

На правах рукописи



**Фалёв Данил Иванович**

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

**02.00.02 – Аналитическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Архангельск  
2020**

Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова».

**Научный руководитель:** **Косяков Дмитрий Сергеевич**  
кандидат химических наук, доцент, директор Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова».

**Официальные оппоненты:** **Платонов Игорь Артемьевич**  
доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой химии ФГАОУ ВО «Самарский государственный аэрокосмический университет им. С. П. Королёва (национальный исследовательский университет)»

**Темердашев Азамат Зауалевич**  
кандидат химических наук, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Защита состоится 2 апреля 2020 г. в 16–00 на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет" по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет", на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет" <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Киселева  
Наталья Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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. Особое значение имеет противоопухолевая активность этих соединений, которая, в сочетании с низкой токсичностью, обуславливает их применение для создания противораковых препаратов. 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.

Цель работы – 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:

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

Научная новизна выполненных исследований и полученных результатов заключается в:

1. Разработана аналитическая схема хроматографического и масс-спектрометрического скрининга и определения широкого перечня ПЦТТ различных классов в растительном сырье.
2. Изучены влияние природы экстрагента, температуры и особенности извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья методом жидкостной экстракции под давлением;
3. Установлены закономерности удерживания ПЦТТ различных классов в условиях жидкостной хроматографии на неподвижной фазе со смешанным механизмом удерживания и оптимизированы условия разделения аналитов;
4. 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:

1. Способ экстракционного извлечения пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья субкритическими растворителями.

2. Методика одновременного определения десяти пентациклических тритерпеноидов (бетулин, эритродиол, уваол, фриделин, лупеол,  $\beta$ -амирин,  $\alpha$ -амирин, бетулиновая кислота, олеаноловая кислота и урсоловая кислота) методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии.

3. 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.

4. 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 4 статьи в журналах, индексируемых в базе Web of Science (Core Collection) и 13 тезисов докладов.

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Введение

Обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и его задачи, показана научная новизна работы и ее практическая значимость.

### Обзор литературы

Систематизированы общие сведения о пентациклических тритерпеноидах, в том числе их биологической активности и нахождении в природе. Детально рассмотрены основные методы экстракционного извлечения тритерпеноидов из различных растительных материалов. Основное внимание уделено существующим методам и подходам к определению и скринингу тритерпеноидов и родственных им природных соединений с использованием газовой и жидкостной хроматографии с различными видами детектирования и масс-спектрометрии, в том числе в варианте МАЛДИ.

### Аппаратура, материалы и техника эксперимента

Хроматографический анализ проводили с использованием ВЭЖХ-МС/МС системы, состоящей из тандемного масс-спектрометра с тройным квадруполем LCMS-8040, оснащенного источниками ионизации электрораспылением (ИЭР) и химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД), а также жидкостного хроматографа LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония), включающего два насоса LC-30AD с формированием градиента на стороне высокого давления, дегазатор, автосамплер LC-30AS, термостат колонок СТО-30А. Масс-спектры МАЛДИ записывали на гибридном масс-спектрометре Axima Resonance (Shimadzu-Biotech, Великобритания), оснащенный квадрупольной ионной ловушкой и времяпролетным масс-анализатором (QIT-TOF). Для экстракции ПЦТТ использовали систему жидкостной экстракции под давлением ASE-350 (Dionex, США) и ультразвуковую ванну Elmasonic S15H (Elma, Германия). Для характеристики экстрактов использовали масс-спектрометр высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США) с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки, оснащенный источником ХИАД, газовый хромато-масс-спектрометр QP-2010 Ultra (Shimadzu, Япония), а также ЯМР-спектрометр AVANCE III 600 МГц (Bruker, Германия).

В качестве стандартных образцов ПЦТТ использовали тритерпеновые двухатомные спирты бетулин (Б), эритродиол (Э) и уваол (У), кетон фриделин (Ф), одноатомные спирты лупеол (Л), β-амирин (βА) и α-амирин (αА), а также карбоновые кислоты - бетулиновую (БК), олеаноловую (ОК) и урсоловую (УК) производства компании Aldrich (Германия) (рис. 1).

В качестве экстрагентов использовались: деионизованная вода, метанол (HPLC grade, Merck, Германия), этанол (≥ 96%, ректификат), изопропанол (≥ 99,9%, «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).

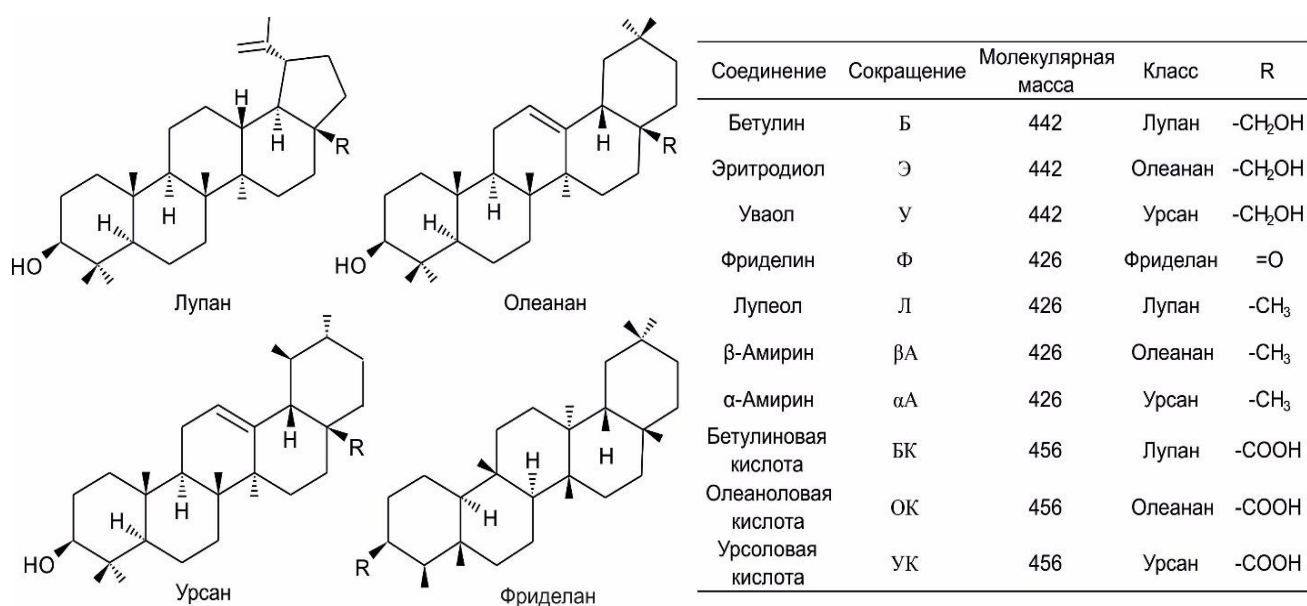


Рисунок 1. Структурные формулы основных классов ПЦТТ и перечень исследуемых соединений

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), ультрачистая деионизованная вода с удельным сопротивлением  $18,2 \text{ МОм} \cdot \text{см}$ .

Для разделения ПЦТТ тестировались следующие хроматографические колонки: Zorbax Eclipse Plus C18, Zorbax SB-Aq (Agilent, США) и Nucleodur C18 Isis (Macherey-Nagel, Германия),  $3 \times 150 \text{ мм}$ , октадецильная фаза с размером частиц  $3,5 \text{ мкм}$ ; Nucleodur PolarTec (Macherey-Nagel, Германия),  $150 \times 2 \text{ мм}$ , октадецильная неподвижная фаза с внедренными амидными группами, размер частиц  $1,8 \text{ мкм}$ ; Nucleodur HILIC (Macherey-Nagel, Германия),  $150 \times 3 \text{ мм}$ , цвиттерионная сульфобетаиновая неподвижная фаза, размер частиц  $3 \text{ мкм}$ ; Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (Thermo, США)  $150 \times 2,1 \text{ мм}$ , трифункциональная неподвижная фаза, размер частиц  $3,0 \text{ мкм}$ .

Во всех экспериментах МАЛДИ-МС использовали стандартные стальные мишени с нанесенными методом вакуумного электротермического напыления углеродными нанопокровками (УНП). В качестве катионирующего агента использовали хлорид лития (ACS reagent,  $99,0 - 100,5\%$ , Sigma Aldrich, США).

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.

### Разработка способа выделения тритерпеноидов методом субкритической экстракции

Определяющим фактором при извлечении ПЦТТ из растительных тканей является температура экстрагента, повышение которой, помимо роста растворимости экстрактивных веществ, приводит к изменению полярности растворителя и свойств экстрагируемого материала, способствует лучшей пропитке жидкостью и ускорению процессов диффузии извлекаемых компонентов в раствор.

Предварительные эксперименты по экстракции бересты ниже точки кипения растворителя показали недостаточную эффективность (выход бетулина составляет < 200 мг/г при экстракции метанолом при 50°C). Применение температур в диапазоне от 100 до 200°C и проведение двух циклов экстракции позволило добиться высоких степеней извлечения ПЦТТ с использованием большинства протестированных растворителей (табл. 1).

Таблица 1. Извлечение бетулина, (г/кг бересты) субкритическими органическими растворителями при различных температурах (P=100 атм, 2 цикла экстракции по 10 мин). P=0,95 (n=3)

Экстрагент	100°C	150°C	200°C
Вода	< ПО	< ПО	0.42±0,02
Метанол	<b>282±13</b>	256±14	237±9,9
Этанол	264±14	236±12	237±9,0
Изопропанол	252±15	244±14	242±13
Ацетонитрил	206±13	234±15	268±14
Хлороформ	236±13	261±6.3	245±13
Дихлорметан	190±8,9	242±7.5	226±8,7
Ацетон	268±18	269±14	265±11
Гексан	40±1,5	197±8,7	226±10

Наибольшую эффективность демонстрируют алифатические спирты (особенно метанол) и ацетон, позволяющие извлекать ПЦТТ практически количественно. ЖЭД заметно превосходит по степени извлечения ультразвуковую экстракцию и экстракцию по Сокслету в течение 12 ч (максимальный выход бетулина для них составляет 60±3 и 200±12 мг/г бересты соответственно) при сокращении времени пробоподготовки в 20-30 раз. Неожиданное снижение выхода ПЦТТ при повышении температуры экстракции в диапазоне 100–200 °C не связано с химической модификацией аналитов (подтверждено методом <sup>1</sup>H ЯМР) и объясняется снижением доступности ПЦТТ в тканях растения вследствие набухания последних. Идентификация индивидуальных компонентов полученных экстрактов бересты методом ГХ-МС показала, что все органические растворители в оптимальных



условиях дают близкие наборы соединений, относящихся, помимо ПЦТТ, в основном к классам углеводов (главным образом C11—C17), сесквитерпенов ( $\alpha$ -бергамотен,  $\alpha$ -сантален и др.), жирных спиртов и кислот (генэйкозанол, 1,2-дипальмитин, 1,3-дипальмитин,  $\alpha$ -моностеарин, 2-монопальмитин и др.), а также стероидов (ланостерин, стигмастерин,  $\beta$ -ситостерин).

### **Быстрый скрининг пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом МАЛДИ-МС**

Ввиду многообразия ПЦТТ, синтезируемых растениями, большое значение имеет решение задач нецелевого скрининга ПЦТТ без использования стандартных образцов. Для достижения такой цели может быть использована 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  $\sim 50$  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  $\text{Li}^+$ , обладающие высокой плотностью заряда.

В полученных масс-спектрах для всех соединениях, 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. Минорными компонентами спектров являются также пики дегидратированных ионов  $[\text{M}+\text{Li}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . 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  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

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

Для решения задач полуколичественного определения строились градуировочные зависимости ( $R^2 \geq 0,84$ ) по высоте наиболее интенсивного пика: для олеаноловой и урсоловой кислот –  $m/z$  455 (–), для диолов (эритродиол и уваол) –  $m/z$  449 (+), для моноолов (лупеол,  $\beta$ -амирин и  $\alpha$ -амирин) –  $m/z$  451 (+). Ориентировочные значения ПО в экстрактах находятся в диапазоне 0,5-100 мг/л (или 0,5–100 нг на мишени).

Использование МАЛДИ-МС позволило в исследуемых образцах экстрактов кожуры яблок и ягод (рис. 2) с привлечением литературных данных обнаружить следующие ПЦТТ: олеаноловая/урсоловая кислоты ( $m/z$  455), маслиновая/корозоловая кислоты ( $m/z$  471) и аннурковая кислота ( $m/z$  485).

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, что позволило ограничиться тремя стандартными образцами ПЦТТ. В качестве таковых были использованы: для тритерпеновых кислот – олеаноловая кислота, для диолов – эритродиол, для моноолов -  $\alpha$ -амирин. Результаты оценки содержания ПЦТТ в растительном сырье данным методом представлены в табл. 2.

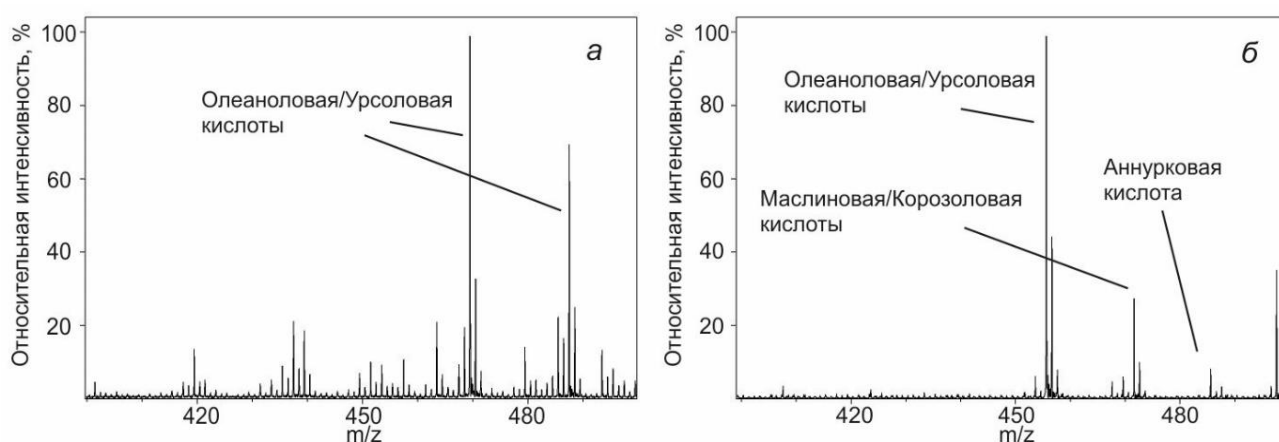


Рисунок 2. Масс-спектры МАЛДИ экстрактов кожуры яблока «Golden Delicious» в режимах регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов

Таблица 2. Ориентировочное содержание ПЦТТ в растительном сырье по данным МАЛДИ-МС, мг/г

Соединение или группа	$m/z$ (режим)	Кожура яблока «Golden Delicious»	Кожура яблока «Red Delicious»	Кожура клюквы	Кожура брусники
Диолы	449 (+)	-	-	-	-
Моноолы	541 (-)	-	-	-	-
Кислоты	455 (-)	8,2±1,7	3,8±2,4	1,7±0,9	2,8±1,3
Маслиновая/корозоловая кислоты	471 (-)	2,1±0,9	1,0±0,6	0,21±0,10	0,10±0,06
Аннурковая кислота	485 (-)	0,54±0,29	0,35±0,19	-	-

Полученные величины согласуются с литературными данными и подтверждает работоспособность подхода. Таким образом, использование метода МАЛДИ-МС позволяет проводить полуколичественное определение и быстрый групповой скрининг ПЦТТ в экстрактах растений, при этом метод позволяет исследовать сотни образцов на одной мишени, при времени анализа одного образца не более 1 мин.

## Скрининг пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме сканирования ионов прекурсоров

Для решения задач обнаружения и полуколичественного определения индивидуальных ПЦТТ и их производных, необходимо их хроматографическое разделение. Учитывая сходство tandemных масс-спектров ПЦТТ, скрининг данных соединений в растительном сырье может осуществляться методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – tandemной масс-спектрометрии в режиме сканирования ионов-предшественников (СИП).

Характеристичными для ПЦТТ являются ионы-продукты с  $m/z$  81, 95, 109, 123 и 137, при этом ион с  $m/z$  95, дающий наиболее интенсивный сигнал в масс-спектрах всех анализов при энергии соударения 40 эВ, выбран нами в качестве маркера ПЦТТ (целевого иона-продукта) для скрининга в режиме СИП.

Градуировочные кривые для исследуемых ПЦТТ в режиме СИП показали хорошую линейность ( $R^2 \geq 0,99$ ) в диапазоне концентраций, охватывающем 3 порядка, а значения ПО и НПОК лежали в пределах 0,09-0,18 и 0,29-0,61 мг/л соответственно.

Применение описанного подхода для исследуемых образцов растительного сырья позволило обнаружить и предположительно идентифицировать (на основе факторов удерживания, молекулярной массы, tandemных масс-спектров, а также с привлечением литературных данных о составе объектов исследования) 24 ПЦТТ и их производных (рис. 3, табл. 3). Среди них, помимо соединений, для которых имеются стандартные образцы, в значительных количествах встречаются глицирризиновая кислота (корень солодки), бетулина 3-кофеат и олеаноловой кислоты 3-ацетат (береста), а также тритерпеновые кислоты – маслиновая и корозоловая, (кожура клюквы и яблока).

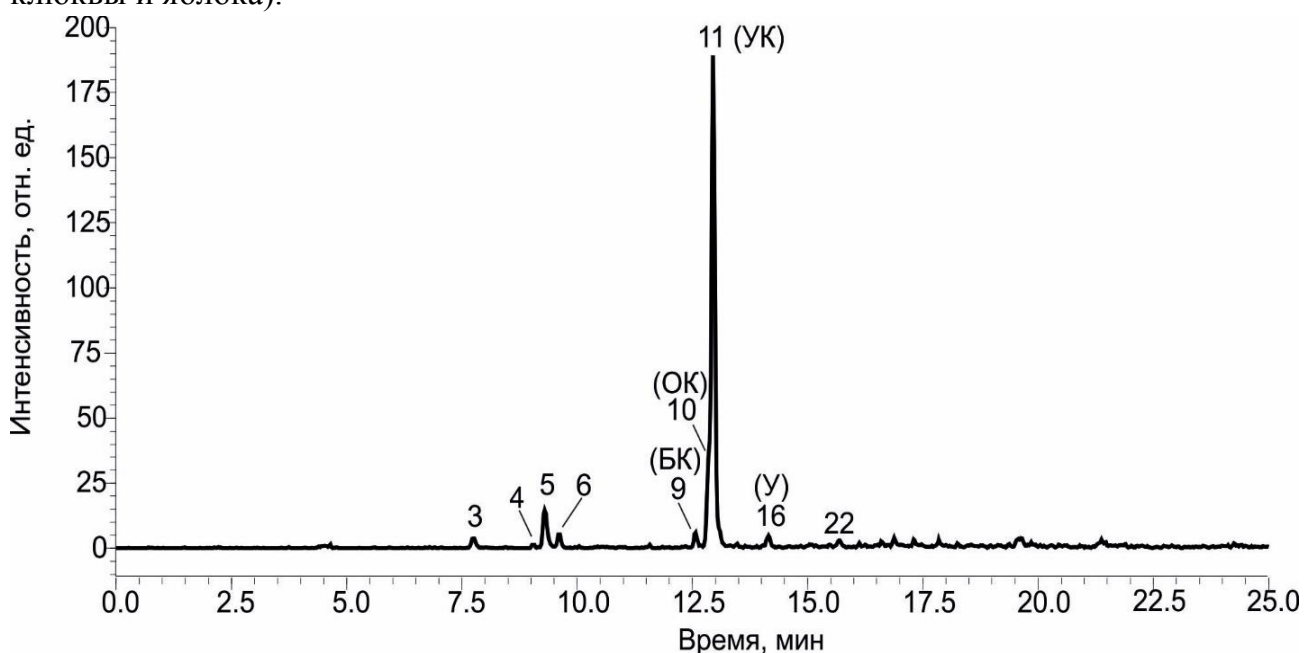


Рисунок 3. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма экстракта кожуры яблока полученная в режиме СИП (неподвижная фаза Nucleodur C18 isis, ион-продукт с  $m/z$  95, энергия соударений 40 эВ, номера соединений соответствуют табл. 5)

Сравнение относительных факторов отклика имеющихся девяти стандартов ПЦТТ показало их близость для большинства соединений (различие не превышало 2 раз). Это позволило осуществлять полуколичественное определение неизвестных ПЦТТ с использованием градуировки по одному стандарту, в качестве которого нами выбран бетулин. Полученные таким образом величины ориентировочных содержаний ПЦТТ в образцах растительного сырья (табл. 5) лежат в диапазоне от 0,09 до 320 мг/г, а суммарное содержание ПЦТТ варьируется от 11 мг/г для корня солодки до 370 мг/г.

Таким образом, использование метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП позволяет проводить полуколичественное определение и скрининг отдельных ПЦТТ и их производных в экстрактах растений.

Таблица 3. Предполагаемый компонентный состав и ориентировочное содержание (мг/г) ПЦТТ в образцах растительного сырья по данным скрининга методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме СИП, P=0.95 (n=3)

№	t <sub>R</sub> , мин	m/z иона прекурсора	Название	Кора березы	Кожура яблока	Кожура клюквы	Корень солодки
1	1,40	823	Глицирризиновая кислота	-	-	-	9,3±0,8
2	1,66	823	Изомер глицирризиновой кислоты	-	-	-	1,1±0,1
3	7,75	469	Аннурковая кислота	-	1,1±0,01	-	-
4	9,07	471	1-Гидрокси-3-оксоурс-12-ен-28-овая кислота	-	0,38±0,02	-	-
5	9,30	455	Маслиновая кислота	-	4,3±0,3	0,09±0,01	-
6	9,61	455	Корозоловая кислота	-	1,7±0,01	0,60±0,04	-
7	9,88	471	Эноксолон	-	-	-	0,29±0,02
8	12,05	455	н/и*	-	-	0,31±0,02	-
9	12,54	439	Бетулиновая кислота	19±1	0,88±0,05	-	0,2±0,01
10	12,84	439	Олеаноловая кислота	9,6±0,6	13±1	6,3±0,3	-
11	12,94	439	Урсоловая кислота	-	49±4	20±1	-
12	13,09	425	Бетулин	320±20	-	-	-
13	13,55	425	Бетулин-3-кофеат	2,6±0,2	-	-	-
14	13,82	423	н/и*	1,4±0,1	-	-	-
15	14,07	425	Эритродиол	4,6±0,3	-	-	-
16	14,15	425	Уваол	-	1,1±0,1	-	-
17	14,18	439	н/и*	-	-	0,90±0,07	-
18	14,34	439	н/и*	-	-	1,0±0,1	-
19	14,63	425	н/и*	0,95±0,08	-	-	-
20	14,76	439	Олеаноловая кислота 3-ацетат	1,4±0,1	-	-	-
21	15,05	423	н/и*	5,3±0,4	-	-	-
22	15,69	423	н/и*	-	0,85±0,03	-	-
23	16,93	397	н/и*	-	-	0,48±0,03	-
24	19,36	409	Лупеол	7,2±0,4	-	-	-
Сумма ПЦТТ				370	72	30	11

\* - соединение не идентифицировано

### Определение ПЦТТ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Для решения задач целевого определения ПЦТТ наиболее перспективным является метод высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия в режиме мониторинга заданных реакций (МЗР).

Сравнение двух методов ионизации аналитов (ИЭР и ХИАД) показало, что ХИАД обеспечивает наиболее эффективную генерацию положительно заряженных ионов ПЦТТ в силу малой полярности аналитов. Применение ИЭР и ХИАД в режиме отрицательной полярности обеспечивает сопоставимые с ХИАД (+) результаты лишь в случае тритерпеновых кислот. Оптимальными условиями ХИАД (+) являются температура источника ионов 350°C и напряжение на игле коронного разряда 3,5 кВ. Установлено, что в условиях ХИАД аналиты подвергаются дегидратации в источнике с образованием ионов  $[M-H_2O+H]^+$  (за исключением фриделина, для которого процессом в источнике ионов является протонирование). На основе изучения тандемных масс-спектров ПЦТТ выбраны аналитические и подтверждающие ионные переходы для детектирования в режиме МЗР, оптимизированы величины энергии соударения и потенциальных барьеров на входе в квадруполи (табл. 4).

Таблица 4. Оптимальные условия тандемного масс-спектрометрического детектирования аналитов в режиме МЗР

ПЦТТ	Мол. масса, Да	Ионный переход, $m/z$	Энергия на Q1, В	Энергия соударения, В	Энергия на Q2, В
Б	442	425→95	-43,5	32	-37,1
		425→191*	-46,8	17	-11,3
Э	442	425→191	-46,8	14	-46,8
		425→217*	-46,8	17	-21,0
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
Л	426	409→95	-43,5	33	-14,5
		409→137*	-40,3	20	-46,8
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
БК	456	439→95	-46,8	40	-40,3
		439→137*	-43,5	21	-24,2
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

Примечание: \*-подтверждающий ионный переход

В ходе скрининга различных типов обращенных неподвижных фаз установлено, что классические октадецильные (C18) фазы не позволяют разделить критические пары анализов с близким удерживанием: эритродиол/уваол,  $\alpha/\beta$ -амирины и олеаноловая/урсоловая кислоты. Данная проблема частично может быть решена с использованием обращенных неподвижных фаз с внедренными полярными группами и сорбентов с поперечно сшитой привитой фазой C18. Так, наилучшие результаты были получены для неподвижной фазы Nucleodur C18 Isis при применении градиентного элюирования, позволившей разделить изомеры амирина (рис. 4).

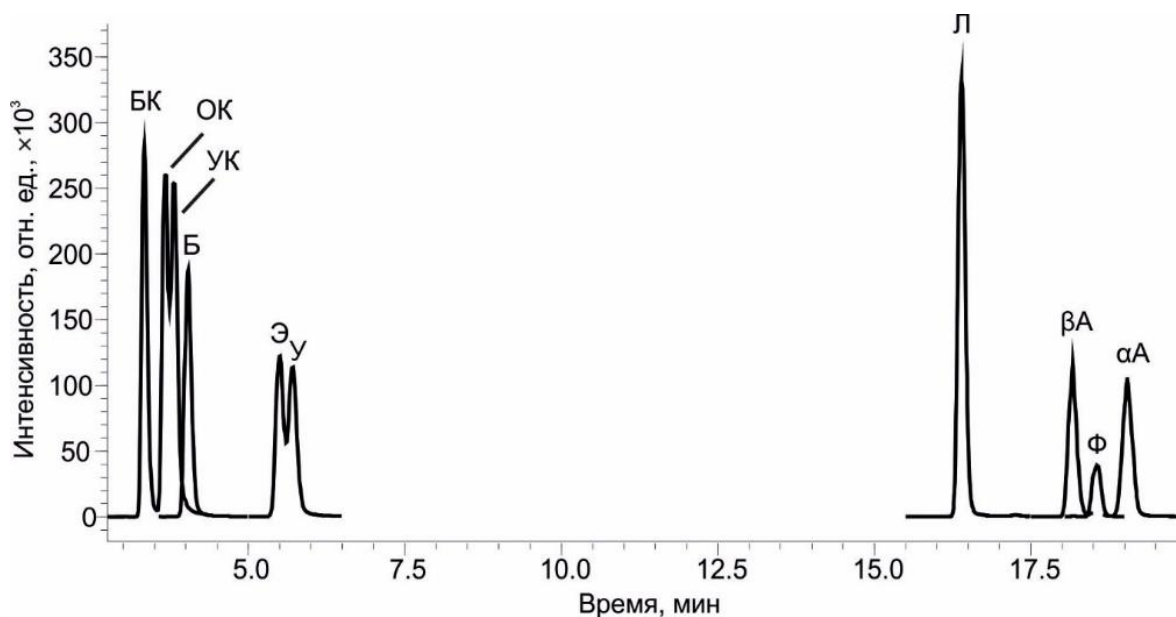


Рисунок 4. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси ПЦТТ (12,5 мг/л) на неподвижной фазе Nucleodur C18 Isis

Полного разделения критических пар Э/У и ОК/УК без неприемлемого увеличения времени анализа достичь не удалось - хроматографическое разрешение ( $R_s$ ) составило для них 0,8 и 0,7 соответственно. Получены градуировочные зависимости исследуемых компонентов ( $R^2 \geq 0,99$ ), пределы обнаружения (ПО) и нижние пределы определяемых концентраций (НПОК) находились в диапазоне 3-13 мкг/л и 11-44 мкг/л соответственно. Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости анализа стандартных растворов анализов с концентрациями каждого компонента 50 мкг/л показали, что стандартное отклонение не превышало 14 %. Правильность методики (96-104%) и отсутствие матричных эффектов подтверждены методом введено-найдено с использованием в качестве матрицы экстракта кожуры клюквы.

Метод успешно апробирован при анализе реальных объектов, в которых обнаружено большинство определяемых соединений с содержанием от 0,0033 до 280 мг/г, при этом в коре березы преобладает бетулин, в кожуре яблок и ягод преобладают олеаноловая и урсоловая кислоты

## Определение тритерпеноидов с использованием неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания методом ВЭЖХ-МС/МС

Основной проблемой при использовании обращенной неподвижной фазы является большое различие в полярностях различных типов ПЦТТ (моноолы, диолы, кетоны, тритерпеновые кислоты) при близости свойств соединений внутри каждого типа. В связи с этим, даже применение градиентного элюирования не позволяет обеспечить экспрессность анализа и эффективное разделение аналитов. Решением данной проблемы является использование неподвижных фаз со смешанным механизмом удерживания, сочетающим гидрофобные, анионообменные и гидрофильные взаимодействия. В качестве такой неподвижной фазы нами выбрана Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (рис. 5), содержащая внедренную в алкановую цепь полярную амидную группу и терминальную триалкиламинную группу, протонирующуюся в растворе и обеспечивающую хорошее удерживание анионных аналитов.

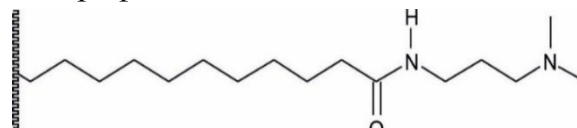


Рисунок 5. Неподвижная фаза Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Реализация смешанного механизма удерживания открывает большие возможности для регулирования селективности разделения аналитов за счет изменения вкладов 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 pH и ионная сила.

*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 ВЭЖХ: диолы – кетон фридлин - моноолы - тритерпеновые кислоты. Аномальное положение в этой серии тритерпеновых кислот, обусловлено значительным вкладом в их механизм удерживания (наряду с гидрофобными взаимодействиями) ионного обмена с триалкиламиновыми группами неподвижной фазы. Это приводит к недопустимо высоким значениям коэффициента удерживания ( $k$ ), когда содержание ацетонитрила в подвижной фазе составляет менее 80% (об.). С увеличением содержания ацетонитрила удерживание кислот быстро уменьшается (рис. 6) из-за увеличения элюирующей способности подвижной фазы для обращенно-фазового механизма удерживания.

Примечательно, что для кислот (и диолов, но менее выражено) представленные зависимости проходят через экстремум и при дальнейшем увеличении концентрации органического растворителя ( $> 85\%$ ) их удерживание увеличивается. Этот эффект связан с увеличением вклада гидрофильных взаимодействий в удерживание аналитов, содержащих полярные группы. Поведение четырех менее полярных ПЦТТ (моноолов и фридлина) типично для гидрофобного удерживания, которое является для них определяющим при использовании выбранной неподвижной фазы.

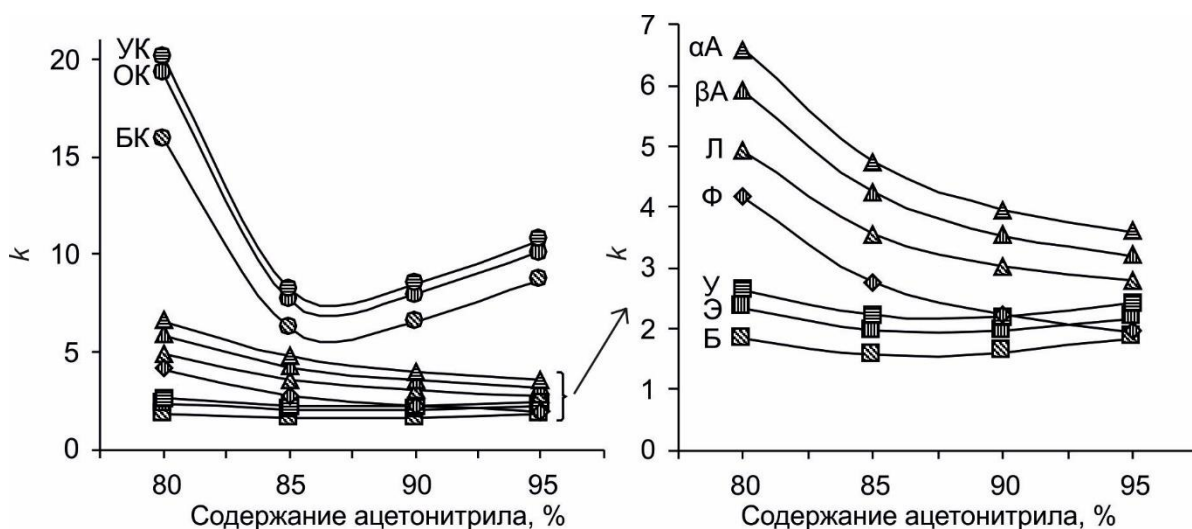


Рисунок 6. Влияние объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе на факторы удерживания ПЦТТ (5 мМ формиата аммония, рН 4)

*Влияние рН и ионной силы подвижной фазы.* Влияние рН на разделение аналитов обусловлено изменением степени диссоциации тритерпеновых кислот. Это подтверждается полученными зависимостями коэффициентов удерживания ПЦТТ от рН (рис. 7), демонстрирующих значительное изменение величин  $k$  для бетулиновой, олеаноловой и урсоловой кислот. Увеличение удерживания этих аналитов с ростом рН вызвано переходом кислот в анионную форму наряду с упомянутым выше решающим вкладом ионообменных взаимодействий в механизм их удерживания.

Ионная сила подвижной фазы определяет интенсивность электростатических взаимодействий аналитов с заряженными группами неподвижной фазы и является важным фактором, влияющим на удерживания тритерпеновых кислот (рис. 8). Значения  $k$  для них резко уменьшаются с увеличением концентрации формиата аммония в подвижной фазе.

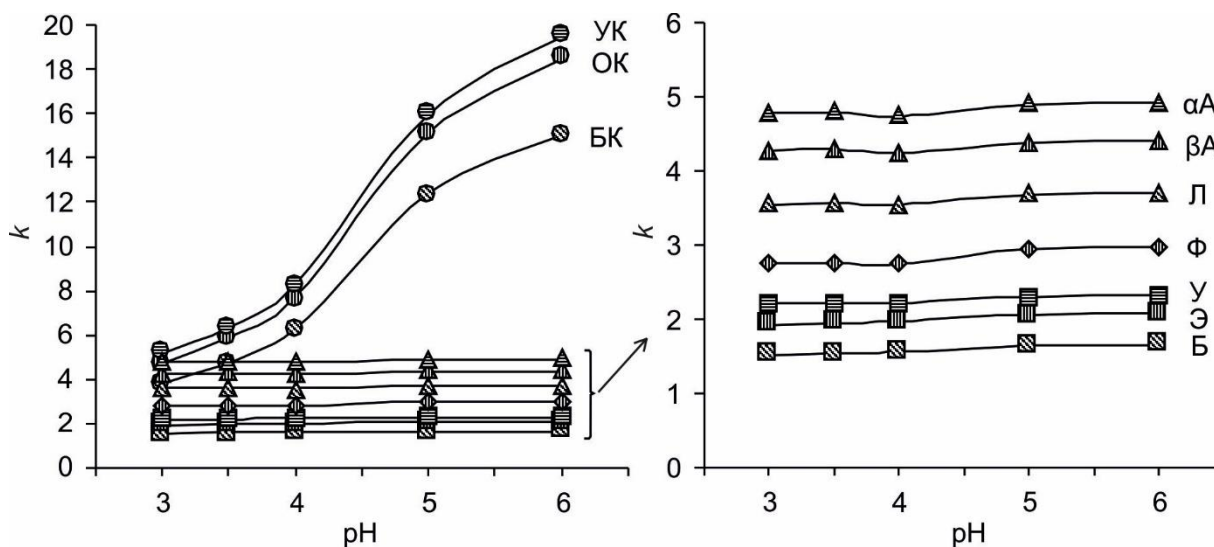


Рисунок 7. Факторы удерживания ПЦТТ в зависимости от рН подвижной фазы (5 мМ формиата аммония, содержание ацетонитрила 85%)



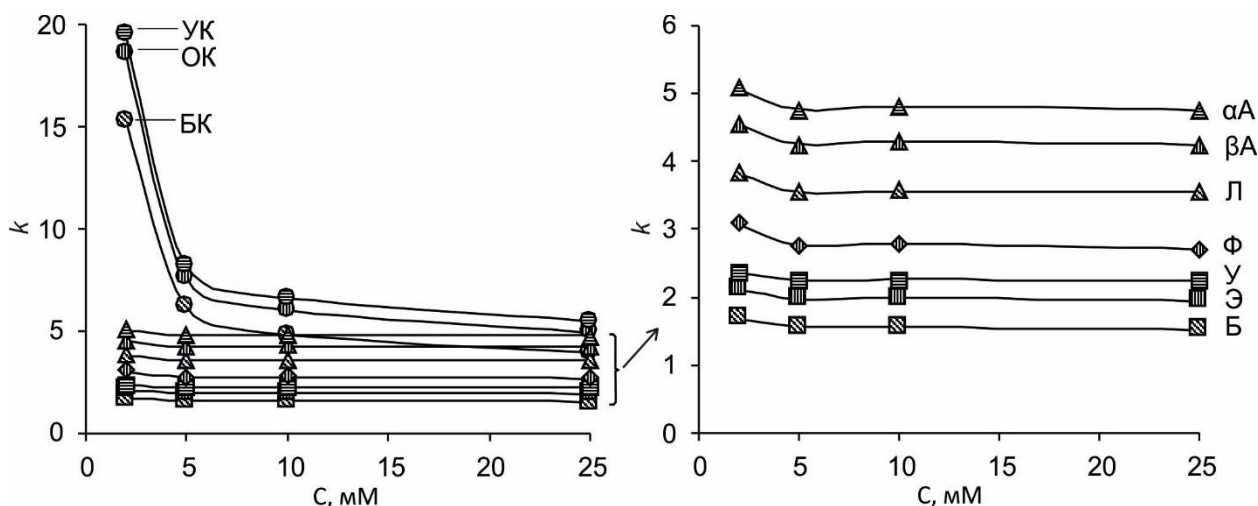


Рисунок 8. Факторы удерживания ПЦТТ в зависимости от концентрации формиата аммония в подвижной фазе (рН 4, содержание ацетонитрила 85%)

*Оптимальные условия 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, когда содержание ацетонитрила в подвижной фазе составляет 85–90% при концентрациях 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 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 содержанию 5 мМ буферной соли в конечном растворе. При максимальной скорости потока подвижной фазы для этого типа хроматографической колонки (0,4 мл/мин), выбранные условия позволили достичь разделения всех десяти аналитов в течение 7 минут (рис. 9) при изократическом элюировании, с оптимальным диапазоном коэффициентов удерживания ПЦТТ от 1,57 (бетулин) до 8,23 (урсоловая кислота). Для большинства ПЦТТ достигнуто полное разделение (за исключением пар Э/У и ОК/УК кислота, для которых  $R_s$  составило 1,25).

*Валидация и апробация методики.* Параметры градуировочных зависимостей, а также достигнутые пределы обнаружения аналитов (табл. 5) свидетельствуют о высокой чувствительности разработанной методики и широком линейном диапазоне определяемых концентраций, охватывающем более 3 порядков. Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости анализа модельных растворов с концентрациями каждого компонента 50 мкг/л показали, что стандартное отклонение в обоих случаях не превышало 10%. Правильность методики, оцененная методом введено-найденно с использованием реального экстракта кожуры ягод клюквы, составила (96–104%), что свидетельствует об отсутствии заметных матричных эффектов.

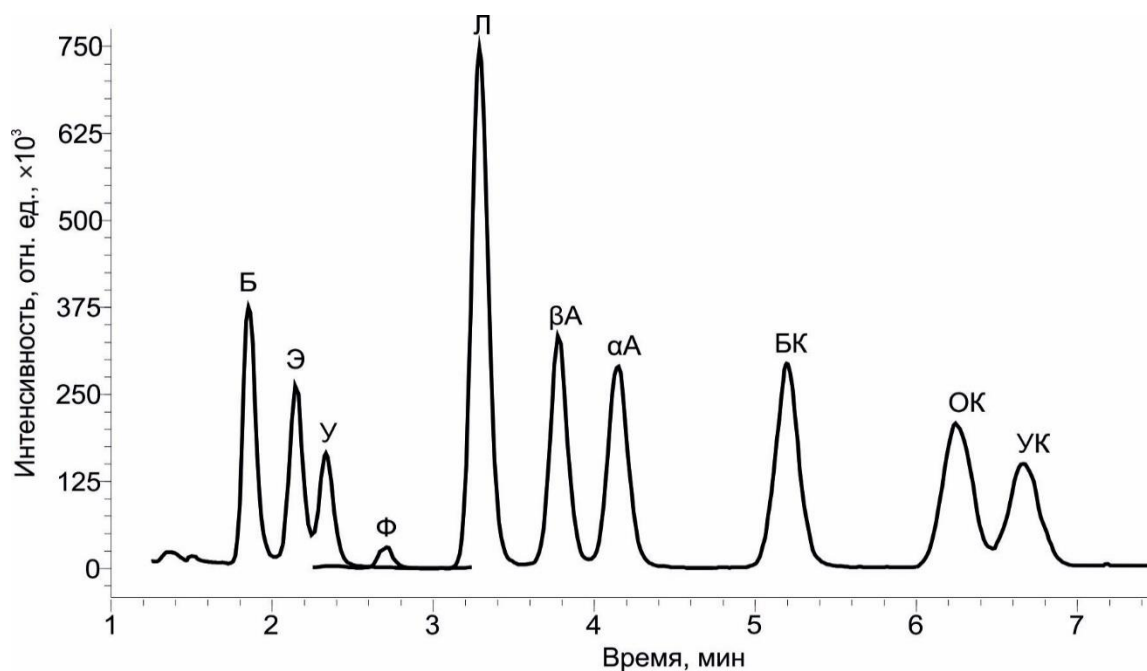


Рисунок 9. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма модельной смеси десяти ПЦТТ (12,5 мг/л) на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1 в оптимальных условиях

Методика успешно апробирована при анализе реальных объектов (табл. 6, рис. 10). Установлено, что во внешнем слое коры березы преобладают бетулин, эритродиол, уваол, бетулиновая и олеаноловая кислоты, а их содержание согласуется с литературными данными. Среди второстепенных компонентов обнаружены  $\beta$ - и  $\alpha$ -амирины в количестве 0,29 и 0,39 мг/г соответственно. Хотя присутствие  $\beta$ -изомера известно в литературе, о нахождении  $\alpha$ -амирина в коре березы ранее не сообщалось. Экстракт брусники отличается от бересты гораздо более сложным химическим составом, что, однако, не мешает определению ПЦТТ. 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.

Таблица 5. Градуировочные зависимости ( $y=sx+a$ ) площади хроматографического пика ( $y$ ) от концентрации ( $x$ ), пределы обнаружения и нижние пределы определяемых концентраций ПЦТТ методом ВЭЖХ-МС/МС на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Соединение	Линейный диапазон (мкг/л)	s	a	R <sup>2</sup>	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
$\beta$ А	23-25000	169985	332	0,999	7	23
$\alpha$ А	20-25000	150489	249	0,999	6	20
БК	40-25000	188872	721	0,999	12	40
ОК	13-25000	179116	280	0,999	6	20
УК	20-25000	130986	210	0,999	4	13

Таблица 6. Содержание ПЦТТ в растительном сырье по данным ВЭЖХ-МС/МС (P=0,95; n=3)

ПЦТТ	Кора березы, мг/г	Кожура брусники, мг/г
Б	280±10	0,38±0,02
Э	4,6±0,2	0,059±0,003
У	< ПО	0,15±0,07
Ф	< ПО	< ПО
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	менее ПО	15±1

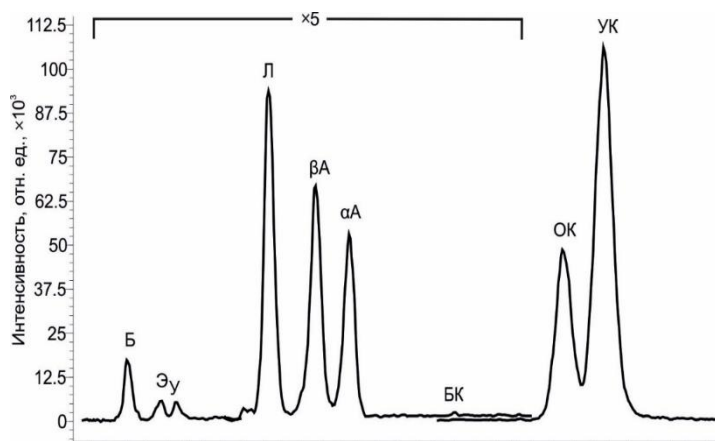


Рисунок 10. ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма экстракта кожуры брусники на неподвижной фазе Acclaim Mixed-Mode WAX-1

Таким образом, использование метода ВЭЖХ-МС/МС с химической ионизацией при атмосферном давлении в режиме МЗР позволяет проводить определение десяти ПЦТТ различных классов в экстрактах растений. А использование неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания, позволяет в широких пределах регулировать селективность анализа и проводить быстрое хроматографическое разделение сложных смесей ПЦТТ различных классов в изократическом режиме элюирования.

## 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 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 tandemным 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 – tandemной 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 времени анализа не более 1 мин, подход обеспечивает ориентировочные пределы обнаружения аналитов на уровне 0,5-100 мг/л.

#### **Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

##### *Статьи*

1. Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, **Д.И. Фалёв**. Определение тритерпеноидов коры березы методом жидкостной tandemной хроматомасс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. – 2013. – № 4. – С. 237–243 (D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii, **D.I. Falev**. Determination of Triterpenoids from Birch Bark by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 69, N 13. – P. 50–55.).
2. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников, С.Л. Шестаков. Субкритическая экстракция пентациклических тритерпеноидов из коры березы // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2017. – № 5. – С. 875–881. (**D.I. Falev**, D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii, D.V. Ovchinnikov, S.L. Shestakov. Subcritical extraction of birch bark pentacyclic triterpenes // Russian Chemical Bulletin, International Edition. – 2017. – Vol. 66, N 5. – P. 875–881.).
3. Е.А. Аникеенко, Э.Н. Рахматулина, **Д.И. Фалев**, О.Ю. Хорошев, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков. Применение углеродных матриц для скрининга пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Масс-спектрометрия. – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 275–283.
4. **D.I. Falev**, D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii, D.V. Ovchinnikov. Rapid simultaneous determination of pentacyclic triterpenoids by mixed-mode liquid chromatography–tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography A. – 2020. – Vol. 1609, N 460458. – P. 1–9.

*Материалы конференций*

5. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский. Новые подходы к определению пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье // *Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев 2014»*. – 2014. – С. 339–340.
6. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков. Новые подходы к определению пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье // *Материалы XXIV Менделеевской конференции молодых ученых*. – 2014. – С. 107.
7. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников. Субкритическая экстракция пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья // *Материалы V Всероссийской школы – конференции молодых ученых «Сверхкритические флюидные технологии в решении экологических проблем»*. – 2014. – С. 80–84.
8. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников. Высококчувствительное хромато-масс-спектрометрическое определение пентациклических тритерпеноидов коры березы // *Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии»*. – 2014. – С. 258.
9. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский. Аналитическая экстракция под давлением пентациклических тритерпеноидов из растительного сырья // *Материалы VI Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров»*. – 2015. – С. 315–319.
10. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский. Определение пентациклических тритерпеноидов в экстрактах растений методом ВЭЖХ-МС/МС // *Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы»*. – 2015. – С. 44.
11. **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, С.А. Покрышкин, А.С. Почтовалова. Характеристика субкритических экстрактов коры березы // *Материалы VII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров»*. – 2017. – С. 231–234.
12. **Д.И. Фалёв**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников. Применение неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания для определения пентациклических тритерпеноидов методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии // *Материалы Третьего съезда аналитиков России*. – 2017. – С. 410.
13. Е.А. Аникеенко, О.Ю. Хорошев, **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков. Скрининг пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ с предварительной экстракцией под давлением // *Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии»*. – 2018. – С. 136.

14. **Д.И. Фалёв**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников. Определение пентациклических тритерпеноидов методом ВЭЖХ-МС/МС с применением неподвижной фазы со смешанным механизмом удерживания // Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». – 2018. – С. 176.
15. **Д.И. Фалёв**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.В. Овчинников, А.В. Фалёва. Скрининг тритерпеноидов методом жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии в режиме сканирования ионов предшественников // Материалы VIII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». – 2019. – С. 130–133.
16. Е.А. Аникеенко, О.Ю. Хорошев, **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков. Скрининг пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Материалы VIII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». – 2019. – С. 153–155.
17. О.Ю. Хорошев, Е.А. Аникеенко, **Д.И. Фалев**, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский. Быстрый скрининг пентациклических тритерпеноидов в растительном сырье методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». – 2019. – С. 130.

Работа выполнена в рамках конкурсной части государственного задания Минобрнауки РФ (проект № 4.2518.2017/ПЧ).

*Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю к.х.н., доц., Д.С. Косякову за участие и помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследования; к.х.н., с.н.с. Н.В. Ульяновскому за консультацию по тематике работы; всему коллективу Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» за отзывчивость, теплую атмосферу и помощь в работе.*

Автореферат

**Фалева Данила Ивановича**

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

Подписано в печать \_\_\_\_\_ Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>

Бум. тип. № 1. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ № \_\_\_\_\_

Отпечатано с готового оригинал-макета

В издательском доме им. В.Н. Булатова САФУ

163060, г. Архангельск, ул. Урицкого, д. 56