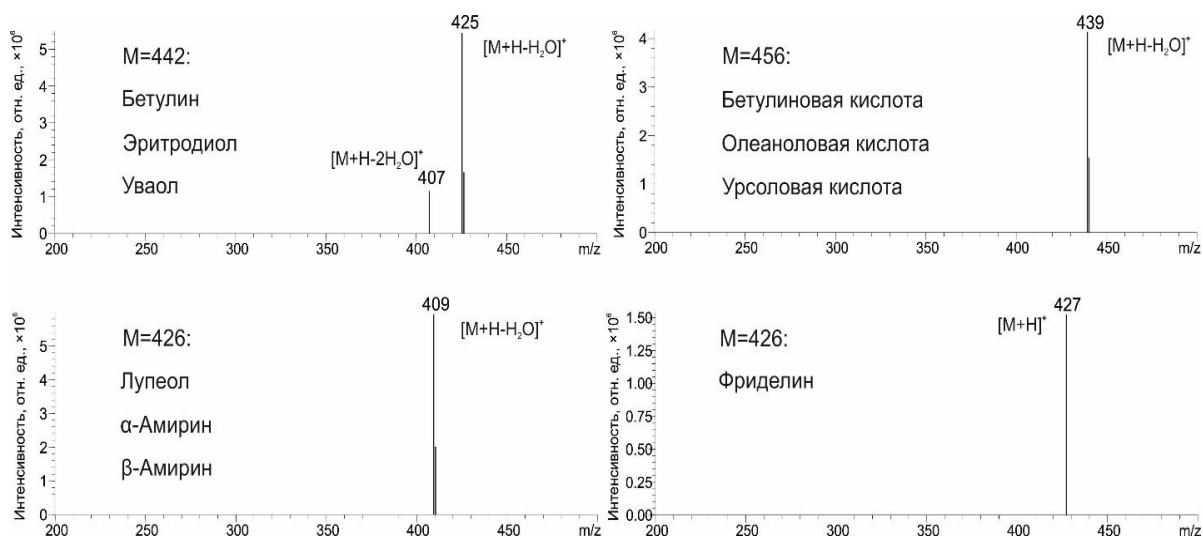


Рисунок 17. Масс-спектры десяти ПЦТТ, полученные с использованием ХИАД

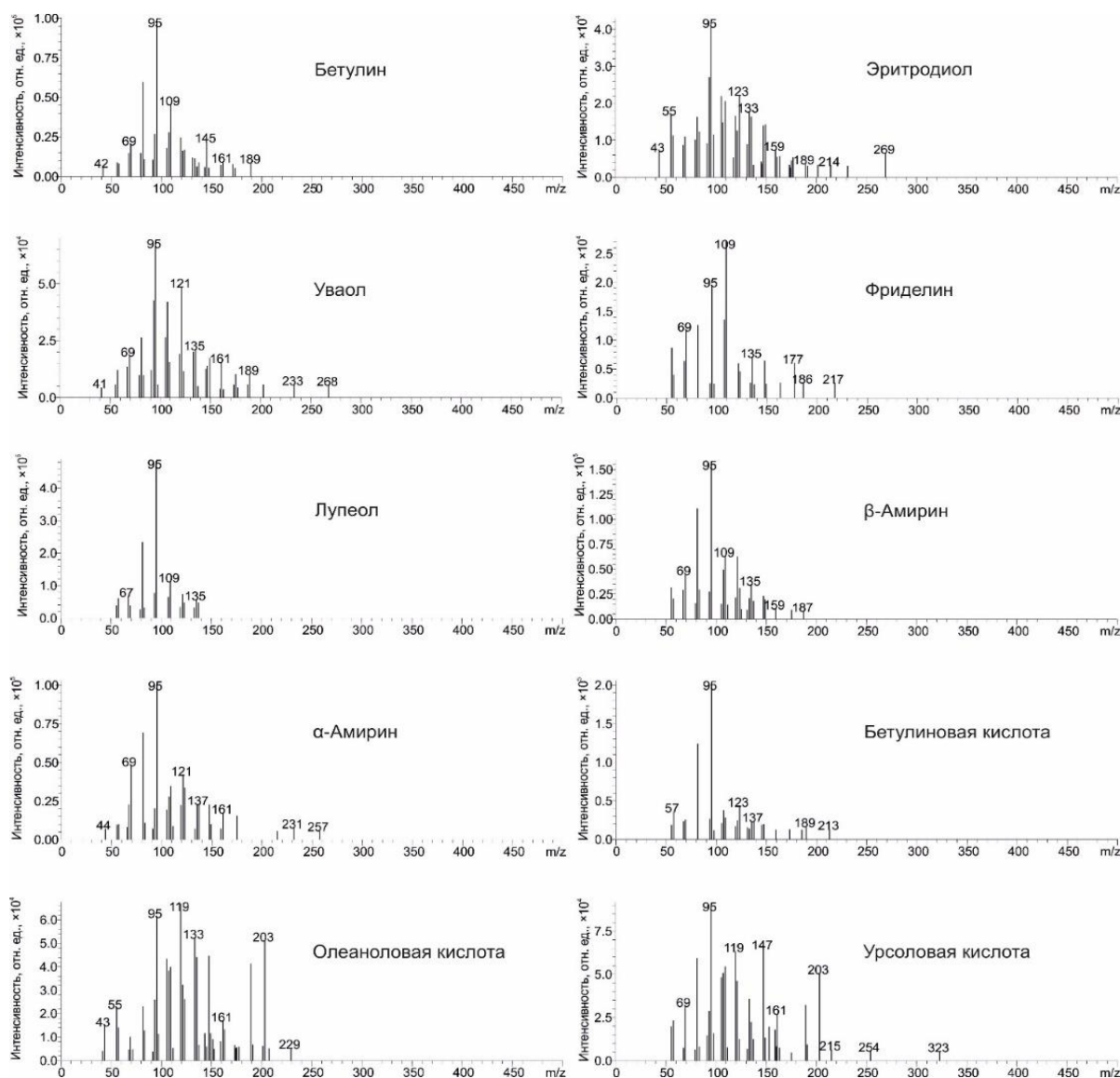


Рисунок 18. Тандемные масс-спектры десяти ПЦТТ при энергии соударения 40 эВ

Для проведения количественного определения тритерпеноидов методом мониторинга заданных реакций для каждого соединения выбраны два ионных перехода, один из которых используется в качестве аналитического, а второй – подтверждающего. Проведена оптимизация параметров ионной оптики и энергии соударений для получения максимально интенсивных сигналов выбранных ионных переходов, полученные результаты для шести аналитов приведены в табл. 8 (для бетулина, эритродиола, лупеола и бетулиновой кислоты см. табл. 5).

Таблица 8. Оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования шести ПЦТТ в режиме МЗР

Аналит	Молекулярная масса, Да	Ионный переход, m/z	Потенциал на предквадруполе Q1, В	Энергия соударения, эВ	Потенциал на предквадруполе Q2, В
У	442	425→191	-46,8	17	-37,1
		425→217*	-43,5	16	-21,0
Ф	426	427→109	-46,8	27	-46,8
		427→95*	-40,3	34	-40,3
βА	426	409→95	-43,5	36	-43,5
		409→231*	-43,5	16	-14,5
αА	426	409→95	-40,3	40	-37,1
		409→231*	-43,5	20	-14,5
ОК	456	439→191	-21,0	15	-17,8
		439→203*	-50,0	27	-43,5
УК	456	439→191	-43,5	15	-17,8
		439→203*	-46,8	26	-40,3

3.4.2 Хроматографическое разделение ПЦТТ на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

Для хроматографического разделения на колонке Nucleodur C18 Isis в качестве элюента использовалась смесь 0,5% водного раствора муравьиной кислоты (раствор А) с ацетонитрилом с 0,5% муравьиной кислоты (раствор В), поскольку подкисление необходимо для достижения приемлемого удерживания

тритерпеновых кислот и предотвращения искажения формы их хроматографических пиков. Принимая во внимание значительное различие исследуемых соединений по полярности и, как следствие, по времени удерживания, для сокращения продолжительности анализа использовано градиентное элюирование. Эксперименты по варьированию профиля градиента в широких пределах позволили определить оптимальную временную программу изменения состава элюента, позволяющую, с одной стороны, достичь максимально возможного удерживания и селективности для полярных соединений (диолы и кислоты) и приемлемого времени выхода слабополярных моноолов и фриделина при достижении полного разделения данных аналитов: 0-5 мин 80% В, 15 мин: 100% В. Общее время анализа при этом составило 20 мин. (рис. 19).

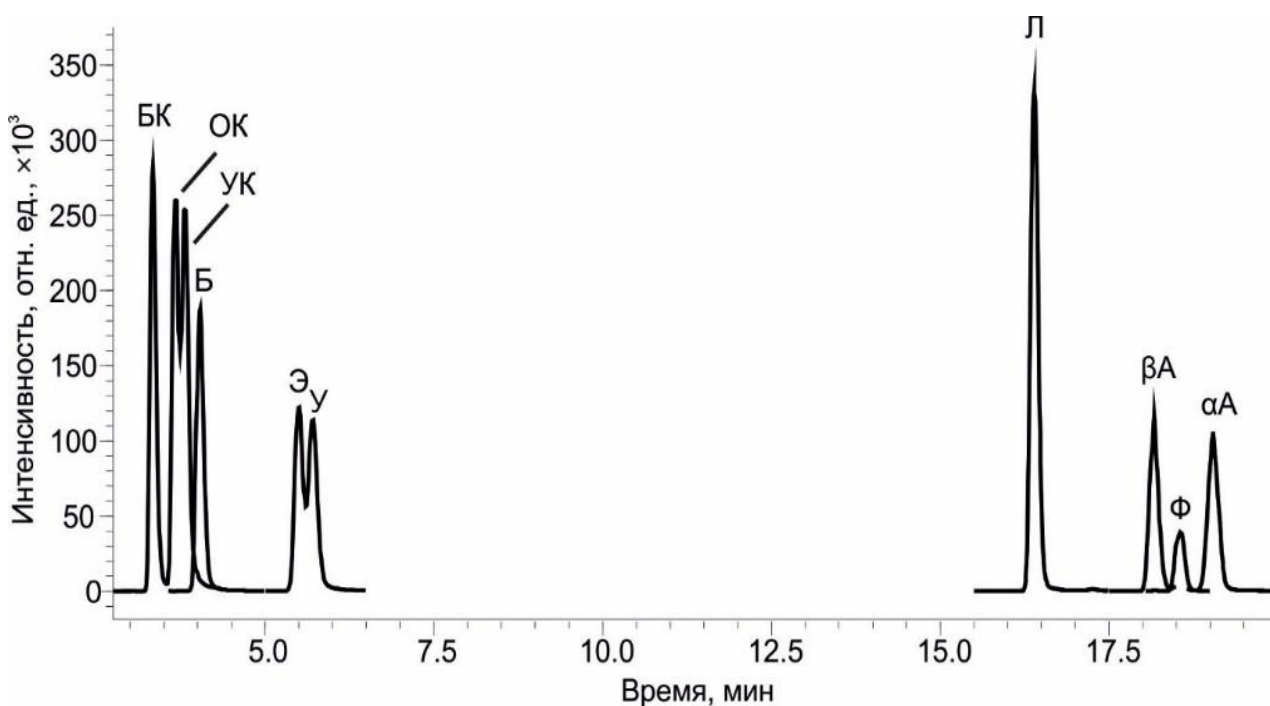


Рисунок 19. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма стандартной смеси ПЦТТ (12,5 мг/л) на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

Характеристики хроматографического разделения исследуемых аналитов (время удерживания t_R (мин), коэффициент удерживания k , количество теоретических тарелок N , коэффициент селективности α и разрешение R_s) при указанных условиях разделения представлены в табл. 9. Полного разделения не удалось достичь для критических пар наиболее полярных аналитов –

олеаноловой/урсоловой кислот ($R_s=0,8$) и эритродиола/уваола ($R_s=0,7$). Несмотря на это, полученные значения R_s для данных пар позволяют проводить раздельное определение их компонентов.

Таблица 9. Характеристики хроматографического разделения десяти ПЦТТ на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis в градиентном режиме элюирования

Соединение	t_R	k	α	N	R_s
БК	3,22	3,30	–	8044	–
ОК	3,55	3,73	1,13	6754	2,03
УК	3,68	3,91	1,05	7294	0,81
Б	3,88	4,17	1,07	5178	1,01
Э	5,29	6,05	1,45	5414	5,62
У	5,50	6,33	1,05	5846	0,72
Л	16,25	20,66	3,26	141822	47
β А	18,03	23,04	1,12	69671	8,02
Ф	18,43	23,57	1,02	65685	1,42
α А	18,91	24,22	1,03	62776	1,66

3.4.3 Метрологическая характеристика и валидация методики определения ПЦТТ в растительном сырье методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС

Анализ стандартных образцов показал, что градуировочные зависимости линейны для всех исследуемых компонентов в диапазоне концентраций 0,0125-25 мг/л, при этом коэффициент корреляции составил более 0,99. По полученным результатам рассчитаны пределы обнаружения для изучаемых соединений на основе 3σ критерия (таблица 10).

Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости (повторяемости и промежуточной прецизионности) методики, полученные при многократном анализе модельного раствора смеси аналитов в течение 8 часов и двух суток соответственно (табл. 11) на уровне концентраций, близком к НПОК, показали, что стандартное отклонение (СО) в обоих случаях не превышало 13,7 %, а правильность лежала в пределах 90–116 %.

Таблица 10. Градуировочные зависимости ($y=sx+a$) для площади хроматографического пика в зависимости от концентрации аналита, ПО и НПОК десяти ПЦТТ методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

Соединение	Линейный диапазон концентраций, мкг/л	s	a	R ²	ПО, мкг/л	НПОК, мкг/л
БК	17-25000	100976	298	0,998	5	17
ОК	19-25000	112719	422	0,998	6	19
УК	19-25000	132839	406	0,999	6	19
Б	22-25000	86140	100	0,999	7	22
Э	20-25000	78265	249	0,998	6	20
У	17-25000	87011	262	0,999	5	17
Л	11-25000	258342	666	0,999	3	11
βА	17-25000	111493	357	0,999	5	17
Ф	44-25000	24631	205	0,999	13	44
αА	19-25000	116176	156	0,999	6	19

Таблица 11. Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости и правильности определения ПЦТТ методом ОФ-ВЭЖХ-МС/МС (анализ модельного раствора смеси ПЦТТ с концентрациями компонентов 50 мкг/л)

Аналит	Повторяемость (8 ч, n=7)			Промежуточная прецизионность (48 ч, n = 14)		
	Концентрация, мкг/л	Правильность, %	СО*, %	Концентрация, мкг/л	Правильность, %	СО*, %
БК	46±6	91	10,0	48±4	97	6,1
ОК	50±6	99	9,3	46±5	91	8,0
УК	50±4	99	6,3	53±9	107	13,7
Б	48±8	97	14,1	43±5	86	9,5
Э	49±8	98	12,7	53±7	106	10,9
У	55±5	110	7,2	55±4	109	5,7
Л	51±5	102	7,8	54±9	107	13,4
βА	48±6	96	10,2	55±8	109	11,6
Ф	45±5	90	9,2	51±9	102	13,6
αА	54±4	108	6,0	58±5	116	6,2

*- стандартное отклонение

Более адекватная оценка правильности методики с учетом возможных матричных эффектов была получена с помощью метода «введено-найдено» с использованием субкритического экстракта клюквы в качестве реальной матрицы. Поскольку такой экстракт уже содержал значительные концентрации некоторых анализируемых веществ, нижний предел доступного диапазона концентраций для них был относительно высоким. Полученные результаты для трех уровней концентраций (табл. 12) подтверждают отсутствие заметных интерференций со стороны матрицы для всех обнаруживаемых соединений - значения степени извлечения добавки (правильности) находились в диапазоне 96–104%. Эффективное устранение эффектов матрицы достигается благодаря хорошему хроматографическому разделению аналитов от компонентов матрицы, использованию ХИАД, а также значительному разбавлению экстракта.

Таблица 12. Оценка правильности определения ПЦТТ в субкритическом метанольном экстракте кожуры клюквы методом введено-найдено

Соединение	Исходная концентрация, мкг/л	Добавка, мкг/л	Найдено, мкг/л	Правильность (%)
1	2	3	4	5
БК	3±0,2	12500	12000±1000	99±6
	3±0,2	5000	5200±300	103±6
	3±0,2	500	520±30	103±3
ОК	5700±300	12500	18000±1000	101±4
	5700±300	5000	11000±1000	99±6
УК	16000±1000	12500	28000±2000	99±3
	16000±1000	5000	21000±1000	100±6
Б	7±0,4	12500	13000±1000	102±2
	7±0,4	5000	4900±300	98±5
	7±0,4	500	520±30	103±10
Э	27±2	12500	13000±1000	100±4
	27±2	5000	5000±300	99±9
	27±2	500	500±30	94±11

Продолжение таблицы 12.

1	2	3	4	5
У	85±5	12500	13000±1000	101±5
	85±5	5000	5000±300	97±6
	85±5	500	580±30	98±2
Л	6±0,4	12500	12000±1000	99±1
	6±0,4	5000	5000±300	100±7
	6±0,4	500	500±30	99±7
βА	81±7	12500	13000±1000	100±3
	81±7	5000	5000±500	101±8
	81±7	500	590±50	101±12
Ф	-	12500	13000±1000	101±2
	-	5000	5000±300	99±2
	-	500	510±30	102±8
αА	90±9	12500	13000±1000	98±3
	90±9	5000	5000±500	97±5
	90±9	500	570±60	96±5

3.4.4 Анализ биомассы растений

Кора березы, кожура яблок (зеленого и красного), кожура клюквы, кожура брусники и корня солодки выбраны в качестве реальных объектов для апробации разработанной методики. Они характеризуются сложным химическим составом и рассматриваются в качестве важного пищевого источника биологически активных ПЦТТ. В качестве метода пробоподготовки использовалась экстракция субкритическим метанолом при 100°C, обеспечивающая количественную и быструю экстракцию аналитов из растительных тканей (глава 3.1.1). Полученные хроматограммы представлены на рисунках 20–25. В экстракте присутствуют все определяемые соединения, при этом в бересте преобладает бетулин, в кожурах яблок и ягод преобладают олеаноловая и урсоловая кислоты (табл. 13).

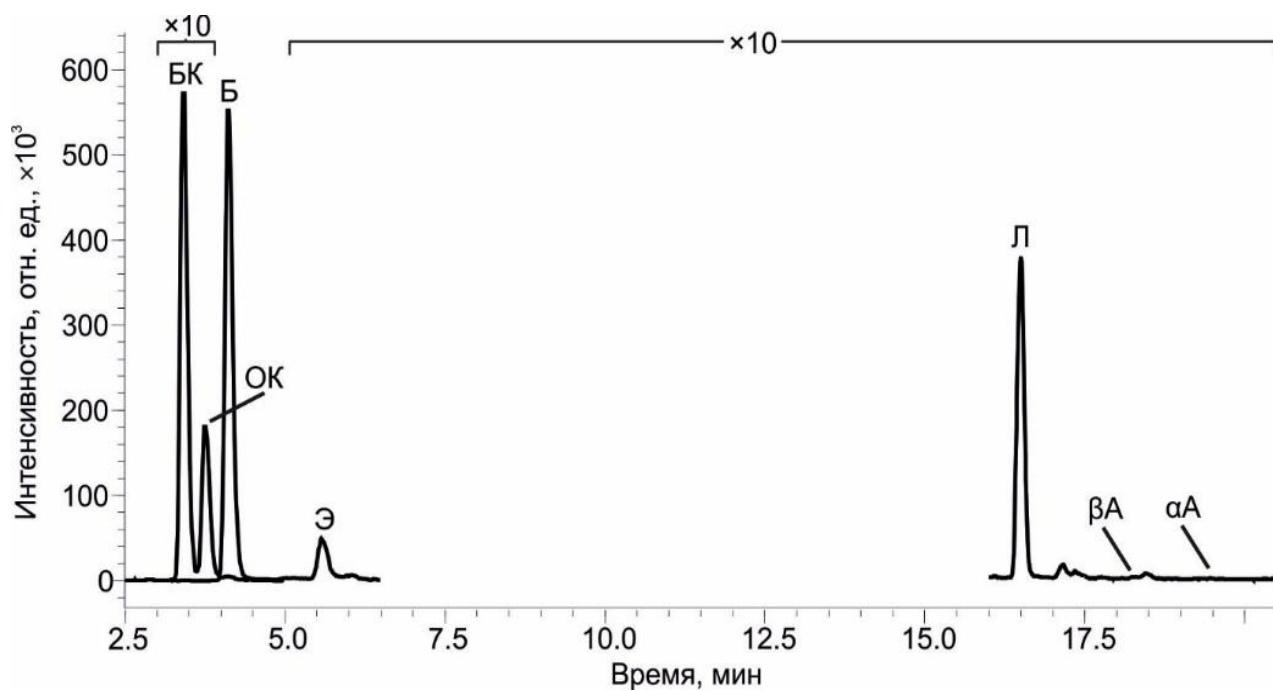


Рисунок 20. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта коры березы на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

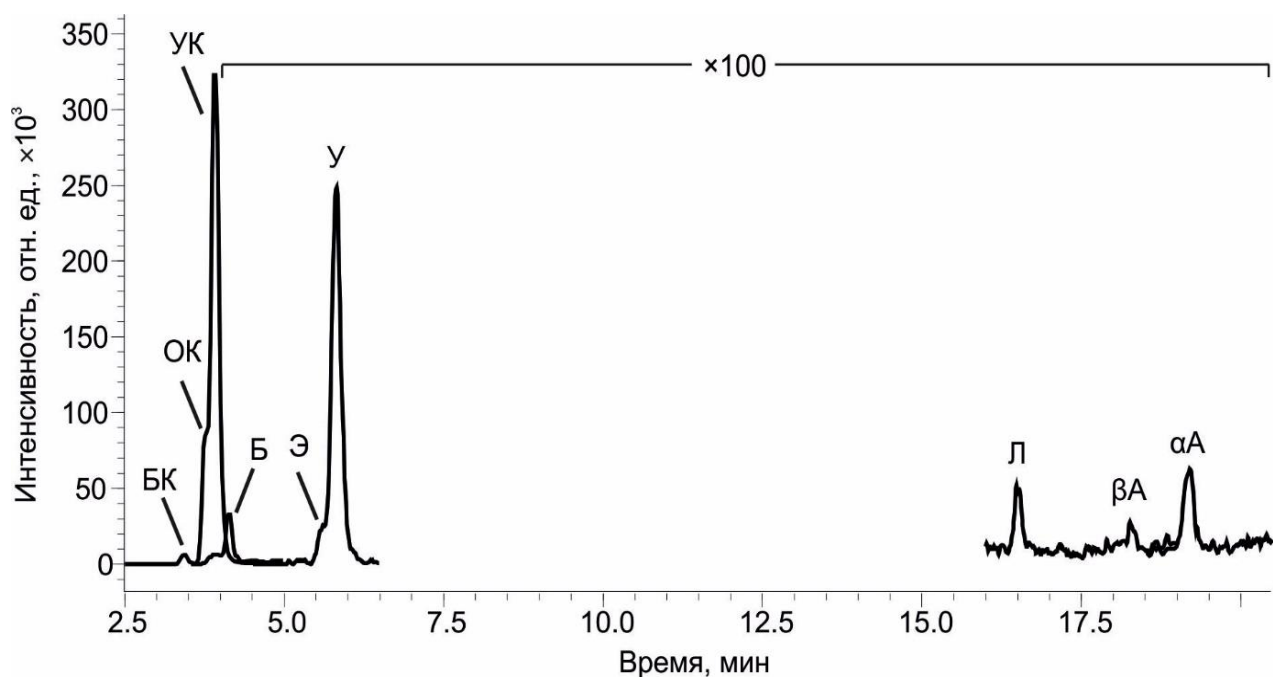


Рисунок 21. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры яблока «Golden Delicious» на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

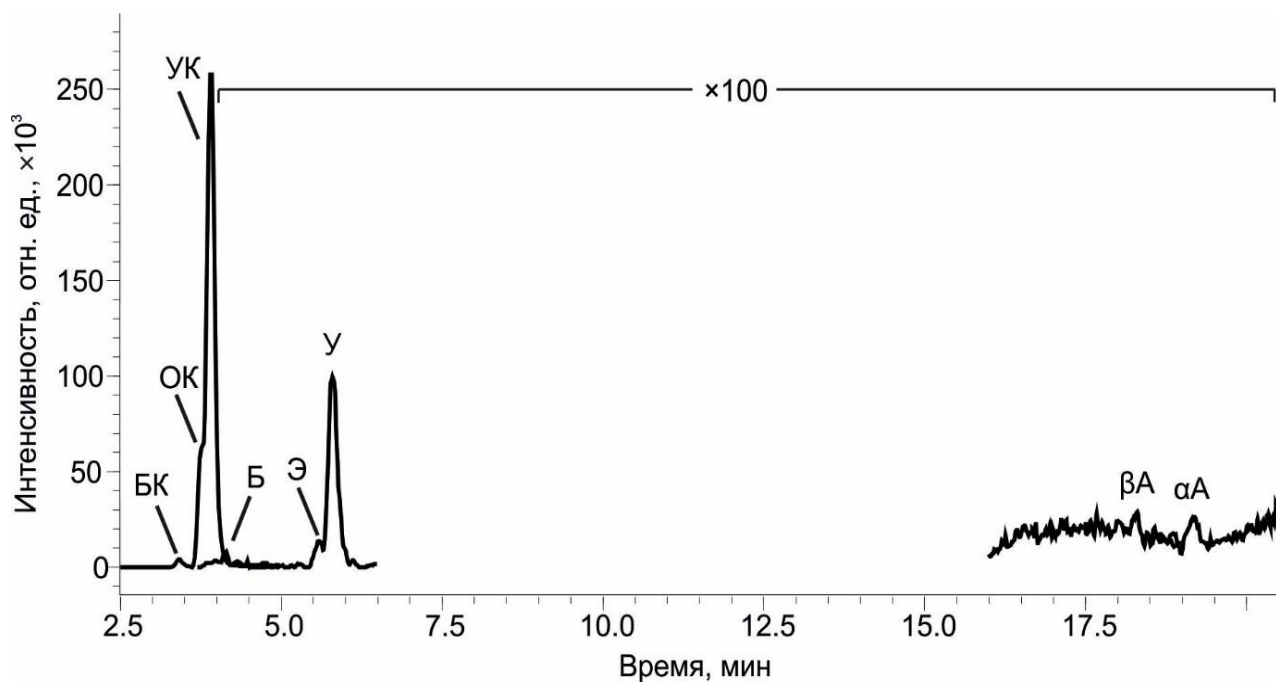


Рисунок 22. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры яблока «Red Delicious» на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

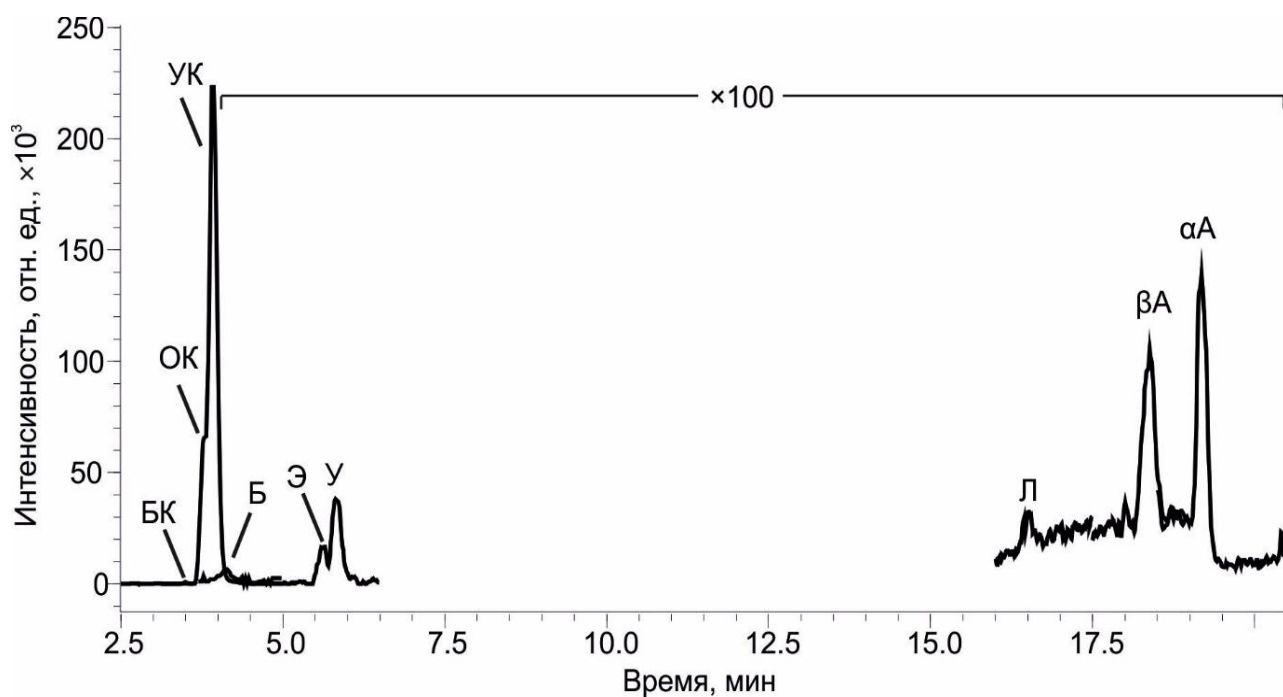


Рисунок 23. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры клюквы на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

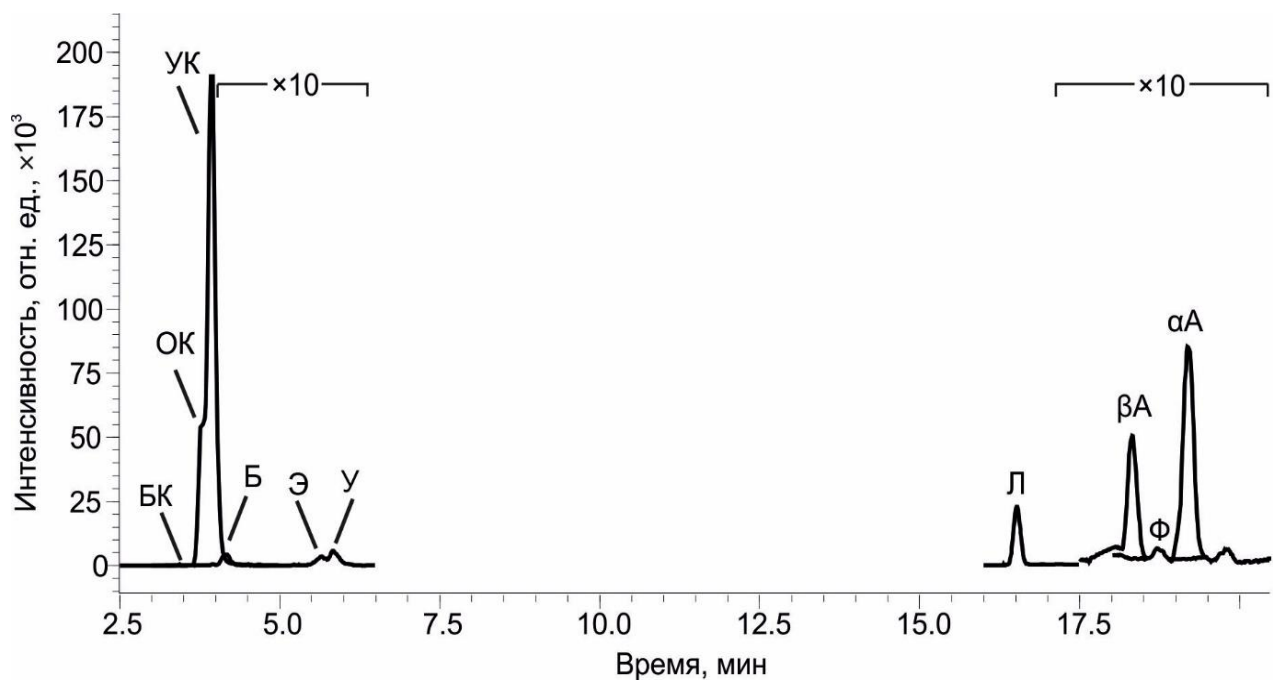


Рисунок 24. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры брусники на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

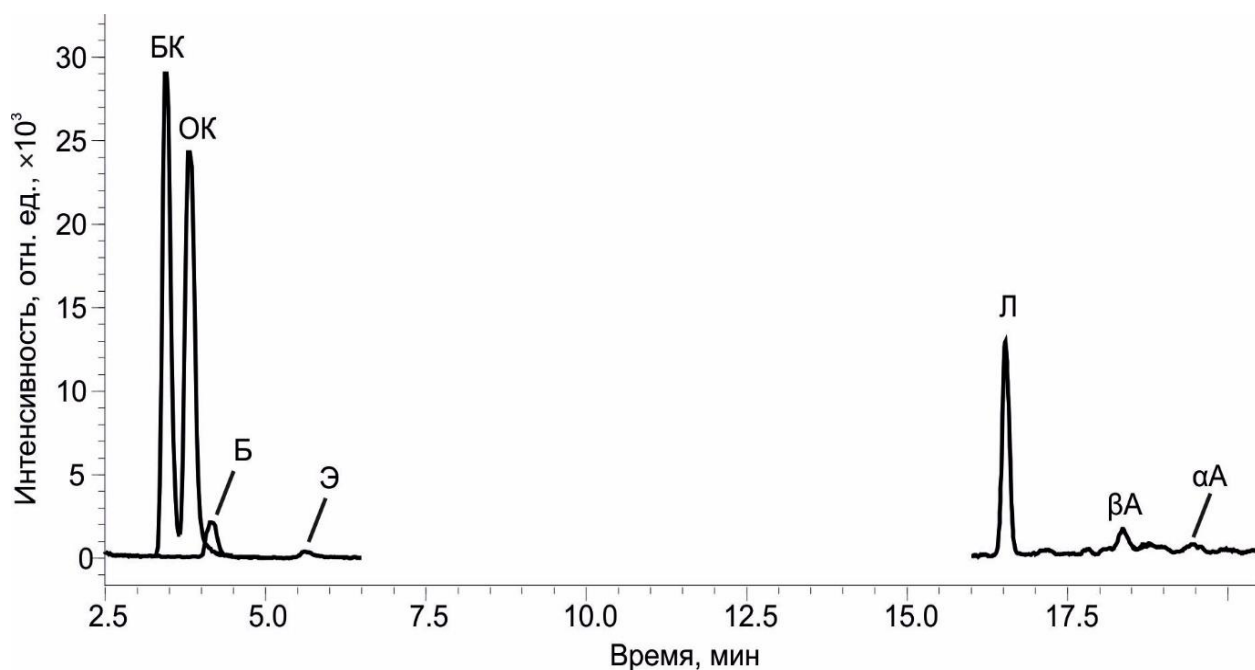


Рисунок 25. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта корня солодки на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

Таблица 13. Содержание десяти ПЦТТ в растительном сырье по результатам анализа субкритических метанольных экстрактов методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС (P=0,95; n=3)

Соединение	Кора березы, г/кг	Кожура яблока «Golden Delicious», г/кг	Кожура яблока «Red Delicious», г/кг	Кожура клюквы, г/кг	Кожура брусники, г/кг	Корень солодки, г/кг
БК	17±1	0,77±0,04	0,38±0,02	0,0033±0,0002	0,010±0,001	0,17±0,01
ОК	8,6±0,5	12±1	5,0±0,2	6,3±0,3	2,6±0,1	0,13±0,01
УК	-*	43±3	28±1	18±1	12±1	-
Б	280±20	0,058±0,003	0,010±0,001	0,0078±0,0004	0,044±0,002	0,017±0,001
Э	4,3±0,2	0,062±0,005	0,033±0,002	0,030±0,002	0,060±0,005	0,0045±0,0003
У	-	1,1±0,1	0,34±0,01	0,094±0,005	0,10±0,01	-
Л	6,9±0,4	0,032±0,002	-	0,0067±0,0004	0,57±0,03	0,031±0,002
βА	0,072±0,003	0,017±0,001	0,0086±0,0006	0,090±0,008	0,37±0,02	0,0064±0,0005
Ф	-	-	-	-	0,12±0,01	-
αА	0,036±0,002	0,088±0,005	0,028±0,001	0,10±0,01	0,74±0,05	0,0031±0,002
Примечание: * - менее ПО						

Вследствие большого различия в концентрациях аналитов - представителей критических пар изомерных соединений (олеаноловая/урсоловая кислоты и эритродиол/уваол) в реальных экстрактах растительного сырья, разделение соответствующих пиков на хроматограммах некоторых образцов (рис. 21-24) значительно ухудшается. Минорные компоненты в каждой паре в этом случае образуют пики-наездники или даже плечи на пике мажорного компонента. Данный факт затрудняет количественный анализ и, несомненно, снижает точность определения концентраций минорных представителей плохо разделяющихся пар аналитов.

Таким образом, использование обращенной неподвижной фазы Nucleodur C18 Isis с поперечно сшитыми октадецильными группами позволяет проводить разделение сложных смесей пентациклических тритерпеноидов различных классов. Достигнуто разделение десяти важнейших ПЦТТ, относящихся к четырем различным классам в течение 20 мин в режиме градиентного элюирования. На основе комбинации этого подхода с тандемным масс-спектрометрическим определением с химической ионизации при атмосферном давлении и субкритической экстракцией метанолом была разработана и валидирована методика высокочувствительного определения ПЦТТ в тканях растений, обеспечившая пределы обнаружения в экстрактах растительной биомассы на уровне 3,2–6,6 мкг/л (для фриделина - 13 мкг/л). Недостатком использованного подхода является недостаточная селективность при разделении критических пар наиболее полярных аналитов (эритродиол/уваол и олеаноловая/урсоловая кислоты), затрудняющая определение одного из компонентов в каждой паре на фоне избытка другого компонента.

3.5 Применение неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания для определения ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС

Как было показано в обзоре литературы (разд. 1.3.3) и в предыдущем разделе, хроматографическое разделение широкого круга ПЦТТ, включающего как близкие по своим свойствам изомеры, так и сильно отличающиеся по полярности соединения

различных классов, на обращенной неподвижной фазе затруднено, а продолжительность анализа во многих случаях оказывается весьма большой.

Перспективным для преодоления таких проблем при одновременном повышении экспрессности анализа является использование неподвижных фаз, которые обеспечивают удерживание по смешанному механизму, включающему гидрофобные, ионообменные и гидрофильные взаимодействия. Среди коммерчески доступных неподвижных фаз со смешанным механизмом удерживания нами протестированы цвиттерионный сорбент Nucleodur HILIC, содержащий привитые сульфобетаиновые группировки, а также Acclaim Mixed-Mode WAX-1, сочетающая длинную алкильную цепь с внедренной полярной амидной группой и терминальную триалкиламинную группировку, способную к ионообменным взаимодействиям (рис. 26).

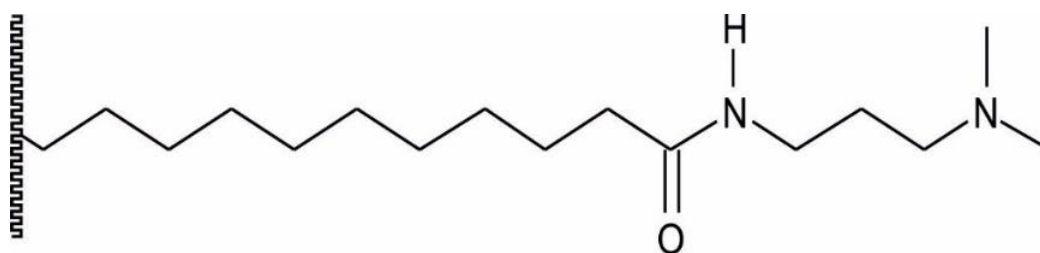


Рисунок 26. Неподвижная фаза Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Попытки достичь разделения ПЦТТ на цвиттерионной неподвижной фазе при различных составах элюента (водный ацетатный буферный раствор – ацетонитрил), обеспечивающих реализацию гидрофильных и ионообменных взаимодействий с аналитами, не увенчалась успехом – удерживание для всех исследуемых соединений оказалось неприемлемо малым и на хроматограмме смеси наблюдался один пик вблизи элюирования мертвого объема колонки (рис. 27).

Результаты, полученные при использовании неподвижной фазы Acclaim Mixed-Mode WAX-1, напротив, показали себя обнадеживающими, поскольку удерживание наиболее полярных аналитов на ней оказалось необычно сильным.

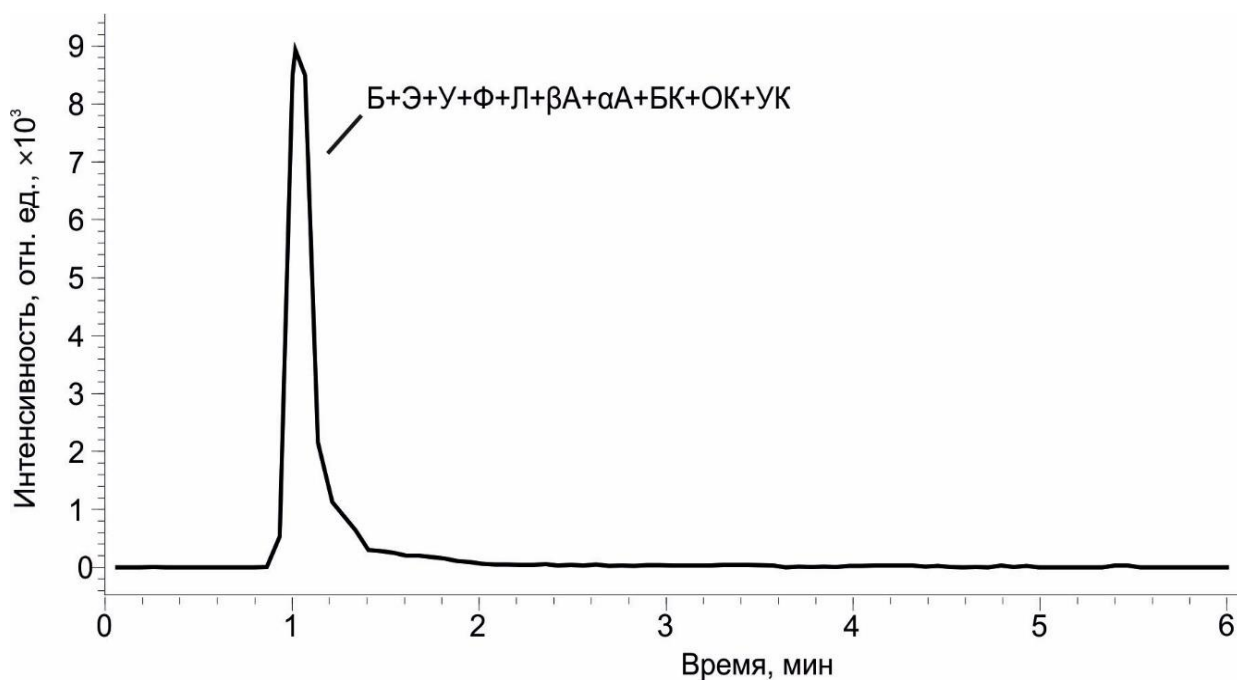


Рисунок 27. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси ПЦТТ (0,5 мг/л) на неподвижной фазе Nucleodur HILIC (ацетонитрил/вода 95:5; рН 4; 25 мМ ацетата аммония)

Реализация смешанного механизма удерживания открывает большие возможности для регулирования селективности разделения аналитов за счет изменения вкладов и различных типов взаимодействий в их удерживание. С другой стороны, это усложняет оптимизацию хроматографического разделения и предполагает понимание роли различных факторов, влияющих на удерживание. К ним относятся, прежде всего, состав подвижной фазы, ее рН ионная сила.

3.5.1 Влияние состава подвижной фазы

Наиболее важной особенностью разделения ПЦТТ на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 является необычный порядок элюирования исследуемых классов аналитов по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией: диолы – кетон фриделин - моноолы - тритерпеновые кислоты. Аномальное положение в этой серии тритерпеновых кислот с наибольшей полярностью среди изученных соединений, по-видимому, обусловлено значительным вкладом в их механизм удерживания (наряду с гидрофобными взаимодействиями) ионного обмена с триалкиламиновыми группами неподвижной

фазы. Это приводит к недопустимо высоким значениям фактора удерживания (k), когда содержание ацетонитрила в подвижной фазе составляет менее 80% (об.) С увеличением содержания ацетонитрила удерживание кислот быстро уменьшается (рис. 28) из-за увеличения элюирующей способности подвижной фазы для ОФ механизма удерживания.

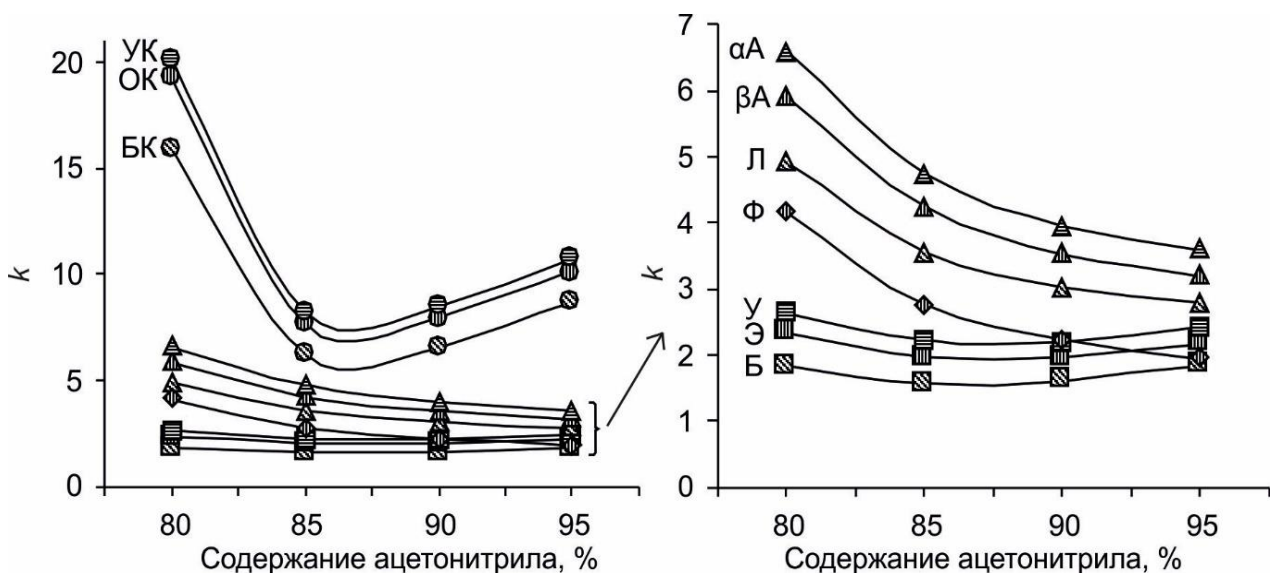


Рисунок 28. Факторы удержания ПЦТТ на неподвижной фазе WAX-1 в зависимости от содержания ацетонитрила в подвижной фазе (5 мМ формиата аммония, рН 4)

Примечательно, что зависимости значений k от содержания ацетонитрила в элюенте для кислот проходят через экстремум и при дальнейшем увеличении концентрации органического растворителя ($> 85\%$) их удерживание увеличивается. Этот эффект связан с увеличением вклада гидрофильных взаимодействий (HILIC) в удерживание аналитов, содержащих полярные группы. В этом случае удерживание определяется распределением ПЦТТ между подвижной фазой и слоем обогащенного водой растворителя, сорбированным на поверхности неподвижной фазы за счет наличия амидной и аминной полярных групп. Естественно, аналогичная (но менее выраженная из-за более низкой полярности по сравнению с кислотами) картина наблюдается для диолов. Поведение четырех менее полярных ПЦТТ (моноолов и фриделина) типично для гидрофобного механизма удерживания, который является для них определяющим при использовании выбранной неподвижной фазы. Однако

зависимости $\text{Log } k$ для этих аналитов от объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе не являются строго линейными (рис. 29) из-за некоторого вклада гидрофильных взаимодействий. Следствием значительного изменения вклада гидрофобных взаимодействий и механизма HILIC в удерживание диолов является инверсия порядка элюирования этих соединений и фриделина, наблюдаемая при содержании ацетонитрила 90–95% (рис. 28).

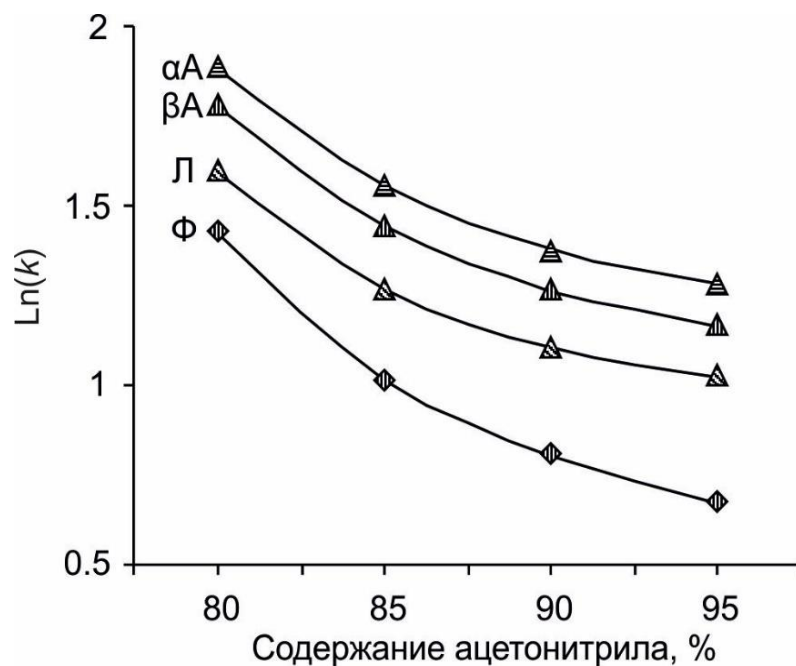


Рисунок 29. Зависимости логарифмов факторов удерживания ПЦТТ (моноолов и фриделина) на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 от содержания ацетонитрила в подвижной фазе (5 мМ формиата аммония, рН 4).

Дополнительным подтверждением значительной роли гидрофильных взаимодействий (HILIC) в удерживании кислот и диолов является изменение поведения аналитов при замене ацетонитрила в подвижной фазе на метанол. Последний не пригоден для реализации HILIC из-за его высокого сродства к полярным группам неподвижной фазы и, как следствие, конкуренции с водой. В этом случае, все аналиты демонстрируют сходную картину - величины $\text{Log } k$ уменьшаются практически линейно с увеличением объемной доли метанола в подвижной фазе (рис. 30). Отсутствие заметного вклада гидрофильных взаимодействий не позволяет использовать подвижную фазу на основе водного

метанола для разделения ПЦТТ из-за потери хроматографического разрешения как между группами аналитов, так и соединениями в каждой группе.

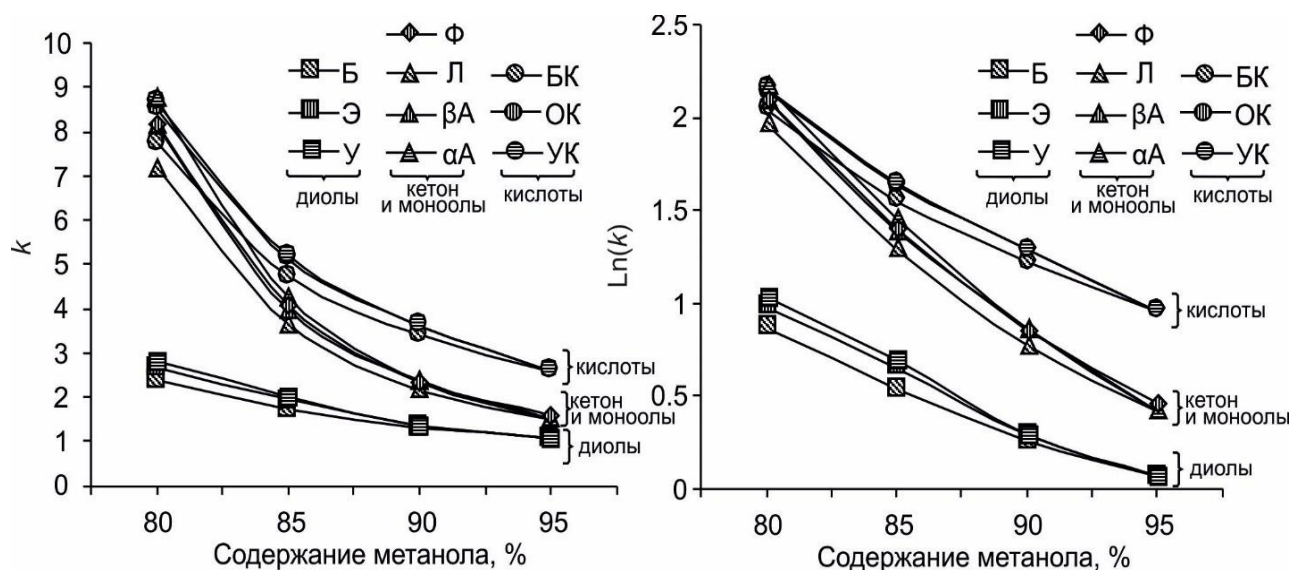


Рисунок 30. Зависимости величин факторов удерживания (слева) и их логарифмов (справа) для ПЦТТ на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 от содержания метанола в подвижной фазе (5 мМ формиата аммония, рН 4).

3.5.2 Влияние рН и ионной силы подвижной фазы

Поскольку значения pK_a концевых третичных аминных групп привитой неподвижной фазы находятся далеко за пределами рекомендуемого рабочего диапазона рН (2,8–6,5) хроматографической колонки, влияние кислотности подвижной фазы на разделение аналитов может быть вызвано только изменением степени диссоциации тритерпеновых кислот, величины pK_a которых в водном растворе близки к 5. Это подтверждается полученными зависимостями коэффициентов удерживания ПЦТТ от рН (рис. 31), из которых видно, что наблюдается значительное изменение значений k для бетулиновой, олеаноловой и урсоловой кислот. Увеличение удерживания этих аналитов с увеличением рН подвижной фазы обусловлено превращением кислот в анионную форму наряду с упомянутым выше решающим вкладом ионообменных взаимодействий в механизм их удерживания на неподвижной фазе. Примечательно, что зависимости имеют S-образную форму с резким изменением k вблизи значения pK_a карбоксильных групп,

где влияние рН на концентрации молекулярной и анионной форм наиболее выражено. Незначительное увеличение (в пределах $\sim 0,1$ единицы) коэффициентов удерживания при увеличении рН для других аналитов, по-видимому, связано с небольшим изменением состава и ионной силы подвижной фазы из-за различного содержания муравьиной кислоты в используемом формиатном буферном растворе.

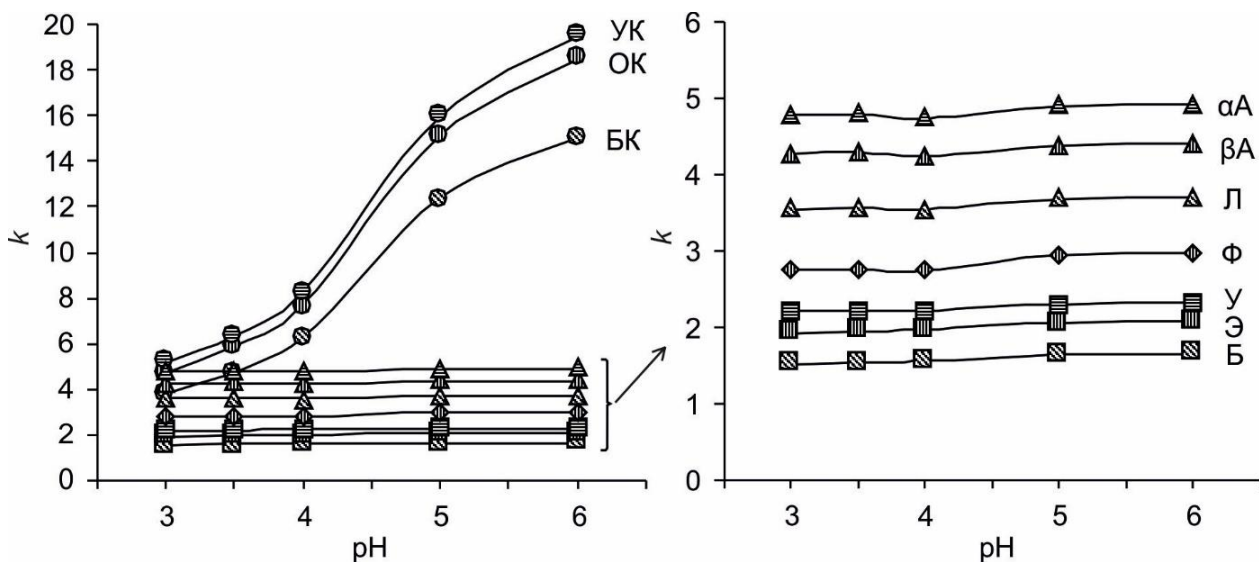


Рисунок 31. Зависимости факторов удерживания ПЦТТ на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 от рН подвижной фазы (5 мМ формиата аммония, содержание ацетонитрила 85%).

Ионная сила подвижной фазы определяет интенсивность электростатических взаимодействий аналитов с заряженными группами неподвижной фазы и является важным фактором, влияющим на удерживание тритерпеновых кислот (рис. 32). Как и следовало ожидать, значения k для них резко уменьшаются с увеличением концентрации формиата аммония в подвижной фазе, а нелинейность зависимостей в координатах $\text{Log } k - \text{Log } C$ [122] подтверждает вывод о том, что существенный вклад в удерживание тритерпеновых кислот принадлежит взаимодействиям, которые не связаны с ионным обменом. Значения k остальных ПЦТТ незначительно увеличиваются с уменьшением концентрации буферной соли ниже 5 мМ. Вероятно, это связано с подавлением ион-дипольного и диполь-дипольного взаимодействий стационарной фазы с аналитами формиатом аммония.

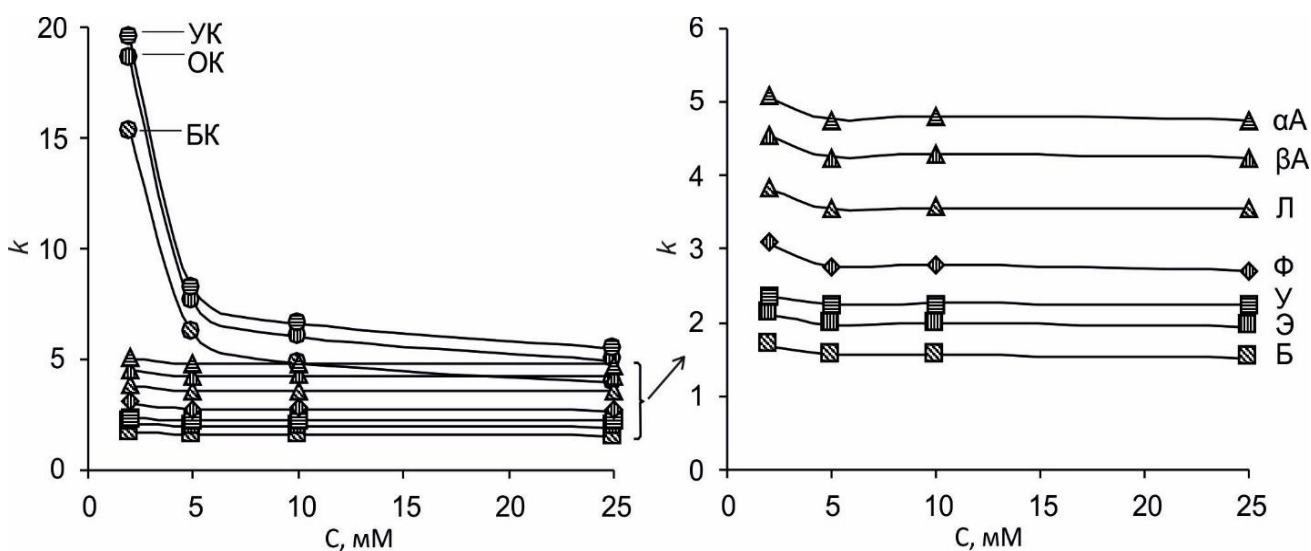


Рисунок 32. Зависимости факторов удерживания ПЦТТ на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 от концентрации формиата аммония в подвижной фазе (рН 4, содержание ацетонитрила 85%)

3.5.3 Оптимальные условия хроматографического разделения

Принимая во внимание необходимость обеспечения максимальной скорости анализа, достаточно полного разделения аналитов и высокой надежности метода и исходя из полученных зависимостей, легко сделать вывод, что оптимальные условия для хроматографического разделения достигаются при содержании ацетонитрила в подвижной фазе 85–90%, концентрации формиата аммония 5–10 мМ и рН 3,5–4. Точная настройка параметров в указанных диапазонах с учетом желательности использования минимально возможной концентрации соли для обеспечения высокой чувствительности масс-спектрометрического детектирования (вследствие подавления ионизации аналитов в источнике ионов в присутствии фонового электролита) позволила предложить следующий состав подвижной фазы: 33,3 мМ водный буферный раствор формиата с рН 4 и ацетонитрилом в соотношении 15:85 (об.), что соответствует концентрации соли 5 мМ в подвижной фазе. При максимальной скорости потока подвижной фазы, рекомендованной изготовителем для данного типа хроматографической колонки (0,4 мл/мин), выбранные условия позволили достичь разделения всех десяти аналитов в течение 7 минут (рис. 33, табл.

12), с оптимальным диапазоном величин факторов удержания ПЦТТ от 1,57 (бетулин) до 8,23 (урсоловая кислота).

Достигнутая продолжительность анализа в 2–5 раз меньше по сравнению с любыми методиками хроматографического разделения ПЦТТ, основанными на применении жидкостной или газовой хроматографии и описанными ранее в литературе. Отдельно следует подчеркнуть, что в разработанном нами подходе используется режим изократического элюирования, который дает дополнительный выигрыш как во времени уравнивания хроматографической системы между анализами, так и в надежности метода.

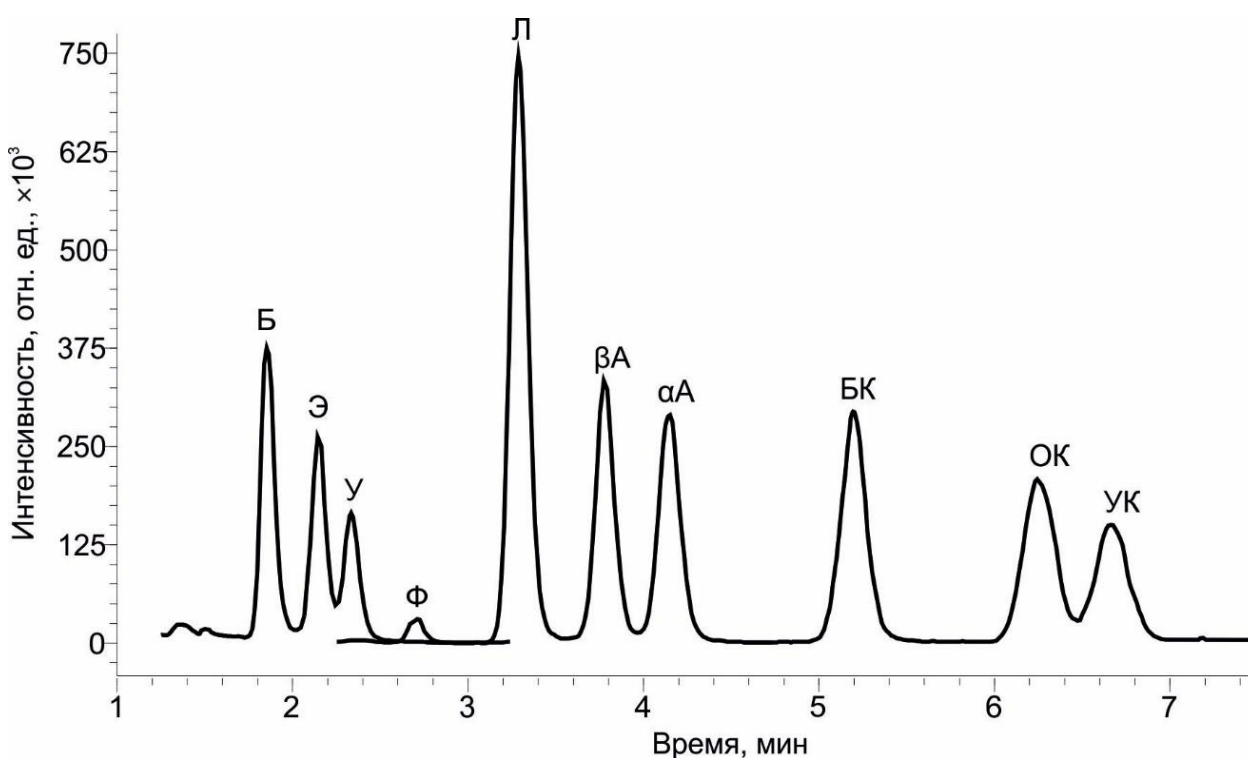


Рисунок 33. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси ПЦТТ (12,5 мг/л) на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 в оптимизированных условиях (элюент – вода-ацетонитрил 15:85; 5 мМ формиата аммония; рН 4,0)

Несмотря на экспрессность анализа, для большинства ПЦТТ достигнуто полное (до базовой линии) разделение. Исключение составляют пары эритродиол/уваол и олеанололовая/урсоловая кислота, для которых хроматографическое разрешение составило 1,25. Тем не менее, такая величина R_s не создает значительных проблем для одновременного количественного определения

ПЦТТ. Следует отметить, что значение R_s для третьей критической пары анализов (α/β -амирины) достигает значения (1,70), близкого к оптимальному уровню.

Таблица 14. Характеристики хроматографического разделения десяти ПЦТТ на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Соединение	t_r	k	α	N	R_s
Б	1,86	1,57	–	2900	–
Э	2,15	1,98	1,26	3892	2,14
У	2,34	2,23	1,13	3376	1,25
Ф	2,72	2,76	1,24	3494	2,21
Л	3,29	3,55	1,29	5125	3,13
β А	3,78	4,24	1,19	5351	2,53
α А	4,15	4,75	1,12	5222	1,70
БК	5,20	6,20	1,31	5688	4,16
ОК	6,24	7,64	1,23	6023	3,50
УК	6,67	8,23	1,08	5266	1,25

3.5.4 Метрологическая характеристика и валидация методики

Полученные значения ПО и НПОК (табл. 15) лежат в относительно узких диапазонах 3–12 и 10–40 мкг/л соответственно. Исключение составляет фриделин (ПО = 44 мкг/л) – единственный из выбранных анализов, который образует протонированную молекулу $[M+H]^+$ в процессе ХИАД и отличается от других исследуемых ПЦТТ более низкой эффективностью генерации ионов-предшественников. Аналогичное наблюдение было сделано в работе [104] при определении ПЦТТ методом ВЭЖХ-ФХИАД-МС/МС. Сравнение полученных величин пределов обнаружения с данными, приведенными в литературе, показывает, что разработанный метод отличается высокой чувствительностью, которая сопоставима или существенно выше, чем достигнутая в различных работах (см. 1.3) для определения ПЦТТ с помощью ВЭЖХ-МС/МС (0,5-157,9 мкг/л).

Полученные градуировочные зависимости являются линейными ($R^2 > 0,999$) для всех исследованных ПЦТТ в диапазоне концентраций от НПОК до максимального использованного нами значения (25,0 мг/л), охватывающем три порядка. Следует отметить, что коэффициенты отклика s (наклоны линейных

градуировочных графиков) для большинства аналитов лежат в относительно узком диапазоне $13 \cdot 10^4$ – $19 \cdot 10^4$, что можно использовать для целей полуколичественного скрининга используя минимальный набор стандартов ПЦТТ.

Таблица 15. Градуировочные зависимости ($y=sx+a$) для площади хроматографического пика в зависимости от концентрации аналита, ПО и НПОК десяти ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Аналит	Линейный диапазон концентраций (мкг/л)	s	a	R ²	ПО (мкг/л)	НПОК (мкг/л)
Б	33-25000	107568	887	0,999	10	33
Э	20-25000	60673	528	0,999	6	20
У	30-25000	55960	260	0,999	9	30
Ф	147-25000	15551	336	0,999	44	147
Л	10-25000	355678	275	0,999	3	10
βА	23-25000	169985	332	0,999	7	23
αА	20-25000	150489	249	0,999	6	20
БК	40-25000	188872	721	0,999	12	40
ОК	20-25000	179116	280	0,999	6	20
УК	13-25000	130986	210	0,999	4	13

Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости (повторяемости и промежуточной прецизионности) методики, полученные при многократном анализе модельного раствора смеси аналитов в течение 8 часов и двух суток соответственно (табл. 16) на уровне концентраций, близком к НПОК (50 мкг/л, в случае фриделина – 150 мкг/л), показали, что стандартное отклонение (СО) в обоих случаях не превышало 10 %, а правильность лежала в пределах 95–105 %.

В целом, характеристики чувствительности разработанной методики соответствуют величинам, достигнутым при использовании метода ОФ ВЭЖХ-МС/МС (разд. 3.3, табл. 10). Это объясняется близостью условий ХИАД аналитов при идентичности параметров ионного источника и сходных составах подвижной фазы. Заметное различие наблюдается для фриделина, образование протонированных молекул которого протекает эффективнее при более низких

величинах рН элюента, используемых в ОФ ВЭЖХ. Воспроизводимость и точность анализа в случае ВЭЖХ-МС/МС с использованием неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания, напротив, оказывается существенно выше по сравнению с ОФ ВЭЖХ-МС/МС (табл. 11 и 16) за счет существенно лучшего разделения компонентов и применения изократического элюирования.

Таблица 16. Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости и правильности определения ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания Acclaim Mixed-Mode WAX-1 при анализе растворов модельных смесей аналитов с концентрацией 50 мкг/л (150 мкг/л для фриделина)

Аналит	Повторяемость (8 ч, n=7)			Промежуточная прецизионность (48 ч, n=14)		
	Концентрация, мкг/л	Правильность, %	СО*, %	Концентрация, мкг/л	Правильность, %	СО*, %
Б	49±3	98	6,7	48±4	97	8,2
Э	51±2	102	5,2	49±3	97	5,9
У	49±3	99	6,6	52±4	103	9,1
Ф	149±7	99	5,0	146±7	97	4,9
Л	51±2	101	4,8	51±3	102	6,4
βА	49±4	99	7,9	49±3	98	7,2
αА	49±3	98	6,6	49±2	97	4,7
БК	48±4	97	8,3	53±2	105	4,8
ОК	49±2	98	4,0	48±2	95	5,1
УК	52±2	103	5,1	51±3	103	6,3

*-Стандартное отклонение

Более адекватная оценка точности метода с учетом возможных матричных эффектов была получена с помощью метода введено-найдено с использованием субкритического экстракта брусники в качестве реальной матрицы. Поскольку последний уже содержали значительные концентрации некоторых анализируемых веществ, нижний предел доступного диапазона концентраций для них был относительно высоким.

Таблица 17. Оценка правильности определения ПЦТТ в субкритическом метанольном экстракте кожуры брусники методом «введено-найдено»

Аналит	Исходная концентрация, мкг/л	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	Извлечение добавки (%)
Б	220±10	12500	13000±1000	101±2
	220±10	5000	5300±200	101±3
	220±10	500	690±30	96±4
Э	33±2	12500	12000±1000	100±1
	33±2	5000	5100±200	102±6
	33±2	500	550±30	103±8
У	86±4	12500	12000±1000	98±1
	86±4	5000	5000±200	98±8
	86±4	500	590±30	101±7
Ф	-	12500	13000±1000	101±3
	-	5000	4900±200	98±5
	-	500	490±40	98±8
Л	330±10	12500	13000±1000	101±3
	330±10	5000	5400±200	101±8
	330±10	500	850±30	102±6
βА	400±20	12500	13000±1000	100±2
	400±20	5000	5400±200	99±5
	400±20	500	890±40	97±4
αА	560±20	12500	13000±1000	99±2
	560±20	5000	5400±200	98±7
	560±20	500	1100±100	99±7
БК	9,0±0,4	12500	12000±1000	99±3
	9,0±0,4	5000	5100±200	102±5
	9,0±0,4	500	500±20	98±8
ОК	2600±100	12500	15000±1000	100±2
	2600±100	5000	7600±400	101±5
	2600±100	500	3100±200	104±4
УК	8900±400	12500	22000±1000	101±3
	8900±400	5000	1400±600	98±7

Полученные результаты (табл. 17) демонстрируют исключительно высокий уровень правильности определения всех исследуемых ПЦТТ независимо от уровня концентрации, сопоставимый с результатами анализа модельных растворов, что подтверждает отсутствие заметных интерференций со стороны матрицы - полученные значения извлечения добавки находятся в диапазоне 96–104%. Эффективное устранение эффектов матрицы достигается вследствие хорошего хроматографического отделения аналитов от компонентов матрицы, использования ХИАД, а также возможности значительного разбавления экстракта перед анализом благодаря высокой чувствительности метода.

3.5.5 Анализ биомассы растений

Кора березы и кожура брусники, характеризующиеся сложным химическим составом и являющиеся важными промышленными (береста) и пищевыми (кожура ягод) источниками ПЦТТ использованы в качестве реальных объектов для апробации разработанного подхода. В качестве метода пробоподготовки использовалась экстракция субкритическим метанолом при 100°C, обеспечивающая количественную и быструю экстракцию аналитов из растительных тканей (раздел 3.1).

Полученные хроматограммы (рис. 34, 35) демонстрируют присутствие большинства исследуемых аналитов в обоих исследуемых образцах в сильно различающихся (до четырех порядков) концентрациях (табл. 18). Бетулин, эритродиол, уваол, бетулиновая и олеаноловая кислоты преобладают во внешнем слое коры березы, что согласуется с литературными данными [2]. Среди второстепенных компонентов β - и α -амирины были обнаружены в количестве 0,29 и 0,39 мг/г. Интересно, что хотя присутствие β -изомера известно в литературе, обнаружение α -амирина в коре березы ранее не сообщалось. Одной из причин этого может быть трудность хроматографического разделения этих аналитов.

Экстракт брусники отличается от бересты гораздо более сложным химическим составом, что, однако, не мешает определению ПЦТТ. В нем детектируются все исследуемые соединения, за исключением фриделина. Преобладающими компонентами являются урсоловая и олеаноловая кислоты (15,74

и 4,59 мг/г соответственно), остальные аналиты присутствуют в количествах от 0,016 до 0,99 мг/г. Широкий линейный диапазон градуировочных кривых ПЦТТ позволяет одновременно определять как основные, так и второстепенные анализируемые вещества в растительном экстракте без дополнительных стадий разбавления или концентрирования образцов, что дополнительно сокращает общее время анализа.

Таблица 18. Содержание десяти ПЦТТ в растительном сырье по данным анализа субкритических метанольных экстрактов методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания WAX-1 (P=0,95; n=3)

Аналит	Содержание, мг/г	
	Кора березы	Кожура брусники
Б	280±10	0,38±0,02
Э	4,6±0,2	0,059±0,003
У	-	0,15±0,07
Ф	-	-
Л	6,4±0,2	0,59±0,02
βА	0,29±0,01	0,71±0,03
αА	0,39±0,02	0,99±0,04
БК	15±1	0,016±0,001
ОК	5,1±0,2	4,6±0,2
УК	-	15±1

Таким образом, использование неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания, включающим гидрофобные, гидрофильные и анионообменные взаимодействия, позволяет проводить быстрое хроматографическое разделение сложных смесей пентациклических тритерпеноидов. Большие возможности для настройки селективности хроматографического разделения благодаря изменению вкладов различных типов взаимодействий аналит – неподвижная фаза за счет изменения состава подвижной фазы, рН и ионной силы обеспечили разделение десяти основных ПЦТТ, относящихся к четырем различным классам (включая три пары критических аналитов - эритродиол/уваол, α-амирин/β-амирин и олеаноловая/урсоловая кислоты) в течение 7,5 мин в режиме изократического элюирования.

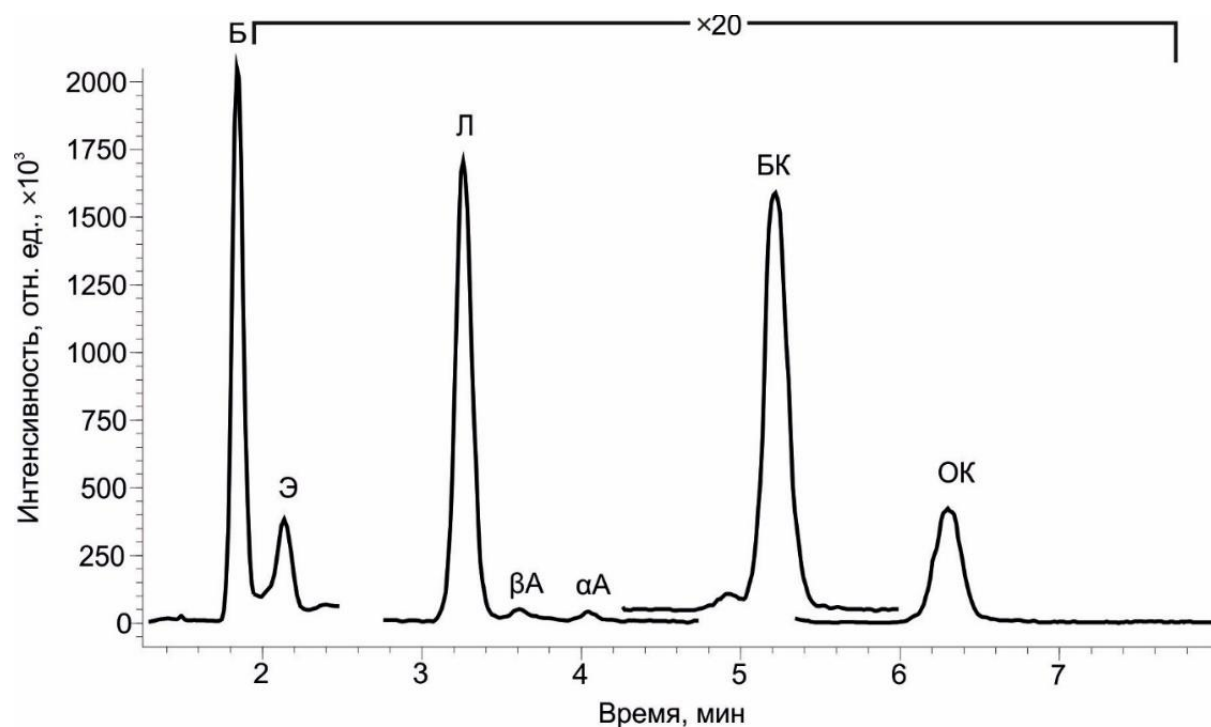


Рисунок 34. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта коры березы с использованием неподвижной фазы Acclaim Mixed-Mode WAX-1

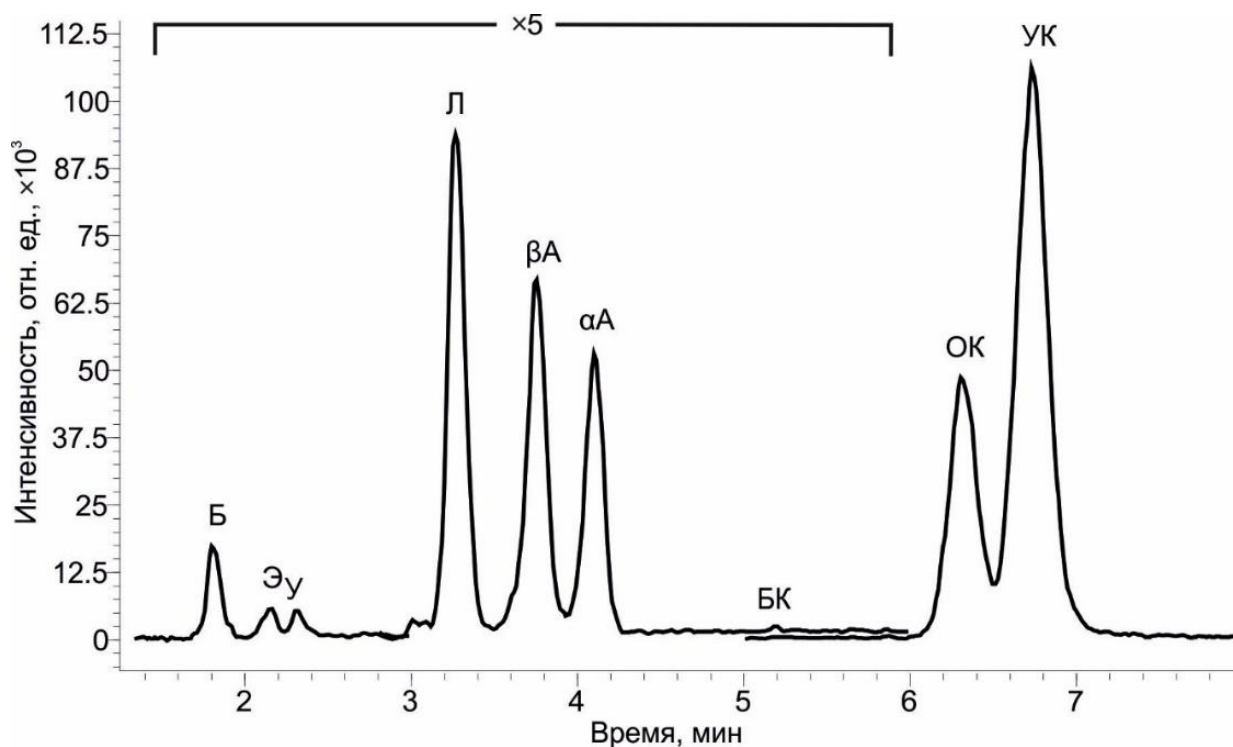


Рисунок 35. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры брусники с использованием неподвижной фазы Acclaim Mixed-Mode WAX-1

На основе комбинации этого подхода с тандемным масс-спектрометрическим определением с химической ионизации при атмосферном давлении и субкритической экстракцией метанолом был разработан и утвержден быстрый, точный и высокочувствительный метод определения ПЦТТ в тканях растений. При общей продолжительности аналитического цикла (включая этапы подготовки образца) не более 40 минут он обеспечивает пределы обнаружения в экстрактах растительной биомассы 3–12 мкг/л (44 мкг/л для фриделина).

3.6 Скрининг тритерпеноидов в растительном сырье методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме сканирования ионов-предшественников

Ввиду многообразия ПЦТТ и их производных (например, сапонинов), синтезируемых растениями, помимо целевого определения приоритетных аналитов большое значение имеет решение задач нецелевого скрининга ПЦТТ без использования стандартных образцов. Учитывая сходство тандемных масс-спектров ПЦТТ, для достижения такой цели может быть использован масс-спектрометрический подход, основанный на сканировании ионов-предшественников (СИП).

3.6.1 Выбор иона-продукта

Ионы-предшественники девяти исследуемых ПЦТТ (бетулиновая кислота, олеаноловая кислота, урсоловая кислота, бетулин, эритродиол, уваол, лупеол, β -амирин и α -амирин), использованные для их определения в режиме МЗР (табл. 5, 8) подвергались активированной соударениями диссоциации при варьировании энергии соударений в диапазоне от 5 до 60 эВ с шагом 5 эВ. Полученный массив тандемных масс-спектров подвергали анализу методом главных компонент с использованием ПО Marker View для выявления общих для всех аналитов ионов-продуктов. Полученные результаты показывают, что независимо от энергии соударения в широком диапазоне значений данного параметра наиболее характерными для всех ПЦТТ являются ионы-продукты с m/z 81; 95; 109; 123 и 137 (рис. 10), отличающиеся на величину m/z 14 (метиленовая группа). При этом

продукт-ион с m/z 95 является наиболее интенсивным для всех соединений при энергии соударения 40 эВ (рис. 40).

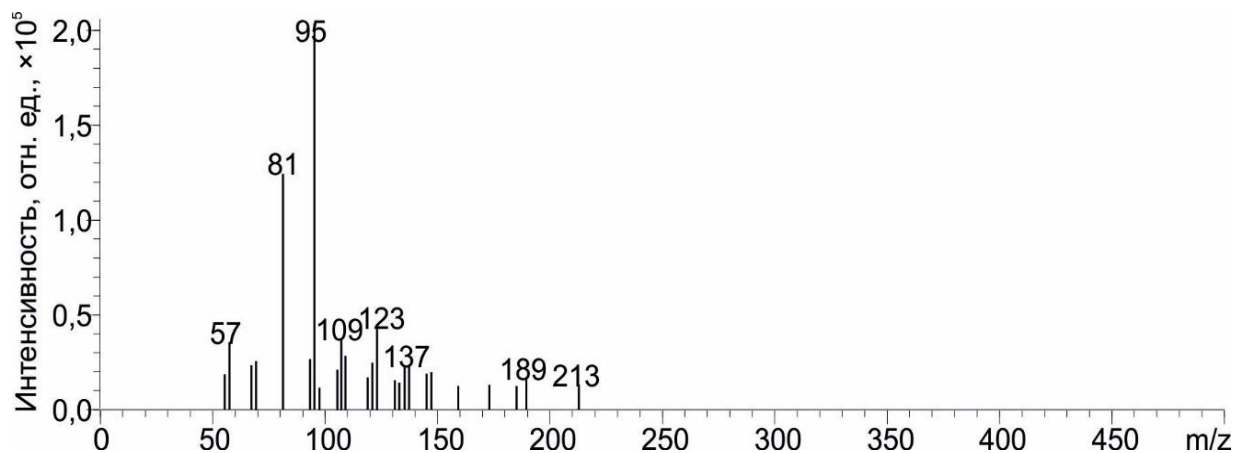


Рисунок 40. Тандемный масс-спектр бетулиновой кислоты при энергии соударения 40 эВ (ион-предшественник – $[M+H-H_2O]^+$ с m/z 439)

Таким образом, ион-продукт первого поколения с m/z 95 при энергии соударения 40 эВ использовался в дальнейших исследованиях в качестве диагностического иона для идентификации ПЦТТ в режиме СИП.

3.6.2 Сканирование ионов-предшественников ПЦТТ в экстрактах растений

В качестве тестовых объектов для применения метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП использовали экстракты коры березы, кожуры яблока зеленого, кожуры клюквы и корня солодки, полученные с использованием субкритического метанола при 100°C (разд. 3.1). Хроматографическое разделение проводили на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis, хорошо зарекомендовавшей себя для определения широкого круга ПЦТТ (разд. 3.4). Неподвижную фазу со смешанным механизмом удерживания (разд. 3.5) не использовали для решения задач нецелевого скрининга ввиду необходимости тщательной оптимизации разделения аналитов с варьированием набора факторов, что невозможно для неизвестных соединений и при отсутствии стандартных образцов. Вследствие возможности присутствия в исследуемых экстрактах значительного количества полярных соединений (например, гликозилированных ПЦТТ) градиентная программа элюирования в режиме ОФ ВЭЖХ также была изменена в пользу уменьшения элюирующей силы

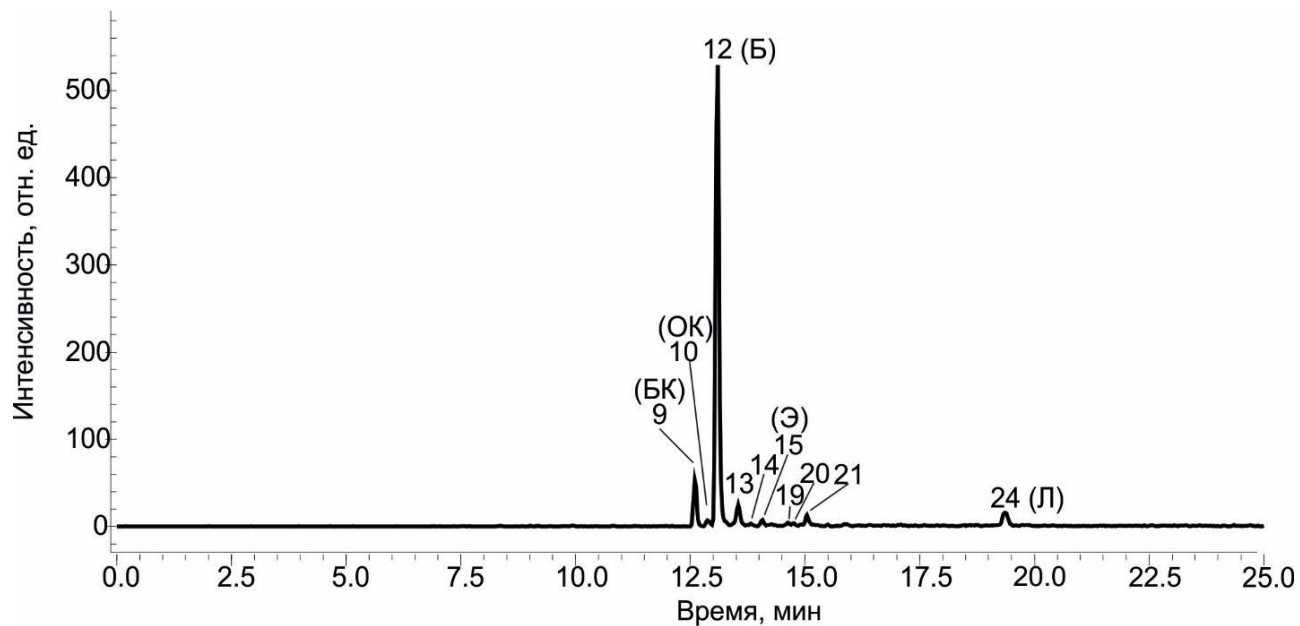


Рисунок 41. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта коры березы, полученная в режиме СИП (ион-продукт с m/z 95, энергия соударений 40 эВ)

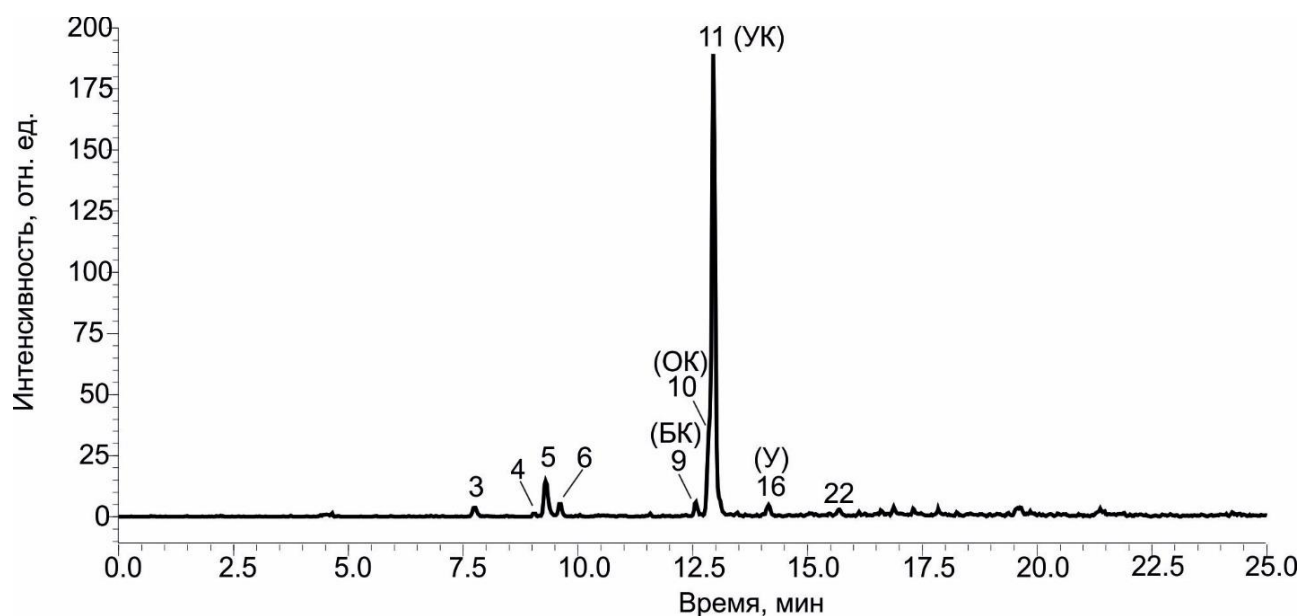


Рисунок 42. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры яблока «Golden Delicious», полученная в режиме СИП (ион-продукт с m/z 95, энергия соударений 40 эВ)

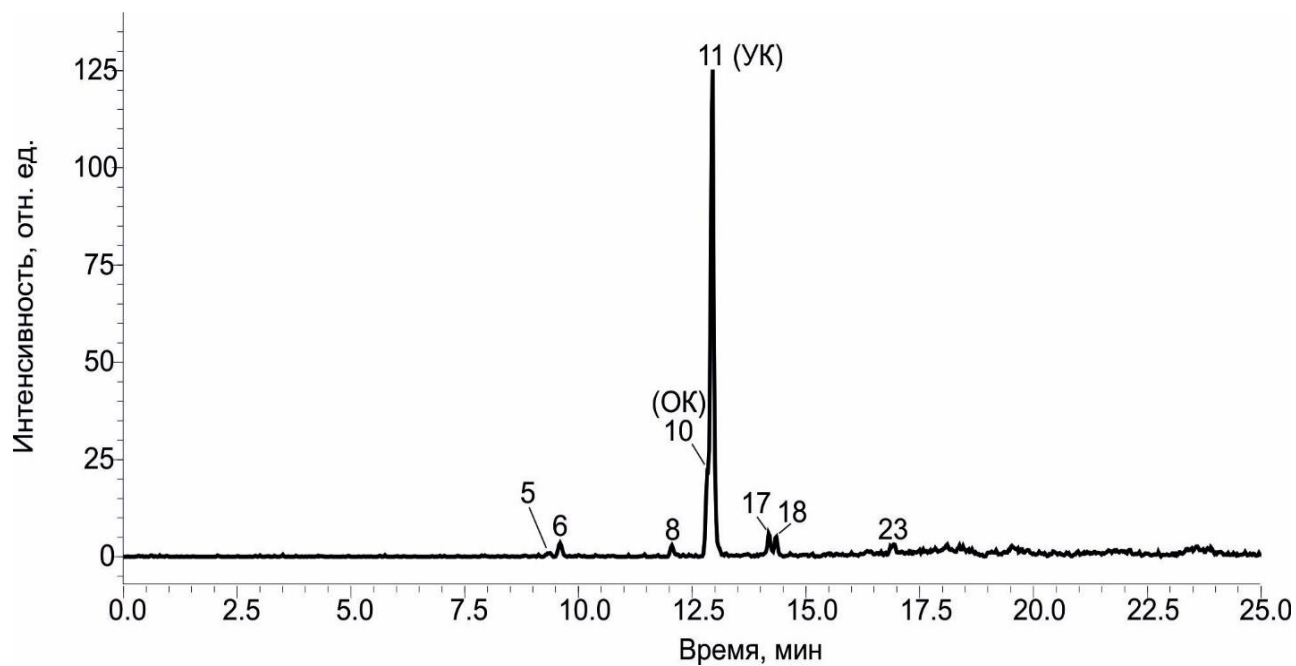


Рисунок 43. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта кожуры клюквы, полученная в режиме СИП (ион-продукт с m/z 95, энергия соударений 40 эВ)

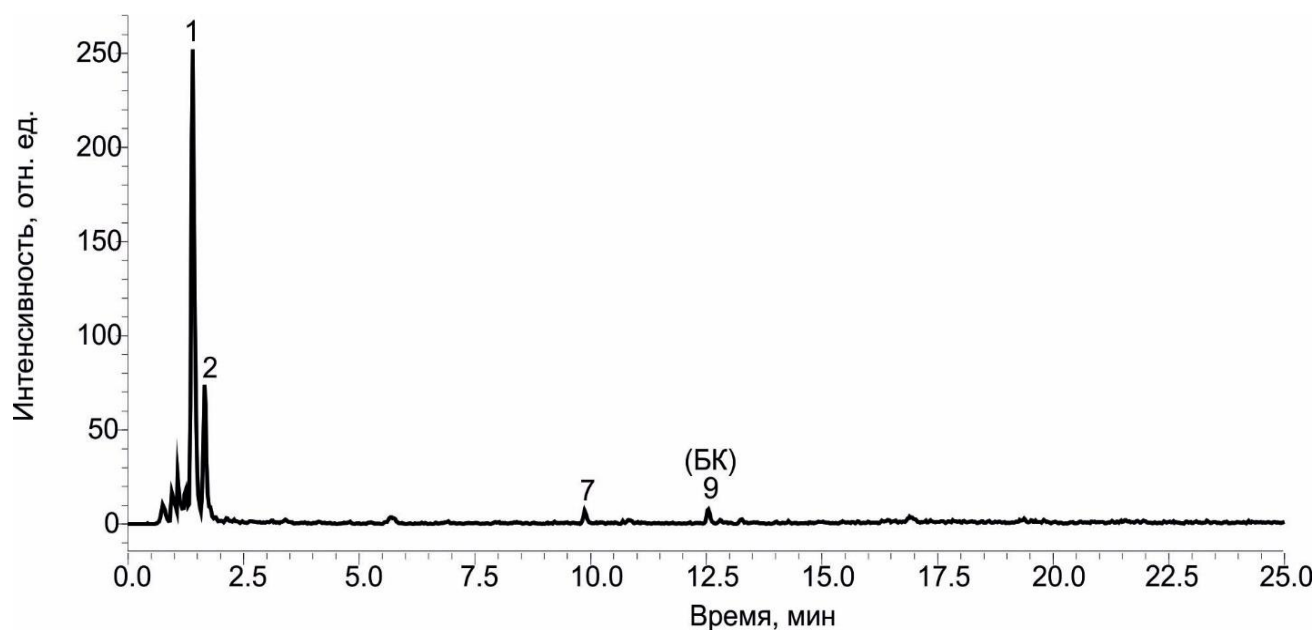


Рисунок 44. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма субкритического метанольного экстракта корня солодки, полученная в режиме СИП (ион-продукт с m/z 95, энергия соударений 40 эВ)

подвижной фазы на начальном участке хроматограммы: в качестве элюента использовалась смесь ацетонитрила с 0,5 % муравьиной кислоты (В) и воды с 0,5 % муравьиной кислоты (А) в соотношении 0-5 мин – 50 % В; с 15 мин – 100 % В. Общая продолжительность анализа несколько увеличилась и составила 30 мин. Полученные хроматограммы экстрактов представлены на рисунках 41–44.

Использование режима СИП позволило обнаружить в реальных образцах экстрактов растений исследуемые ПЦТТ (для которых имелись стандартные образцы) и дополнительно обнаружить семнадцать ПЦТТ и их производных. Полный список детектируемых соединений и их предположительная идентификация на основе величин m/z ионов-предшественников, их тандемных масс-спектров и литературных данных представлена в табл. 19.

Таблица 19. Предположительная идентификация ПЦТТ и их производных в экстрактах растений методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП

№*	t_R , мин	m/z иона предшественника	Предполагаемое соединение
1	2	3	4
1	1,398	823	Глицирризиновая кислота
2	1,657	823	Изомер глицирризиновой кислоты
3	7,753	469	Аннурковая кислота
4	9,065	471	1-Гидрокси-3-оксоурс12-ен-28-овая кислота
5	9,300	455	Маслиновая кислота
6	9,612	455	Корозоловая кислота
7	9,878	471	Эноксолон
8	12,051	455	не идентифицировано (кожура клюквы)
9 (БК)	12,542	439	Бетулиновая кислота
10 (ОК)	12,837	439	Олеаноловая кислота
11 (УК)	12,941	439	Урсоловая кислота
12 (Б)	13,094	425	Бетулин
13	13,55	425	Бетулин-3-кофеат
14	13,822	423	не идентифицировано (кора березы)
15 (Э)	14,068	425	Эритродиол

Продолжение таблицы 19.

1	2	3	4
16 (У)	14,152	425	Уваол
17	14,184	439	не идентифицировано (кожура клюквы)
18	14,340	439	не идентифицировано (кожура клюквы)
19	14,634	425	не идентифицировано (кора березы)
20	14,756	439	Олеаноловая кислота 3-ацетат
21	15,045	423	ПЦТТ бересты
22	15,686	423	не идентифицировано (кожура яблока «Golden Delicious»)
23	16,931	397	не идентифицировано (кожура клюквы)
24 (Л)	19,361	409	Лупеол
25 (βА)	21,143	409	β-Амирин
26 (αА)	22,008	409	α-Амирин

*-номер соединения соответствует номерам пиков на хроматограммах (рис. 41–44)

Очевидно, что подтверждение принадлежности соединений, обнаруженных в ходе нецелевого скрининга, к классу ПЦТТ и их надежная идентификация невозможны без дополнительных исследований с привлечением масс-спектрометрии высокого разрешения, справочных данных по тандемным масс-спектрам предполагаемых аналитов или получения их стандартных образцов. Тем не менее, полученные нами результаты показывают перспективность используемого подхода для скрининговых исследований растительного сырья.

3.6.3 Определение ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП с применением стандартных образцов

Хроматомасс-спектрометрический анализ в режиме сканирования ионов-предшественников, помимо решения задач нецелевого скрининга ПЦТТ, может быть использован для одновременного целевого количественного определения аналитов, для которых имеются коммерчески доступные стандартные образцы. Несмотря на то что использование квадрупольных масс-спектрометрических детекторов в режиме сканирования спектра ведет к существенному снижению

чувствительности по сравнению с режимом МЗР, данный подход может быть полезен при быстрых скрининговых исследованиях объектов с высокими содержаниями ПЦТТ. Полученные нами результаты (табл. 20) показывают, что градуировочные кривые ПЦТТ при использовании режима СИП линейны ($R^2 > 0,99$) в пределах двух порядков концентрации, при этом значения ПО и НПОК находятся в диапазоне 0,09-0,18 и 0,29-0,61 мг/л соответственно.

Таблица 20. Градуировочные зависимости ($y=sx+a$) площади хроматографического пика от концентрации аналита, ПО и НПОК ПЦТТ при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП

Аналит	Линейный диапазон концентраций, мг/л	s	a	R^2	ПО, мг/л	НПОК, мг/л
9 (БК)	0,29–25	519542	8502	0,998	0,09	0,29
10 (ОК)	0,55–25	190131	54808	0,997	0,17	0,55
11 (УК)	0,36–25	425547	86815	0,999	0,11	0,36
12 (Б)	0,33–25	453451	34848	0,998	0,10	0,33
15 (Э)	0,37–25	320773	19992	0,999	0,11	0,37
16 (У)	0,36–25	389517	10533	0,999	0,11	0,36
24 (Л)	0,34–25	690180	1741	0,999	0,10	0,34
25 (βА)	0,36–25	819044	75892	0,997	0,11	0,36
26 (αА)	0,61–25	548630	40955	0,999	0,18	0,61

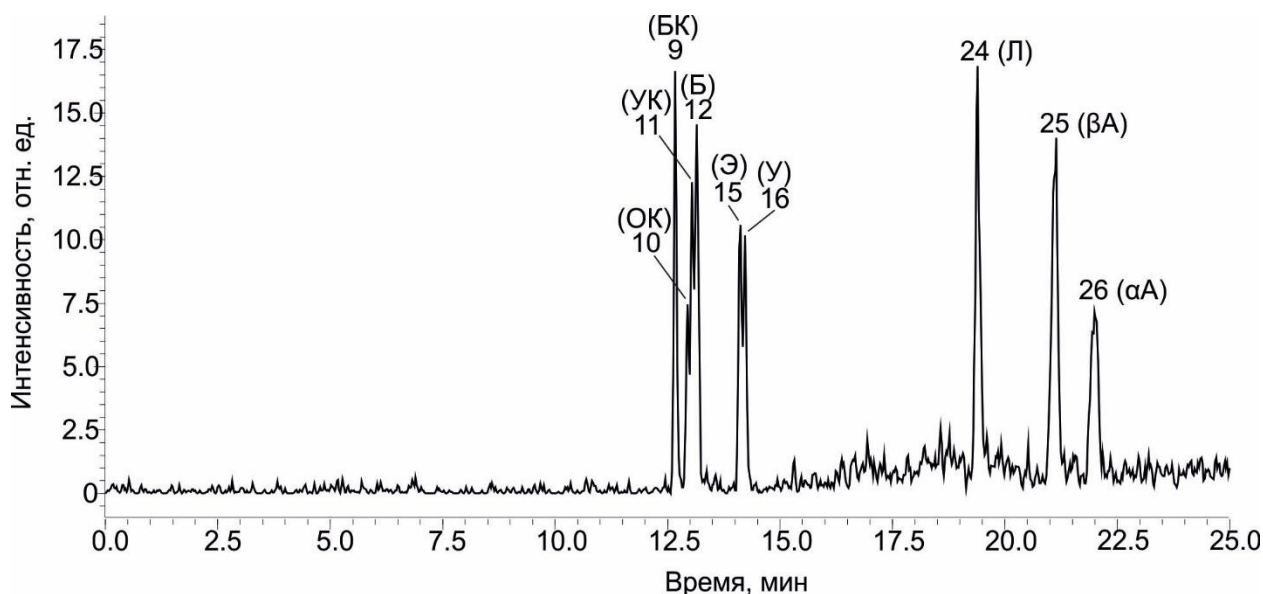


Рисунок 45. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси ПЦТТ (1,25 мг/л), полученная в режиме СИП

Таблица 21. Сравнительный анализ точности относительной количественной оценки режима СИП и МЗР (субкритические экстракты коры березы и яблока зеленого)

Соединение	Кора березы, мг/г			Кожура яблока «Golden Delicious», мг/г		
	СИП ^а	МЗР	Δ , % ^б	СИП ^а	МЗР	Δ , % ^б
9 (БК)	19±1	17±1	11	0,88±0,05	0,77±0,04	15
10 (ОК)	9,6±0,6	8,6±0,5	12	13±1	12±1	6
11 (УК)	-	-	-	49±4	43±3	12
12 (Б)	320±20	280±20	13	-	0,058±0,003	-
15 (Э)	4,6±0,3	4,3±0,2	7	-	0,062±0,005	-
16 (У)	-	-	-	1,1±0,1	1,1±0,1	5
24 (Л)	7,2±0,4	6,9±0,4	5	-	0,032±0,002	-
25 (βА)	-	0,072±0,003	-	-	0,017±0,001	-
26 (αА)	-	0,036±0,002	-	-	0,088±0,005	-

Примечание: * - менее ПО

а - содержание, определенное по градуировочным кривым в режиме СИП по m/z 95

б - рассчитана как разница результатов анализа в режимах СИП и МЗР, отнесенная к результату анализа в режиме МЗР

Таблица 22. Сравнительный анализ точности относительной количественной оценки режима СИП и МЗР (субкритические экстракты кожуры клюквы и корня солодки)

Соединение	Кожура клюквы, мг/г			Корень солодки, мг/г		
	СИП ^а	МЗР	Δ , % ^б	СИП ^а	МЗР	Δ , % ^б
9 (БК)	-	0,0033±0,0002	-	0,2±0,01	0,17±0,01	12
10 (ОК)	6,3±0,3	6,3±0,3	-0,4	-	0,13±0,01	-
11 (УК)	20±1	18±1	14	-	-	-
12 (Б)	-	0,0078±0,0004	-	-	0,017±0,001	-
15 (Э)	-	0,030±0,002	-	-	0,0045±0,0003	-
16 (У)	-	0,094±0,005	-	-	-	-
24 (Л)	-	0,0067±0,0004	-	-	0,031±0,002	-
25 (βА)	-	0,090±0,008	-	-	0,0064±0,0005	-
26 (αА)	-	0,10±0,01	-	-	0,0031±0,002	-

Примечание: * - менее ПО

а - содержание, определенное по градуировочным кривым в режиме СИП по m/z 95

б - рассчитана как разница результатов анализа в режимах СИП и МЗР, отнесенная к результату анализа в режиме МЗР

Достигнутая чувствительность подтверждается хроматограммой модельной смеси ПЦТТ с концентрациями аналитов на уровне 2–3 НПОК (рис. 45). Сравнение величин содержания ПЦТТ в исследуемом растительном сырье, полученных методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС в режимах МЗР и СИП (табл. 21, 22) показывает применимость последнего для определения аналитов в реальных объектах – различие в полученных двумя методами концентрациях не превышает 15%. Недостатком разработанного подхода является невозможность обнаружения и определения минорных компонентов экстрактов. Если в экстракте бересты режим СИП не позволил определить лишь α - и β -амирины, то в корне солодки, содержащем очень малые количества целевых компонентов, из семи ПЦТТ, определяемых в режиме МЗР, режим СИП обеспечил обнаружение лишь одного аналита – бетулиновой кислоты.

3.6.4 Полуколичественное бесстандартное определение ПЦТТ

Для значительного числа ПЦТТ и их многочисленных производных стандартные образцы не доступны. В этом случае можно говорить о возможности оценки их содержания в растительном сырье или полуколичественном определении при использовании, которое может проводиться с использованием градуировочных зависимостей, полученных для одного или нескольких стандартов. Повышение точности определения возможно путем учета относительных факторов отклика, характеризующих различие в интенсивностях хроматографических пиков исследуемых аналитов и используемого стандарта. С целью определения этих величин для исследуемых девяти ПЦТТ (бетулиновой кислоты, олеаноловой кислоты, урсоловой кислоты, бетулина, эритродиола, уваола, лупеола, β -амирина и α -амирина) каждый аналит последовательно выбирался в качестве эталона, по отношению к которому рассчитывали факторы отклика остальных восьми соединений (разд. 2.7) согласно уравнению (1). Как показывают полученные результаты (табл. 23), относительные факторы отклика имеющихся стандартов ПЦТТ довольно близки не только для изомерных соединений, но и для представителей различных классов и рядов (максимальное различие в ~4 раза). Выбор в качестве стандарта бетулина, занимающего промежуточное положение в

исследованном наборе ПЦТТ по интенсивности сигналов позволяет свести максимальную ошибку определения концентраций остальных аналитов к величине в 2 раза (β -амирин и олеаноловая кислота), что приемлемо для целей полуколичественного анализа. Естественно, относительные факторы отклика неисследованных нами ПЦТТ и их производных могут выходить за указанные рамки, тем не менее, оценка их содержания в экстрактах на уровне погрешностей в пределах одного порядка представляется вполне реалистичной.

Таблица 23. Относительные факторы отклика девяти ПЦТТ, определенные методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП

	f (БК)	f (ОК)	f (УК)	f (Б)	f (Э)	f (У)	f (Л)	f (β А)	f (α А)
9 (БК)	1,00	0,44	0,75	0,84	0,66	0,77	1,30	1,69	1,06
10 (ОК)	2,46	1,00	1,80	1,99	1,57	1,81	3,02	4,00	2,49
11 (УК)	1,38	0,59	1,00	1,14	0,90	1,03	1,72	2,30	1,43
12 (Б)	1,27	0,53	0,93	1,00	0,83	0,96	1,57	2,08	1,28
15 (Э)	1,55	0,65	1,15	1,29	1,00	1,16	1,97	2,58	1,62
16 (У)	1,35	0,56	0,99	1,11	0,87	1,00	1,67	2,23	1,39
24 (Л)	0,85	0,35	0,61	0,67	0,55	0,62	1,00	1,39	0,84
25 (β А)	0,61	0,25	0,45	0,50	0,40	0,46	0,77	1,00	0,63
26 (α А)	0,99	0,41	0,72	0,79	0,64	0,74	1,21	1,63	1,00

Применение описанного подхода для исследования экстрактов растительного сырья методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП с построением градуировки по бетулину позволило определить содержание двадцати пяти детектируемых соединений (рис. 41–44). Концентрации девяти из них с известными факторами отклика (табл. 23) определены количественно, результаты определения остальных аналитов являются полуколичественными (относительный фактор отклика принят равным 1). Полученные результаты представлены в табл. 24.

Таким образом, разработан универсальный подход для одновременного скрининга и полуколичественного определения ПЦТТ в экстрактах растений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии. Полученные результаты открывают новые перспективы для поиска, идентификации и определения ПЦТТ в растительном сырье.

Таблица 24. Оценочное содержание ПЦТТ и их производных в растительном сырье по результатам анализа методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП (P=0,95; n=3), мг/г

№*	Кора березы	Кожура яблока «Golden Delicious»	Кожура клюквы	Корень солодки
1	-**	-	-	9,3±0,8
2	-	-	-	1,1±0,1
3	-	1,1±0,01	-	-
4	-	0,38±0,02	-	-
5	-	4,3±0,3	0,092±0,006	-
6	-	1,7±0,01	0,60±0,04	-
7	-	-	-	0,29±0,02
8	-	-	0,31±0,02	-
9 (БК)	19±1	0,88±0,05	-	0,2±0,01
10 (ОК)	9,6±0,6	13±1	6,3±0,3	-
11 (УК)	-	49±4	20±1	-
12 (Б)	320±20	-	-	-
13	2,6±0,2	-	-	-
14	1,4±0,1	-	-	-
15 (Э)	4,6±0,3	-	-	-
16 (У)	-	1,1±0,1	-	-
17	-	-	0,90±0,07	-
18	-	-	1,0±0,1	-
19	0,95±0,08	-	-	-
20	1,4±0,1	-	-	-
21	5,3±0,4	-	-	-
22	-	0,85±0,03	-	-
23	-	-	0,48±0,03	-
24 (Л)	7,2±0,4	-	-	-
25 (βА)	-	-	-	-
26 (αА)	-	-	-	-
сумма	370	72	30	11
ПЦТТ				

* - номер соответствует пикам на хроматограммах (рис. 41–44)

** - менее ПО

3.7 Быстрый скрининг ПЦТТ в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ

Альтернативой методам ВЭЖХ-МС/МС для скрининга и даже полуколичественного определения ПЦТТ выступает масс-спектрометрия МАЛДИ, которая отличается исключительной экспрессностью анализа и простотой пробоподготовки. Учитывая наличие интерференций со стороны традиционных для МАЛДИ матриц в низкомолекулярной области спектра, в качестве матрицы нами выбрано углеродное нанопокрывание (толщина ~ 50 нм), позволяющее получать масс-спектры ПЦТТ при незначительной интенсивности матричных пиков. Ионизация ПЦТТ на углероде осуществляется за счет катионирования ионами металлов, при этом наибольшую эффективность в качестве катионирующего агента показали ионы Li^+ , обладающие высокой плотностью заряда.

3.7.1 Характеристика масс-спектров МАЛДИ пентациклических тритерпеноидов

В полученных масс-спектрах ПЦТТ различных классов (рис. 46), кроме карбоновых кислот, наблюдаются интенсивные сигналы ионов $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Наблюдаются также гидратированные ионы с различным количеством молекул воды, в том числе содержащие один или два дополнительных катиона лития, замещающих протоны. Для некоторых соединений (лупеол, α - и β -амирины) пик гидратированного иона $[\text{M}+\text{Li}+\text{H}_2\text{O}]$ является основным в спектре. Явление гидратации характерно для использованного нами масс-спектрометра с ионной ловушкой и связано с ион-молекулярными реакциями с участием следовых количеств влаги, протекающими в ограниченном объеме ловушки в ходе реализации ее рабочего цикла [123]. Минорными компонентами спектров являются также пики дегидратированных ионов $[\text{M}+\text{Li}-\text{H}_2\text{O}]^+$, показывающих, что дегидратация протекает в мягких условиях МАЛДИ аналогично ХИАД. Для тритерпеновых кислот характерно образование ионов $[\text{M}+2\text{Li}-\text{H}]^+$, протонированных молекул $[\text{M}+\text{H}]^+$, а также продуктов их дегидратации в источнике. Наибольшая эффективность ионизации кислот наблюдается в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, при этом в спектрах преобладают пики депротонированных молекул $[\text{M}-\text{H}]^-$.

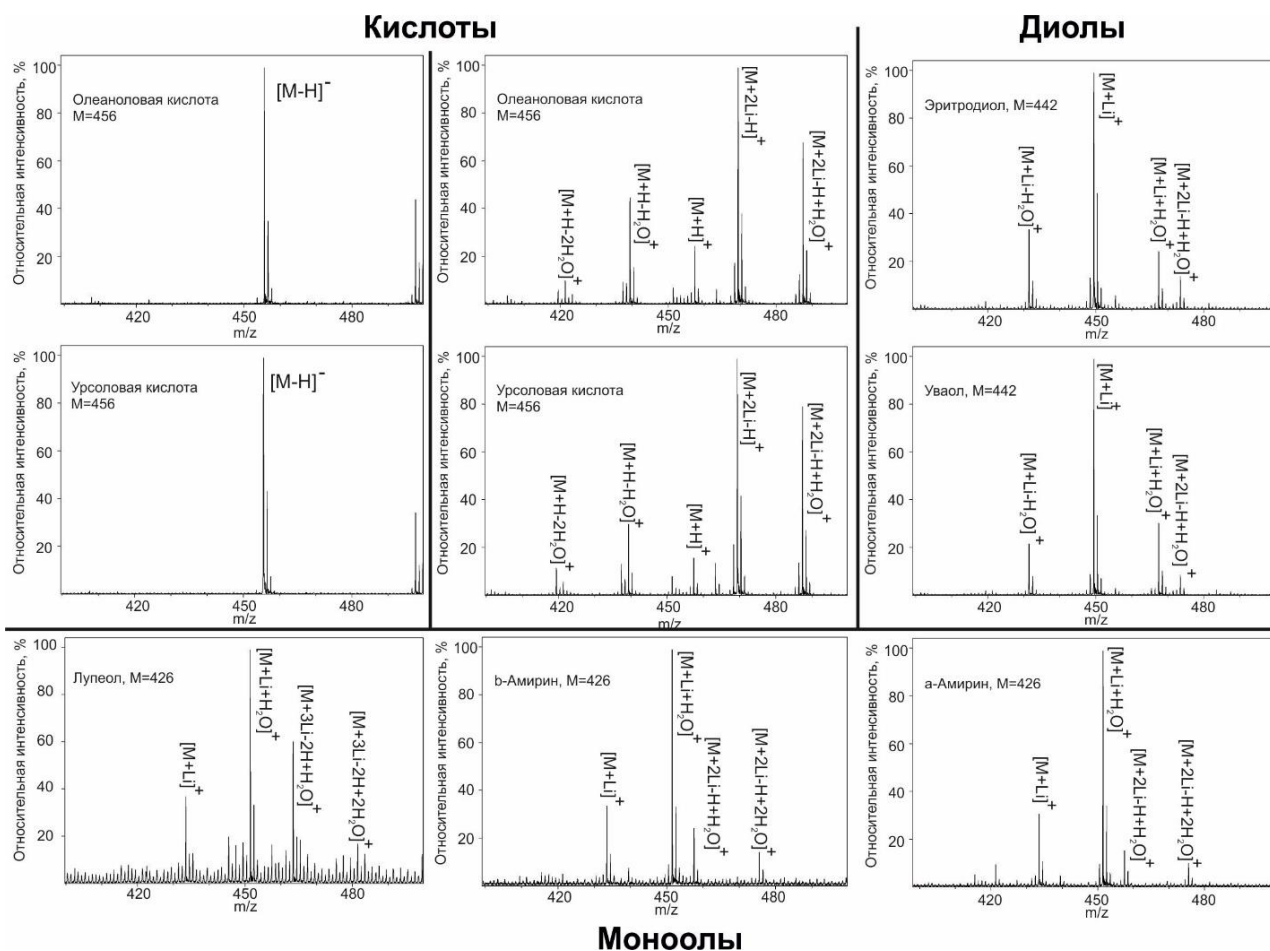


Рисунок 46. Масс-спектры МАЛДИ ПЦТТ (катионирование литием), полученные с использованием углеродного нанопокрyтия

Состав основных ионов в масс-спектрах МАЛДИ исследуемых ПЦТТ и относительные интенсивности соответствующих пиков представлены в табл. 25. Наблюдаемая сложность масс-спектров за счет описанных выше явлений катионирования различным числом ионов щелочного металла, а также гидратации и дегидратации ПЦТТ в источнике ионов, с одной стороны, несколько усложняет интерпретацию масс-спектров, но, с другой стороны, делает их более характеристичными, повышая тем самым надежность идентификации ПЦТТ в реальных экстрактах растений.

Естественно, учитывая наличие в тканях растений значительного количества изомерных ПЦТТ с одинаковой молекулярной массой, МАЛДИ-МС не всегда позволяет дифференцировать отдельные компоненты, но может использоваться для их быстрого группового обнаружения и оценки содержания ПЦТТ отдельных классов.

Таблица 25. Основные ионы в масс-спектрах МАЛДИ ПЦТТ, полученных на углеродном покрытии с применением катионирования литием

Ион	<i>m/z</i> (относительная интенсивность)						
	Олеаноловая кислота	Урсоловая кислота	Эритродиол	Уваол	Лулеол	β-Амирин	α-Амирин
[M-H] ⁻	455 (100)	455 (100)	–	–	–	–	–
[M+H-2H ₂ O] ⁺	419 (6)	419 (11)	–	–	–	–	–
[M+H-H ₂ O] ⁺	439 (45)	439 (30)	–	–	–	–	–
[M+Li-H ₂ O] ⁺	–	–	431 (33)	431 (22)	415 (7)	415 (5)	415 (5)
[M+H] ⁺	457 (24)	457 (16)	–	–	–	–	–
[M+Li] ⁺	–	–	449 (100)	449 (100)	433 (37)	433 (33)	433 (31)
[M+2Li-H] ⁺	469 (100)	469 (100)	–	–	–	–	–
[M+Li+H ₂ O] ⁺	–	–	467 (25)	467 (30)	451 (100)	451 (100)	451 (100)
[M+2Li-H+H ₂ O] ⁺	487 (68)	487 (80)	473 (14)	473 (8)	–	457 (24)	457 (15)
[M+3Li-2H+H ₂ O] ⁺	–	–	–	–	463 (61)	–	–
[M+2Li-H+2H ₂ O] ⁺	–	–	–	–	–	475 (14)	475 (10)
[M+3Li-2H+2H ₂ O] ⁺	–	–	–	–	481 (17)	–	–

3.7.2 Полуколичественное определение ПЦТТ методом МАЛДИ-МС

Масс-спектрометрия МАЛДИ не является методом количественного анализа в силу зависимости интенсивностей сигналов от геометрии частиц образца на поверхности мишени, гомогенности смеси аналитов и матрицы и, как следствие, недостаточной воспроизводимости получаемых масс-спектров. Тем не менее, при использовании усреднения большого числа масс-спектров, полученных с различных точек мишени и тщательном соблюдении условий пробоподготовки МАЛДИ МС может быть применена для полуколичественного определения аналитов в определенном диапазоне их концентраций. Для решения такой задачи применительно к ПЦТТ строили градуировочные зависимости (табл. 26) по высоте наиболее интенсивного пика: для олеаноловой и урсоловой кислот – m/z 455 (–), для диолов (эритродиол и уваол) – m/z 449 (+), для моноолов (лупеол, β -амирин и α -амирин) – m/z 451 (+). Они продемонстрировали удовлетворительную линейность ($R^2 \geq 0,84$) в диапазоне концентраций, охватывающем 1–2 порядка. При этом ориентировочные значения ПО в экстрактах находятся в диапазоне 0,5–100 мг/л (или 0,5–100 нг аналита на мишени), что сопоставимо с рассмотренными ранее подходами к определению ПЦТТ методами ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием и ВЭЖХ-МС в режиме сканирования спектра.

Таблица 26. Градуировочные зависимости ($y=sx$) высот пиков ПЦТТ в масс-спектрах МАЛДИ от концентрации в экстракте, ориентировочные величины ПО и НПОК

Соединение	Линейный диапазон концентраций, мг/л	s	R ²	ПО, мг/л	НПОК, мг/л
Эритродиол, m/z 449 (+)	15-500	17,6	0,974	5	15
Уваол, m/z 449 (+)	18-500	14,6	0,999	5	18
Лупеол, m/z 451 (+)	260-1000	0,52	0,836	80	260
α -Амирин, m/z 451 (+)	290-1000	0,84	0,994	90	290
β -Амирин, m/z 45 (+)	250-1000	0,62	0,992	80	250
Олеаноловая кислота, m/z 455 (–)	3,3-125	14,9	0,897	1	3,3
Урсоловая кислота, m/z 455 (–)	1,9-125	13,5	0,935	0,5	1,9

Для полуколичественного определения групп изомерных ПЦТТ использовали подход, основанный на определении относительных факторов отклика. Внутри каждой группы определенные нами величины факторов отклика оказались близкими к единице (табл. 27), что позволило ограничиться тремя стандартными образцами ПЦТТ для построения градуировок и определения содержания каждого из трех классов аналитов. В качестве таковых были использованы: для тритерпеновых кислот – олеаноловая кислота, для диолов – эритродиол, для моноолов - α -амирин.

Таблица 27. Относительные факторы отклика ПЦТТ в масс-спектрах МАЛДИ

Кислоты (m/z 455 (-))	f (Олеаноловая к-та)	f (Урсоловая к-та)	
Олеаноловая кислота	1,000	1,207	
Урсоловая кислота	0,893	1,000	
Диолы (m/z 449 (+))	f (Эритродиол)	f (Уваол)	
Эритродиол	1,000	0,847	
Уваол	1,201	1,000	
Моноолы (m/z 451 (+))	f (Лупеол)	f (α -Амирин)	f (β -Амирин)
Лупеол	1,000	1,063	1,295
α -Амирин	0,971	1,000	1,255
β -Амирин	0,801	0,847	1,000

3.7.3 Анализ экстрактов растительного сырья

Образцы кожуры яблок двух сортов, ягод клюквы и брусники, выбраны в качестве реальных объектов для апробации разработанного подхода. В качестве метода пробоподготовки использовалась экстракция субкритическим метанолом при 100°C, обеспечивающая количественную и быструю экстракцию аналитов из растительных тканей (разд. 3.1). Масс-спектры МАЛДИ метанольных экстрактов, полученных с использованием углеродного нанопокрyтия и катионирования литием (рис. 47–50), показали присутствие набора тритерпеновых кислот, характерных для исследуемых образцов. С привлечением литературных данных, в исследуемых экстрактах кожуры яблок и ягод предположительно обнаружены следующие ПЦТТ: олеаноловая/урсоловая кислоты (m/z 455), маслиновая/корозоловая кислоты (m/z 471), а также аннурковая кислота (m/z 485).

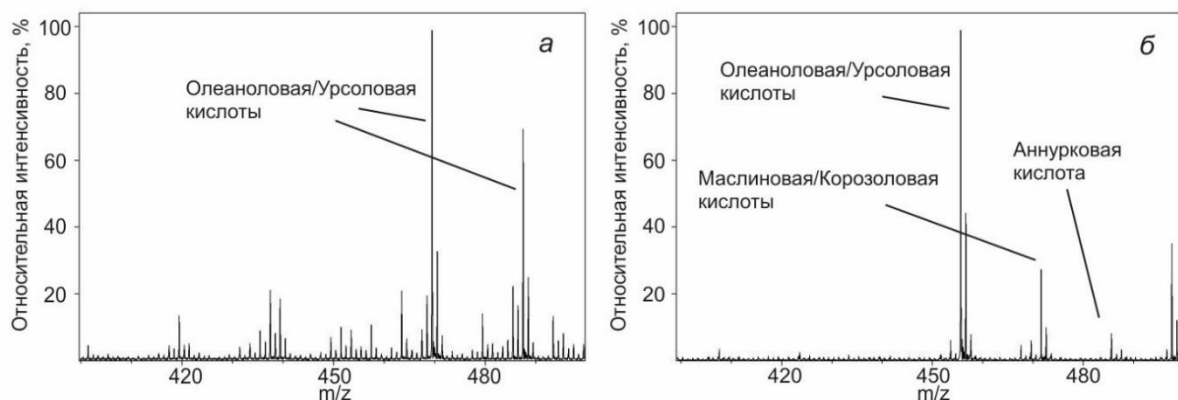


Рисунок 47. Масс-спектры МАЛДИ субкритического метанольного экстракта кожуры яблока «*Golden Delicious*» в режимах регистрации положительных (а) и отрицательных (б) ионов

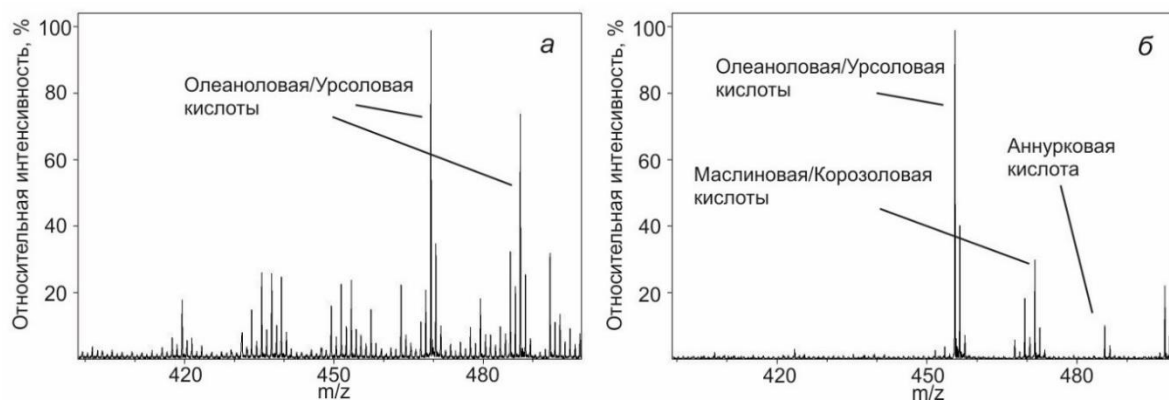


Рисунок 48. Масс-спектры МАЛДИ субкритического метанольного экстракта кожуры яблока «*Red Delicious*» в режимах регистрации положительных (а) и отрицательных (б) ионов

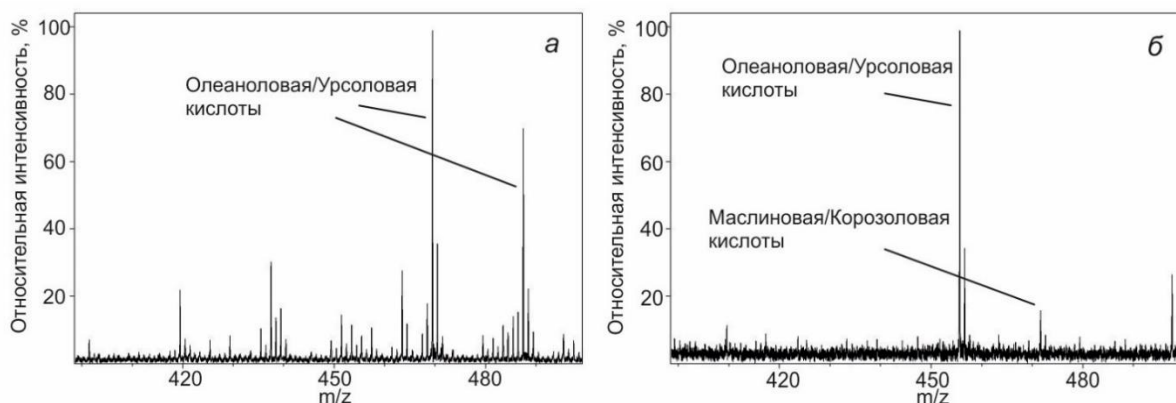


Рисунок 49. Масс-спектры МАЛДИ субкритического метанольного экстракта кожуры клюквы в режимах регистрации положительных (а) и отрицательных (б)

ионов

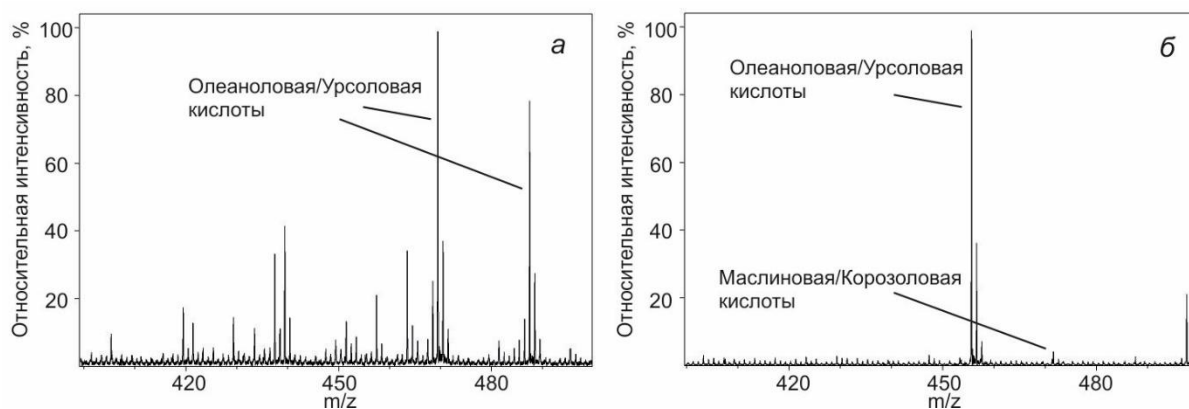


Рисунок 50. Масс-спектры МАЛДИ субкритического метанольного экстракта кожуры брусники в режимах регистрации положительных (а) и отрицательных (б) ионов

Результаты полуколичественной оценки содержания данных соединений в растительном сырье на основе определенных нами относительных факторов отклика для отдельных классов ПЦТТ, представлены в табл. 28.

Таблица 28. Ориентировочное содержание ПЦТТ в растительном сырье по данным МАЛДИ-МС ($P=0,95$; $n=5$), мг/г

Соединение	Кожура яблока «Golden Delicious»	Кожура яблока «Red Delicious»	Кожура клюквы	Кожура брусники
Диолы, m/z 449 (+)	-*	-	-	-
Моноолы, m/z 451 (+)	-	-	-	-
Кислоты, m/z 455 (-)	8,2±1,7	3,8±2,4	1,7±0,9	2,8±1,3
Маслиновая/корозоловая кислоты, m/z 471 (-)	2,1±0,9	1,0±0,6	0,21±0,10	0,10±0,06
Аннурковая кислота, m/z 485 (-)	0,54±0,29	0,35±0,19	-	-
Примечание: * - менее ПО				

Ориентировочное содержание тритерпеновых кислот в исследованном растительном сырье составляет от 1,7 до 8,2 мг/г, что хорошо соответствует величинам, определенным нами с использованием методов ВЭЖХ-МС/МС в режимах МЗР и СИП. При этом следует отметить, что продолжительность анализа

одного образца методом МАЛДИ-МС не превышает 1–2 мин. Дополнительные затраты времени на подготовку проб к исследованию методом МАЛДИ-МС (нанесение на мишень, высушивание, вакуумирование ионного источника) компенсируются возможностью исследования сотен образцов на одной мишени.

ВЫВОДЫ

На основе полученных результатов исследования можно сформулировать следующие выводы:

1. Жидкостная экстракция под давлением является наиболее экспрессным и эффективным методом извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья. Применение метанола в качестве экстрагента при температуре 100°C и времени экстракции 20 мин обеспечивает существенное увеличение эффективности экстракции по сравнению с экстракцией по Сокслету и позволяет количественно извлекать ПЦТТ из биомассы растений с минимальными затратами времени и растворителя.

2. Предложен способ определения десяти ПЦТТ различных классов в экстрактах растений, основанный на сочетании обращенно-фазовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в режиме химической ионизации при атмосферном давлении. Применение градиентного элюирования при продолжительности анализа 20 мин. позволило обеспечить удовлетворительное разделение большинства аналитов и достичь пределов обнаружения на уровне 3–13 мкг/л.

3. Использование неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания, включающим гидрофобные, гидрофильные и ионообменные взаимодействия, позволяет в широких пределах регулировать селективность анализа и проводить быстрое хроматографическое разделение сложных смесей ПЦТТ различных классов в изократическом режиме элюирования. На основе сочетания ВЭЖХ на неподвижной фазе со смешанным механизмом удерживания с тандемным масс-спектрометрическим детектированием разработана и валидирована методика определения десяти ПЦТТ в экстрактах растений с временем анализа 7 мин и пределами обнаружения 3–12 мкг/л (44 мкг/л для фриделина).

4. Разработан подход для одновременного скрининга и полуколичественного определения ПЦТТ в экстрактах растений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии в режиме сканирования ионов-предшественников, характеризующийся пределами обнаружения аналитов в диапазоне 0,09-0,18 мг/л.

5. Разработан подход к быстрому групповому скринингу и полуколичественному определению ПЦТТ в экстрактах растений методом масс-спектрометрии МАЛДИ с использованием углеродных матриц и катионирования аналитов ионами лития. При продолжительности анализа не более 1–2 мин, подход обеспечивает ориентировочные пределы обнаружения аналитов на уровне 0,5-100 мг/л.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zhang, S. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel highperformance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity [Text] / S. Zhang, Y. Sun, Z. Sun, X. Wang, J. You, Y. Suo // *Food Chem.* – 2014. – Vol. 146. – P. 264–269.
2. Krasutsky, P.A. Birch bark research and development [Text] / P.A. Krasutsky // *Nat. Prod. Rep.* – 2006. – Vol. 23. – P. 919–942.
3. Wang, C.M. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstoniascholaris* [Text] / C.M. Wang, H.T. Chen, Z.Y. Wu, Y.L. Jhan, C.L. Shyu, C.H. Chou // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21. – P. 139–149.
4. Tolstikova, T.G. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives [Text] / T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, A.G. Tolstikov, O.B. Flekhter // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* – 2006. – Vol. 32, N 1. – P. 37-49.
5. Cichewicz, R.H. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection [Text] / R.H. Cichewicz, S.A. Kouzi // *Med. Res. Rev.* – 2004. – Vol. 24. – P. 90–114.
6. Salvador, J.A. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs [Text] / J.A. Salvador, V.M. Moreira, B.M. Goncalves, A.S. Leal, Y. Jing // *Nat. Prod. Rep.* – 2012. – Vol. 29. – P. 1463–1479.
7. Беянин, М.Л. Биологически активные вещества природного происхождения: учебное пособие [Текст] / М.Л. Беянин – Томск: Изд-во ТПУ. – 2010. – 144 с.
8. Wheeler, J. Die Darstellung des Betulin durch Sublimation [Text] / J. Wheeler // *Pharm. J.* – 1899. – N 1. – P. 494–497.
9. Euler, H.V. New observations of fat-soluble growth factors [Text] / H.V. Euler // *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi.* – 1925. – Vol.9, N 25. – P. 6–9.
10. Ryu, S.Y. Antitumor triterpenes from medicinal plants [Text] / S.Y. Ryu, S.U. Choi, S.H. Lee, C.O. Lee, Z. No, J.W. Ahn // *Arch. Pharm. Res.* – 1994. – Vol. 17, N 5. – P. 375–377.

11. Kim, D.S.H.L. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma [Text] / D.S.H.L. Kim, J.M. Pezzuto, E. Pisha // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1998. – Vol. 8, N 13. – P. 1707–1712.
12. Zuco, V. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells [Text] / V. Zuco, R. Supino, S.C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli // *Cancer Lett.* – 2002. – Vol 175, N 1. – P. 17–25.
13. Baglin, I. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents [Text] / I. Baglin, A.C. Mitaine-Offer, M. Nour, K. Tan, C. Cavé, M.A. Lacaille-Dubois // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 3, N 6. – P. 525–539.
14. Baglin, I. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents [Text] / I. Baglin, A. Poumaroux, M. Nour, K. Tan, A.C. Mitaine-Offer, M.A. Lacaille-Dubois, B. Chauffert, C. Cavé // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 18, N 2, – P. 111–117.
15. Fujioka, T. Kilkuskie R. Anti-AIDS Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzygium claviflorum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids [Text] / T. Fujioka, Kashiwada Y. // *J. Nat. Prod.* – 1994. – Vol. 57, N 2. – P. 243–247.
16. Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid [Text] / J. Liu // *J. Ethnopharmacol.* – 1995. – Vol. 49, N 2. – P. 57–68.
17. Alakurtti, S. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin [Text] / S. Alakurtti, T. Mäkelä, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2006. – Vol. 29, N 1. – P. 1–13.
18. Banno, N. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri* [Text] / N. Banno, T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Tokuda, K. Tabata, Y. Nakamura, R. Nishimura, Y. Kimura, T. Suzuki // *J. Ethnopharmacol.* – 2006. – Vol 107, N 2. – P. 249–253.
19. Safayhi, H. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes [Text] / H. Safayhi, E.-R. Sailer // *Planta Med.* – 1997. – Vol 63, N 6. – P 487–493.
20. Herrera, M.D. Functional properties of pentacyclic triterpenes contained in "orujo" olive oil [Text] / M.D. Herrera, R. Rodríguez-Rodríguez, V. Ruiz-Gutiérrez // *Curr. Nutr. Food Sci.* – 2006. – Vol 2, N 1. – P. 45–49.

21. Vasconcelos, M.A.L. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae) [Text] / M.A.L. Vasconcelos, V.A. Royo, D.S. Ferreira, A.E. Miller Crotti, M.L. Andrade E Silva, J.C.T. Carvalho, J.K. Bastos, W.R. Cunha // *Z. Naturforsch. C.* – 2006. – Vol 61, N 7-8, – P. 477–482.
22. Scalon Cunha, L.C. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens [Text] / L.C. Scalon Cunha, M.L. Andrade E Silva, N.A.J. Cardoso Furtado, A.H.C. Vinhólis, C.H. Gomes Martins, A.A. Da Silva Filho, W.R.Cunha // *Z. Naturforsch. C.* – 2007. – Vol. 62, N 9-10. – P. 668–672.
23. Rodriguez-Rodriguez, R. Functional Properties of Pentacyclic Triterpenes Contained in Pomace Olive Oil [Text] / R. Rodriguez-Rodriguez, V. Ruiz-Gutierrez // *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention.* – 2010. – P. 1431–1438.
24. Kuznetsova, S.A. Extraction of betulin from birch bark and study of its physico-chemical and pharmacological properties [Text] / S.A. Kuznetsova, G.P. Skvortsova, I.N. Maliar, E.S. Skurydina, O.F. Veselova // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2014. – Vol. 40, N 7. – P. 742–747.
25. Lowitz, J.T. Über eine neue, fast benzoeartige substanz der briken [Text] / J.T. Lowitz // *Chem. Ann.* – 1788. – Vol. 2. – P. 312–317.
26. Felfoldi-Gávaa, A. Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn [Text] / A. Felfoldi-Gava, S. Szarka, B. Simándi, B. Blazics, B. Simon, A. Kery // *J. Supercrit. Fluids.* – 2012. – Vol. 61. – P. 55–61.
27. Bikovens, O. Chemical composition of lipophilic extractives from grey alder (*Alnus incana*) [Text] / O. Bikovens, L. Roze, A. Pranovich, M. Reunanen, G. Telysheva // *Bioresources.* – 2013. – Vol 8, N 1. – P. 350–357.
28. Malinovskay, G.V. Triterpenoids from the leaves of far eastern species of the shrubby birches *Betula ovalifolia* and *B. middendorffii* [Text] / G.V. Malinovskaya, N.D. Pokhilo, V.V. Makhan'kov, V.L. Novikov, N.I. Uvarova // *Chem. Nat. Compd.* – 1982. – Vol. 17, N 3.– P. 249–253.
29. Pokhilo, N.D. Triterpenoids from the leaves of the siberian species of birch *Betula nana* and *B. exilis* [Text] / N.D. Pokhilo, G.V. Malinovskaya, V.V. Makhan'kov, V.A. Denisenko, N.I. Uvarova // *Chem. Nat. Compd.* – 1985. – Vol. 21, N 3. – P. 328–332.

30. Pokhilo, N.D. Triterpenoids of the leaves of *Betula pendula* from different growth sites [Text] / N.D. Pokhilo, V.A. Denisenko, V.V. Makhan'kov, N.I. Uvarova // Chem. Nat. Compd. – 1986. – Vol 22, N 2. – P. 166–171.
31. O'Connell, M.M. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches [Text] / M.M. O'Connell, M.D. Bentley, C.S. Campbell, B.J.W. Cole // Phytochem. – 1988. – Vol 27, N 7. – P. 2175–2176.
32. Cole, B.J.W. Triterpenoid Constituents in The Outer Bark of *Betula Alleghaniensis* (Yellow Birch) [Text] / B.J.W. Cole, M.D. Bentley, Y. Hua, L. Bu // J. Wood Chem. Technol. – 1991. – Vol. 11, N 2. – P. 209–223.
33. Dehelean, C.A. Characterization of birch tree leaves, buds and bark dry extracts with antitumor activity [Text] / C.A. Dehelean, S. Cîntă Pînzaru, C.I. Peev, C. Soica, D.S. Antal // J. Optoelectron. Adv. M. – 2007. – Vol. 9, N 3. – P. 783–787.
34. Kolomitsyn, I.V. Analysis and antiproliferative activity of bark extractives of *Betula neoalaskana* and *B. papyrifera*. Synthesis of the most active extractive component - Betulin 3-caffeate [Text] / I.V. Kolomitsyn, J. Holy, E. Perkins, P.A. Krasutsky // Nat. Prod. Commun. – 2007. – Vol 2, N 1. – P. 17–26.
35. Sharma, P.P. Pentacyclic triterpinoids from *betula utilis* and *hyptis suaveolens* [Text] / P.P. Sharma, R.K. Roy, Anurag, D. Gupta // Int. J. Chemtech. Res. – 2010. – Vol. 2, N 2. – P. 1558–1532.
36. Zhu, M. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum* [Text] / M. Zhu, Q. Chang, L.K. Wong, F.S. Chong, R.C. Li // Phytother. Res. – 1999. – Vol. 13, N 6. – P. 529–531.
37. Chandramu, C. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. [Text] / C. Chandramu, R.D. Manohar, D.G.L. Krupadanam, R.V. Dashavantha // Phytother. Res. – 2003. – Vol. 17, N 2. – P. 129–134.
38. Neto, C.C. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases [Text] / C.C. Neto // Mol. Nutr. Food Res. – 2007. – Vol. 51, N 6. – P. 652–664.
39. Jager, S. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts [Text] / S. Jager, H. Trojan, T. Kopp, M.N. Laszczyk, A. Scheffler. // Molecules. – 2009. – Vol. 14. – P. 2016–2031.

40. Smith, R.M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques [Text] / R.M. Smith // *J Chromatogr A*. – 2003. – Vol. 1000, N 1-2. – P. 3–27.
41. Janicsak, G. Gas Chromatographic Method for Routine Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Medicinal Plants [Text] / G. Janicsak, K. Veres, M. Kallai, I. Mathe // *Chromatographia*. – 2003. – Vol. 58, N 5. – P. 295–299.
42. Селянина, Л.И. Выделение бетулина из отходов переработки березы экстракцией спиртом [Текст] / Л.И. Селянина // *Лесной журнал*. – 2004. – №4. – С.93–97.
43. Левданский, В.А. Влияние природы органического растворителя на экстракционное выделение бетулина из коры березы [Текст] / В.А. Левданский, Б. Н. Кузнецов, И.В. Королбкова, Н.М. Иванченко, А.В. Левданский, // *Журнал СФУ*. – 2012. – №5. – С.302–310.
44. De Vasconcelos, E.C. Comparison of extraction and clean-up methods for the analysis of friedelan-3-ol and friedelin from leaves of *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae) [Text] / E.C. De Vasconcelos, J.H.Y. Vilegas, F.M. Lanças // *Phytochem. Anal.* – 2000. – Vol. 11, N 4. – P. 247–250.
45. Dubey, K.K. Evaluation and optimization of downstream process parameters for extraction of betulinic acid from the bark of *Ziziphus jujubae* L. [Text] / K.K. Dubey, N. Goel // *Sci. World J.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–9.
46. Fu, Q. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers [Text] / Q. Fu, L. Zhang, N. Cheng, M. Jia, Y. Zhang // *Food Bioprod. Process.* – 2014. – Vol. 92, N 3. – P. 321–327
47. Baranauskaite, J. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum* and *Origanum vulgare* L.). [Text] / J. Baranauskaite, V. Jakštas, L. Ivanauskas, D.M. Kopustinskiene, G. Drakšiene, R. Masteikova, J. Bernatoniene // *Nat. Prod. Res.* – 2016. – Vol. 30, N 6. – P. 672–674.
48. Wójciak-Kosior, M. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos* [Text] / M. Wójciak-Kosior, I. Sowa, R. Kocjan, R. Nowak // *Ind. Crops. Prod.* – 2013. – Vol. 44. – P. 373–377.

49. Luque de Castro, M.D. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future [Text] / M.D. Luque de Castro, L.E. García-Ayuso // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – Vol. 369, N 1–2. P. 1–10.
50. Mason, T.J. Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis [Text] / T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, // *Ultrason. Sonochem.* – 1996. – Vol. 3, N 3. – P. 253–260.
51. Chemat, F. Handbook of Food Analysis Instruments [Text] / F. Chemat, V. Tomao, M. Viot, ed. S. Otles – Boca Raton: CRC Press. – 2008. – P. 85–94.
52. Schinor, E.C. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp [Text] / E.C. Schinor, M.J. Salvador, I.C.C. Turatti, O.L.A.D. Zucchi, D.A. Dias // *Ultrason. Sonochem.* – 2004. – Vol. 11, N 6.– P. 415–421.
53. Lavoie, J.-M. Selective ultrasound-assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B. papyrifera* wood at low temperatures [Text] / J.-M. Lavoie, T. Stevanovic // *Phytochem. Anal.* – 2007. – Vol. 18, N 4.– P. 291–299.
54. Xia, E.-Q. Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait [Text] / E.-Q. Xia, Y.-Y. Yu, X.-R. Xu, G.-F. Deng, Y.-J. Guo, H.-B. Li // *Ultrason. Sonochem.* – 2012. – Vol. 19, N 4. – P. 772–776.
55. Yang, Y.-C. Optimisation of an ultrasound-assisted extraction followed by RP-HPLC separation for the simultaneous determination of oleanolic acid, ursolic acid and oridonin content in *Rabdosia rubescens* [Text] / Y.-C. Yang, M.-C. Wei, T.-C. Huang // *Phytochem. Anal.* – 2012. – Vol. 23, N 6.– P. 627–636.
56. Wang, S. Analysis of three types of triterpenoids in tetraploid white birches (*Betula platyphylla* Suk.) and selection of plus trees [Text] / S. Wang, H. Zhao, J. Jiang, G. Liu, C. Yang // *J. For. Res.* – 2015. – Vol. 26, N 3.– P. 623–633.
57. Alupului, A. Microwave extraction of active principles from medicinal plants [Text] / A. Alupului // *U.P.B. Sci. Bull., Series B.* – 2012. – Vol. 74, N 2. – P. 129–142.
58. Bai, X. Optimization of microwave-assisted extraction of antihepatotoxic triterpenoid from *actinidia deliciosa* root and its comparison with conventional extraction methods [Text] / X. Bai, A. Qiu, J. Guan // *Microwave-Assisted Extractions of Triterpenoids, Food Technol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 45 N 2. – P. 174–180.

59. Sánchez-Ávila, N. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction [Text] / N. Sánchez-Ávila, F. Priego-Capote, J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro // *Talanta*. – 2009. – Vol. 78, N 1.– P. 40–48.
60. Fang, X. Optimization of microwave-assisted extraction followed by RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of *Chaenomeles sinensis* [Text] / X. Fang, J. Wang, X. Yu, G. Zhang, J. Zhao // *J. Sep. Sci.* – 2010. – Vol. 33, N 8.– P. 1147-1155.
61. Xia, E.-Q. Microwave-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* ait [Text] / Xia, E.-Q. Wang, B.-W. Xu, X.-R. Zhu, L. Song, Y. Li, H.-B. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12, N 8.– P. 5319–5329.
62. Ferreira, R. Microwave-assisted extraction of betulin from birch outer bark [Text] / R. Ferreira, H. Garcia, A.F. Sousa, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, W. Kunz, L.P.N. Rebelo, C. Silva Pereira // *RSC Adv.* – 2013. – Vol. 3, N 44. – P. 21285–21288.
63. Zougagh, M. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. [Text] / M. Zougagh, M. Valcárcel, A. Ríos // *Trends Anal. Chem.* – 2004. – Vol. 23, N 5. – P. 399–405.
64. Ndiomu, D.P. Some applications of supercritical fluid extraction [Text] / Ndiomu, D.P. Simpson, C.F. *Anal. Chim. Acta.* – 1988. – Vol. 213. – P. 237–243.
65. Ibañez, E. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. *Marine Bioactive Compounds* [Text] / E. Ibañez, M. Herrero, J.A. Mendiola Castro- M. Puyana – Madrid: Bioactivity and Food Analysis Department, Institute of Food Science Research (CIAL-CSIC). – 2012. –P. 55–98.
66. Kristó, T.S Production and characterisation of *Taraxacum officinale* extracts prepared by supercritical fluid and solvent extractions [Text] / T.S Kristó, É. Szoke, Á. Kéry, P.P. Terdy, L.K. Selmeczi, B. Simándi // *Acta Hortic.* – 2004. – Vol. 597.– P. 57–61.
67. Song, S.-H. Extraction of triterpenoids from fruits of *Ganoderma lucidum* by supercritical fluid extraction [Text] / S.-H. Song, X.-B. Jia, Y. Chen, B. Chen, L.-J. Wang, C.-L.Zhao // *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* – 2008. – Vol. 33, N 17.– P. 2104–2107.

68. Domingues, R.M.A. Supercritical fluid extraction of *Eucalyptus globulus* bark- A promising approach for triterpenoid production [Text] / R.M.A. Domingues, E.L.G. Oliveira, C.S.R. Freire, R.M. Couto, P.C. Simões, C.P. Neto, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, N 6.– P. 7648–7662.
69. Alonso-Salces, R.M. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple [Text] / R.M. Alonso-Salces, E. Korta, A. Barranco, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – Vol. 933, N 1-2.– P. 37–43.
70. Denery, J.R. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum* [Text] / J.R. Denery, K. Dragull, C.S. Tang, Q.X. Li // *Anal. Chim. Acta.* – Vol. 501, N 2. – 2004. – P. 175–181.
71. Chen, X.J. Simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [Text] / X.J. Chen, B.L. Guo, S.P. Li, Q.W. Zhang, P.F. Tu, Y.T. Wang // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – Vol. 1163. – P. 96–104.
72. Mustafa, A. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review [Text] / Mustafa, A. Turner, C. // *Anal. Chim. Acta.* – Vol. 703, N 1. – 2011. – P. 8-18
73. Luthria, D.L. Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor [Text] / D.L. Luthria // *J. Funct. Foods.* – 2012. – Vol. 4. – P. 842–850.
74. Co, M. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark [Text] / M. Co, P. Koskela, P. Eklund-Akergren, K. Srinivas, J.W. King, J.R. Sjoberg, C. Turner // *Green Chem.* – 2009. – Vol. 11. – P. 668–674.
75. Pérez-Camino, M.C. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils [Text] / M.C. Pérez-Camino, A. J. Cert // *Agric. Food Chem.* – 1999. – Vol. 47, N 4. – P. 1558–1562.
76. Galgon, T. Identification and Quantification of Betulinic Acid [Text] / T. Galgon, D. Hoke, B. Drager // *Phytochem. Anal.* – 1999. – Vol. 10. – P. 187–190.
77. Janicsák, G. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae [Text] / G. Janicsák, K. Veres, A. Zoltán Kakasy, I. Máthé // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2006. – Vol. 34, N 5. – P. 392–396.

78. Sanchez Avila, N. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves [Text] / N. Sanchez Avila, F. Priego Capote, M.D. Luque de Castro // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1165. – P. 158–165.

79. Caligiani, A. A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients [Text] / A. Caligiani, G. Malavasi, G. Palla, A. Marseglia, M. Tognolini, R. Bruni // Food Chem. – 2013. – Vol. 136, N 2. – P. 735–741.

80. Szakiel, A. Comparison of the Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland [Text] / A. Szakiel, C. Pączkowski, H. Koivuniemi, S. Huttunen // J. Agric. Food Chem. – 2012. – Vol. 60, N 19. – P. 4994–5002.

81. Szakiel, A. Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Bilberry *Vaccinium myrtillus* from Finland and Poland [Text] / A. Szakiel, C. Pączkowski, S. Huttunen // J. Agric. Food Chem. – 2012. – Vol. 60, N 48. – P. 11839–11849.

82. Zhao, G. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC [Text] / G. Zhao, W. Yan, D. Cao // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 43. – P. 959–962.

83. Kshirsagar, P.R. Quantitative determination of three pentacyclic triterpenes from five *Swertia* L. species endemic to Western Ghats, India, using RP-HPLC analysis [Text] / P.R. Kshirsagar, S.R. Pai, M.S. Nimbalkar, N.B. Gaikwad // Nat. Prod. Res. – 2015. – Vol. 29. – P. 1783–1788.

84. Strzemeski, M. *Carlina* species as a new source of bioactive pentacyclic triterpenes [Text] / M. Strzemeski, M. Wójciak-Kosior, I. Sowa, E. Rutkowska, W. Szwer, R. Kocjan, M. Latalski // Ind. Crop. Prod. – 2016. – Vol. 94. – P. 498–504.

85. Chanda, J. RP-HPLC simultaneous estimation of betulinic acid and ursolic acid in *Carissa spinarum* [Text] / J. Chanda, P. K. Mukherjee, R. Harwansh, S. Bhadra, S. K. Chaudhary, S. Choudhury // Nat. Prod. Res. 2014. 28(21), 1926–1928.

86. Oliveira, B.H. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC [Text] / B.H. Oliveira, C.A.M. Santos, A.P.D.M. Espindola // Phytochem. Anal. – 2002. – Vol. 13. – P. 95–98.

87. Maji, A.K. Validated RP-HPLC-UV method for the determination of betulin in *Asteracanthalongifolia* (L.) Nees. extract [Text] / A.K. Maji, N. Maity, P. Banerji, D. Banerjee // *Int. J. Phytomed.* – 2013. – Vol. 5. – P. 131–135.
88. Maji, A.K. A validated RP-HPLC method for simultaneous determination of betulin, lupeol and stigmasterol in *asteracantha longifolia nees* [Text] / A.K. Maji, S. Pandit, P. Banerji, D. Banerjee // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 6, N 5. – P. 691–695.
89. Martelanc, M. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection [Text] / M. Martelanc, I. Vovk, B. Simonovska // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – Vol. 1164, N 1-2. – P. 145–152.
90. Li, Y.K. Study on Determination of Triterpenoids in *Chaenomeles* by High Performance Liquid Chromatography and Sample Preparation with Matrix Solid Phase Dispersion [Text] / Y.K. Li, P. Fan, Y.R. Xu, Y. Huang, Q.F. Hu // *J. Chin. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 55. – P. 1332–1337.
91. Yang, G.Y. Study on Determination of Pentacyclic Triterpenoids in *Chaenomeles* by HPLC-ELSD [Text] / G.Y. Yang, W.B. Fen, C. Lei, W.L. Xiao, H.D. Sun // *J. Chromatogr. Sci.* – 2009. – Vol. 47. – P. 718–722.
92. Guo, S. Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of *Ziziphus* Species by HPLC-ELSD-MS [Text] / S. Guo, J.-A. Duan, Y.-P. Tang, N.-Y. Yang, D.-W. Qian, S.-L. Su, E.-X. Shang, // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – Vol. 58, N 10. – P. 6285–6289.
93. Wu, H. Simultaneous determination of six triterpenic acids in some Chinesemedicinal herbs using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [Text] / H. Wu, G. Li, S. Liu, D. Liu, G. Chen, N. Hu, Y. Suo, J. You // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – Vol. 107. – P. 98–107.
94. Carretero, A.S. A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* [Text] / A.S. Carretero, A. Carrasco-Pancorbo, S. Cortacero, A. Gori, L. Cerretani, A. Fernández-Gutiérrez // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 110, N 12. – P. 1142–1149.
95. Zhao, L. Simultaneous Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Rat Plasma by HPLC–MS: Application to a Pharmacokinetic Study After Oral Administration

of Different Combinations of QingGanSanJie Decoction Extracts [Text] / L. Zhao, W. Li, Y. Li, H. Xu, L. Lv, X. Wang, G. Zhang // *J. Chromatogr. Sci.* – 2015. – Vol. 53, N 7. – P. 1185–1192.

96. Mullally, M. Characterization and Quantification of Triterpenes in the Neotropical Medicinal Plant *Souroubea sympetala* (Marcgraviaceae) by HPLC-APCI-MS [Text] / M. K. Mullally, Kramp, A. Saleem, M.O. Rojas, P.S. Vindas, M. Garcia, J.T. Arnason // *Nat. Prod. Commun.* – 2008. – Vol. 3, N 11. – P. 1885–1888.

97. Liu, R. A Selective Ion HPLC-APCI-MS Method for the Quantification of Pentacyclic Triterpenes in an Anxiolytic Botanical Dietary Supplement for the Animal Health Market [Text] / R. Liu, A.-F. Carballo-Arce, R. Singh, A. Saleem, M. Rocha, Mullally, M. J. Arnason // *Nat. Prod. Commun.* – 2019. – Vol. 14, N1. – P. 11–14.

98. Zhang, Y.Y. Simultaneous determination of seven major triterpenoids in *Pyroladecorata* H. Andres by LC-MS method [Text] / Y.Y. Zhang, C. Zhang, R. Ren, R. Liu // *Pharmazie.* – 2012. – Vol. 67. – P. 822–826.

99. Chen, G. A sensitive and efficient method for simultaneous trace detection and identification of triterpene acids and its application to pharmacokinetic study [Text] / G. Chen, J. Li, C. Song, Y. Suo, J. You // *Talanta.* – 2012. – Vol. 98. – P. 101–111.

100. Rhourri-Frih, B. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI [Text] / B. Rhourri-Frih, P. Chaimbault, B. Claude, C. Lamy, P. Andre, M. Lafosse // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – Vol. 44. – P. 71–80.

101. Moldoveanu, S.C. Analysis of four pentacyclic triterpenoid acids in several bioactive botanicals with gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection [Text] / S.C. Moldoveanu, W.A. Scott // *J. Sep. Sci.* – 2015. – Vol. 39, N 2. – P. 324–332.

102. Shen, D. A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from *Mentha* spp [Text] / D. Shen, M.-H. Pan, Q.-L. Wu, C.-H. Park, H.R. Juliani, C.-T. Ho, J.E. Simon // *J. Food Sci.* – 2011. – Vol. 76, N 6. – P. 900–908.

103. Xia, Y. Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study [Text] / Y. Xia, G. Wei, D. Si, C. Liu // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – P. 879, N 2. – P. 219–224.

104. Gobo, L.A. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of

triterpenoids in medicinal plant extracts [Text] / L.A. Gobo, C. Viana, O.A. Lameira, L.M. de Carvalho // *J. Mass Spectrom.* –2016. – Vol. 51. – P. 558–565.

105. Mo, S. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry [Text] / S. Mo, L. Dong, W.J. Hurst, R.B. van Breemen // *Lipids.* – 2013. – Vol. 48, N 9. – P. 949–956.

106. Li, Z.H. Simultaneous determination of five triterpene acids in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study after oral administration of *Folium Eriobotryae* effective fraction [Text] / Z.H. Li, H. Zhu, X.P.Cai, D.D., He, J.L. Hua, J.M. Ju, H. Lv, L. Ma, W.L. Li // *Biomed. Chromatogr.* – 2015. – Vol. 29. – P. 1791–1797.

107. Pai, S.R. Determination of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid from *Achyranthes aspera* L. using RP-UFLC-DAD analysis and evaluation of various parameters for their optimum yield [Text] / S.R. Pai, V. Upadhya, H.V. Hegde, R.K. Joshi, S.D. Kholkute // *Indian. J. Exp. Biol.* – 2016. – Vol. 54. – P. 196–202.

108. Gimenez, E. Pentacyclic triterpene in *Olea europaea* L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry [Text] / E. Gimenez, M.E. Juan, S. Calvo-Melia, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, J.M. Planas // *J. Chromatogr. A.* – 2015. – Vol. 1410. – P. 68–75.

109. Gimenez, E. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination in plasma of pentacyclic triterpenes of *Olea europaea* L. [Text] / E. Gimenez, M.E. Juan, S. Calvo-Melia, J.M. Planas // *Food Chem.* – 2017. – Vol. 229. – P. 534–541.

110. Jaworska, K. Simultaneous analysis of steviol and steviol glycosides by liquid chromatography with ultraviolet detection on a mixed-mode column: application to *Stevia* plant material and *Stevia*-containing dietary supplements [Text] / K. Jaworska, A.J. Krynitsky, J.I. Rader // *J. AOAC Int.* – 2012. – Vol. 95. – P. 1588–1596.

111. Hao, C. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column [Text] / C. Hao, D. Morse, F. Morra, X. Zhao, P. Yang, B. Nunn // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – Vol. 1218. – P. 5638–5643.

112. Bichon, E. [Text] / E. Bichon, A. Béasse, S. Prevost, S. Christien, F. Courant, F. Monteau, B. Le Bizec // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 26, N 7. P. 819–827.
113. Gao, W. Targeted profiling and relative quantification of benzoyl diterpene alkaloids in *Aconitum* roots by using LC-MS/MS with precursor ion scan [Text] / W. Gao, X.G. Liu, L. Liu, P. Li, H. Yang // *J. Sep. Sci.* – 2018. – Vol. 41, N 18. – P. 3515–3526
114. Zumbuhl, S. A Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization Study of Light-Induced Aging in Triterpene Dammar and Mastic Varnishes [Text] / S. Zumbuhl, R. Knochenmuss, S. Wulfert, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70, N 4. – P. 707–715.
115. Dietemann, P. Artificial photoaging of triterpenes studied by graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [Text] / P. Dietemann, M.J. Edelmann, C. Meisterhans, C. Pfeiffer, S. Zumbühl, R. Knochenmuss, R. Zenobi // *Helv. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 83, N 8. – P. 1766–1777.
116. Scalarone, D. MALDI-TOF mass spectrometry on cellulosic surfaces of fresh and photo-aged di- and triterpenoid varnish resins [Text] / D. Scalarone, M.C. Duursma, J.J. Boon, O. Chiantore // *J. Mass Spectrom.* – 2005. – Vol. 40, N 12. – P. 1527–1535.
117. Vahur, S. Analysis of dammar resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS [Text] / S. Vahur, A. Teearu, T. Haljasorg, P. Burk, I. Leito, I. Kaljurand // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47, N 3. – P. 392–409.
118. Kosyakov, D.S. Carbon nanocoatings: A new approach to recording mass spectra of low-molecular compounds using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [Text] / D.S. Kosyakov, E.A. Sorokina, N.V. Ul'yanovskii, E.A. Varakin, D.G. Chukhchin, N.S. Gorbova, // *J. Anal. Chem.* – 2016. – Vol. 71, N 13. – P. 1221–1227.
119. Hansen, C.M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, 2nd edn. [Text] / C.M. Hansen – Florida: CRC Press, Boca Raton. – 2007. – 544 p.
120. Kim, S. Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram [Text] / S. Kim, R.W. Kramer, P.G. Hatcher // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75. – P. 5336–5344.
121. Brereton, R.G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant [Text] / R.G. Brereton – Chichester: John Wiley & Sons. – 2003. – 489 p.

122. Koraciewicz, W. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography [Text] / W. Koraciewicz, M.A. Rounds, J. Fausnaugh, F.E. Regnier // J. Chromatogr. A. – 1983. – Vol. 266. – P. 3–21.

123. Косяков, Д.С. Времяпролетная масс-спектрометрия МАЛДИ с квадрупольной ионной ловушкой: гидратация ионов гидроксилсодержащих соединений [Текст] / Д.С. Косяков, О.Ю. Хорошев, Е.А. Аникеенко, Н.В.Ульяновский // Масс-спектрометрия. – 2019. – Том 16, № 1. – С. 22–28.