

На правах рукописи



Ставрианиди Андрей Николаевич

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЖЕНЬШЕНЯ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Родин Игорь Александрович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Людмила Алексеевна Карцова
кафедра органической химии
Институт химии СПбГУ (г. Санкт-Петербург)
кандидат химических наук
Чернобровкин Михаил Геннадьевич
ООО "Технология лекарств" (г. Химки)

Ведущая организация: Кубанский государственный университет,
г. Краснодар

Защита состоится 10 июня 2014 г. в 15 ч 00 мин в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://www.chem.msu.su>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан __ апреля 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Обнаружение физиологически активных компонентов в различных объектах является сложной задачей и требует использования современных высокоинформативных методов исследования. Различают подходы, направленные на обнаружение и определение нескольких выбранных заранее целевых аналитов, и более сложные способы обнаружения групп неизвестных веществ, близких по структуре, а также их идентификацию. Групповые методы анализа, особенно при необходимости идентификации веществ, предполагают использование другого приборного обеспечения, а также занимают в несколько раз больше времени. Одним из наиболее мощных и универсальных способов исследования структуры неизвестных веществ является метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), сочетающий в себе возможность проведения высокоселективного разделения исследуемых смесей, возможность идентификации неизвестных веществ по сигналам молекулярных и фрагментных ионов в масс-спектрах и высокую чувствительность.

С развитием технологий, появились новые возможности методов ВЭЖХ-МС/МС, в частности, создаются и улучшаются различные варианты комбинирования источников с «мягкой» ионизацией и нескольких масс-анализаторов различных типов для получения более информативных спектров, содержащих сигналы молекулярных и фрагментных ионов, позволяющие делать выводы о структуре соединения. Такие гибридные методы анализа предполагают обработку больших количеств масс-спектральной информации, которую не всегда удается автоматизировать. Многие исследователи отмечают недостаток качественных электронных библиотек и баз данных, содержащих информацию о масс-спектрометрическом поведении сапонинов и других физиологически активных компонентов растительного сырья. В отсутствие таких универсальных библиотек детальные исследования путей фрагментации и разработка подходов групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации этих веществ позволит расширить круг определяемых компонентов пищевых продуктов и лекарственных средств на основе растений.

Женьшеневые сапонины (гинсенозиды) являются основными действующими веществами растений рода *Panax*. Эти растения активно используют в производстве средств традиционной медицины в Китае, Корее, Японии, США и на Дальнем Востоке. На протяжении последних 50 лет многие исследователи разрабатывали методы идентификации и определения гинсенозидов в растительных материалах, экстрактах и коммерческих продуктах. Для выделения гинсенозидов из растительного сырья использовали различные виды экстракции, и разделение гинсенозидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ. Установлено, что во время традиционных процедур обработки корня женьшеня, например обработки паром, а также на некоторых стадиях пробоподготовки происходит частичное или полное разложение гинсенозидов. Это приводит к увеличению числа компонентов из той же группы гинсенозидов. Молекула любого гинсенозида состоит из сапогенина и сахаридных боковых цепей, которые, в свою очередь, могут иметь заместители, например малонил и ацетил. Во многих образцах женьшеня присутствует большое число разнообразных гинсенозидов, отличающихся составом заместителей, а также сапогенином, от сапонинов, обнаруженных ранее методами

планарной хроматографии. Общее число известных гинсенозидов превышает 600, и стандартные образцы большинства из них труднодоступны, поэтому развитие методов групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации и определения этих веществ для получения информации о составе женьшеневого растительного сырья, продуктов на его основе и их влиянии на организм человека представляется перспективным.

Цель работы состояла в разработке новых способов обнаружения и групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации физиологически активных компонентов растительного происхождения, и оценке аналитических возможностей разработанных подходов на примере женьшеневых сапонинов, с использованием собранной из экспериментальных данных информации о путях фрагментации и других особенностях масс-спектрометрического и хроматографического поведения исследуемой группы веществ.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Изучение процессов ионизации, характера фрагментации исследуемой группы веществ в условиях ВЭЖХ-МС/МС. Оптимизация условий получения масс-спектров, содержащих информацию о структуре соединений, и выявление особенностей формирования масс-спектров на примере различных гинсенозидов.
2. Создание алгоритмов идентификации структурных фрагментов, а также выявление значимых признаков, которые могут быть использованы для классификации неизвестных компонентов на основе совпадения паттернов фрагментации с установленными для нескольких подгрупп в рамках исследования женьшеневых сапонинов с различным типом сапогенина.
3. Выбор и оптимизация условий пробоподготовки, обеспечивающих эффективное и неразрушающее извлечение определяемых соединений из растительных материалов и продуктов на их основе.
4. Изучение хроматографического поведения исследуемой группы веществ в условиях обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ и разработка способов оценки их содержаний по площадям пиков в варианте сканирования и регистрации выделенных ионов с использованием ЛИЛ.
5. Выбор условий ВЭЖХ выделения фракций, содержащих неизвестные компоненты, для их последующего анализа методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и сопоставления полученных данных с результатами интерпретации масс-спектров этих веществ.

Научная новизна. На примере группы физиологически активных компонентов женьшеня изучены процессы формирования масс-спектров, регистрируемых с использованием линейной ионной ловушки (ЛИЛ). Установлены закономерности, связывающие структуру аналита со значениями m/z и относительной интенсивностью сигналов в масс-спектрах в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР). На основе полученных данных предложены оригинальный способ детектирования сапонинов и алгоритм, позволяющие проводить идентификацию структурных фрагментов по их масс-спектрам, а также классифицировать эти соединения по типу сапогенина, основываясь на паттернах фрагментации, в режиме on-line в течение одного хроматографического анализа.

Выбраны условия разделения 17 стандартных гинсенозидов в варианте ОФ ВЭЖХ, которые легли в основу разработанного способа обнаружения гинсенозидов в реальных

объектах. Преимуществами данного способа, по сравнению с описанными в литературе, являются высокая селективность и чувствительность, высокая информативность регистрируемых с использованием ЛИЛ масс-спектров и возможность автоматизации. Проведена проверка разработанного способа на образцах сухого и свежего корня женьшеня, а также экстрактах и продуктах на его основе.

Разработан селективный способ определения псевдогинсенозидов F11 и RT5 (основных биомаркеров *P. quinquefolius*) в присутствии других женьшеневых сапонинов с использованием МС детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов. Продемонстрирована возможность применения этого способа в целях контроля качества продуктов на основе американского женьшеня (*P. quinquefolius*).

Применение разработанного подхода позволило установить структуры гинсенозидов, входящих в состав женьшеневого чая (улуна). Анализ выделенной с помощью ВЭЖХ сапониновой фракции методом ЯМР подтвердил правильность полученных результатов.

Практическая значимость. Разработаны способы определения и групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации физиологически активных компонентов женьшеня, входящих в состав большого количества лекарственных средств и пищевых добавок.

Предложен способ пробоподготовки различных образцов растительных материалов и коммерческих продуктов, содержащих женьшень, обеспечивающий эффективное и неразрушающее извлечение гинсенозидов.

Показано, что использование метода ВЭЖХ-МС/МС позволяет проводить надежное обнаружение и оценивать содержание гинсенозидов Rf, F11 и R1 - основных биомаркеров разных видов женьшеней, что может быть использовано для контроля качества и выявления фактов фальсификации растительного сырья и лекарственных средств, содержащих женьшеневые сапонины.

Разработан способ препаративного ВЭЖХ выделения компонентов из женьшеневого чая с масс-спектрометрическим контролем чистоты выделяемых фракций в режиме регистрации хроматограмм по току выбранных ионов. С использованием данного способа возможно получение и исследование отдельных сапонинов, физиологическая активность которых не изучена.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Результаты исследования закономерностей формирования масс-спектров женьшеневых сапонинов при использовании электрораспылительной ионизации и линейной ионной ловушки (ЛИЛ).

2. Подходы и алгоритмы, позволяющие проводить идентификацию структурных фрагментов на основе изученных закономерностей формирования масс-спектров стандартных образцов веществ известной структуры в варианте сканирования с использованием ЛИЛ в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

3. Условия пробоподготовки при определении гинсенозидов в объектах сложного состава: растительном материале и коммерческих продуктах на основе женьшеня.

4. Условия хроматографического разделения и детектирования женьшеневых сапонинов в

варианте ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Результаты обнаружения женьшеневых сапонинов в реальных объектах.

5. Результаты применения метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме регистрации выбранных ионных переходов для обнаружения и селективного определения псевдогинсенозидов F11 и RT5 в присутствии других женьшеневых сапонинов.

6. Результаты исследования сапониновых фракций, выделенных из женьшеневого чая (улуна) в условиях препаративного ВЭЖХ, методами ЯМР и МС.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на международном симпозиуме «8th Annual LC/MS/MS Workshop on environmental applications and food safety» (2012, Барселона, Испания); Всероссийской конференции с международным участием по аналитической спектроскопии (2012, Краснодар, Россия); Ломоносовских чтениях (секция химии) (2013, Москва, Россия); Всероссийской конференции по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу (2013, Краснодар, Россия); международном симпозиуме “39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” (2013, Амстердам, Нидерланды); шестом съезде ВМСО (V Всероссийская Конференция «Масс-Спектрометрия и ее Прикладные Проблемы») (2011, пос. Московский, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в российских и зарубежных журналах и 6 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 179 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 82 рисунка и 23 таблицы, в списке цитируемой литературы 230 источников. Приложение включает 32 рисунка и 1 таблицу на 23 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре, представленном **первой главой**, в соответствующих разделах кратко рассмотрены и обобщены известные данные о тритерпеновых сапонидах, входящих в состав растений из рода *Panax*. Описано большое разнообразие гинсенозидов, присутствующих в различной пропорции в растительном сырье и продуктах на его основе. Приведена информация по способам традиционной обработки корней женьшеня и существующим подходам извлечения и пробоподготовки, применяемых в целях приготовления лекарственных средств и других продуктов, а также для проведения анализа этих объектов. Систематизированы данные о современных способах определения гинсенозидов в растительных материалах и продуктах на основе женьшеня, представленных, главным образом, методиками, основанными на методах газовой и жидкостной хроматографии. Особое внимание уделено методикам целевого и группового определения гинсенозидов с применением масс-спектрометрического детектирования. Отмечены достоинства и недостатки альтернативных подходов, в основном, представляющих собой комбинации ВЭЖХ и ТСХ с другими вариантами детектирования. Изложены актуальные задачи исследования женьшеня, связанные с идентификацией различных видов этого растения, контролем качества женьшеневой продукции, изучением динамики химической трансформации женьшеневых сапонинов и получение информации о структуре метаболитов гинсенозидов в режиме on-line.

Во **второй главе** перечислены реагенты, материалы и аппаратура, использованные в работе, а также описана техника (методики) эксперимента. Использовали следующее хроматографическое оборудование: ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из гибридного тандемного тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), третий квадруполь с функцией работы в режиме линейной ионной ловушки, оснащенного двумя источниками ионизации: источником ХИАД и источником ИЭР (электроспрей) и крана-дозатора; и жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США) с УФ детектором. Систему ВЭЖХ-МС/МС Agilent 6460 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, состоящий из тройного квадрупольного масс-селективного детектора с источником ионизации – ИЭР (ионизация электроспреем), ВЭЖХ насоса, позволяющего работать в режиме градиента высокого давления (до 1200 бар), дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и автосемплера. А также, ЯМР спектрометр: Bruker Avance 600 МГц (Карлсруэ, Германия) в лаборатории ЯМР ИНЭОС РАН.

В работе использовали следующие хроматографические колонки для ОФ ВЭЖХ: Kromasil 100 C18 (4.0×100 мм, 5 мкм) (HiChrom, Великобритания); Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм, 2.2 мкм) и Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм, 3 мкм) (Dionex, США). Для увеличения срока службы колонок использовали универсальные предколонки SecurityGuard (картридж C18, 4×3 мм, Phenomenex, США).

Третья глава посвящена изучению масс-спектрометрического и хроматографического поведения гинсенозидов, а также способов их извлечения из различных объектов со сложной матрицей, в свете аналитического применения масс-спектрометрии для группового и целевого анализа женьшеневого растительного сырья. Основными объектами исследования, среди прочих гинсенозидов, были Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rd, RT5 и F11, поскольку эти соединения являются характерными представителями протопанаксатриольных (ППТ),

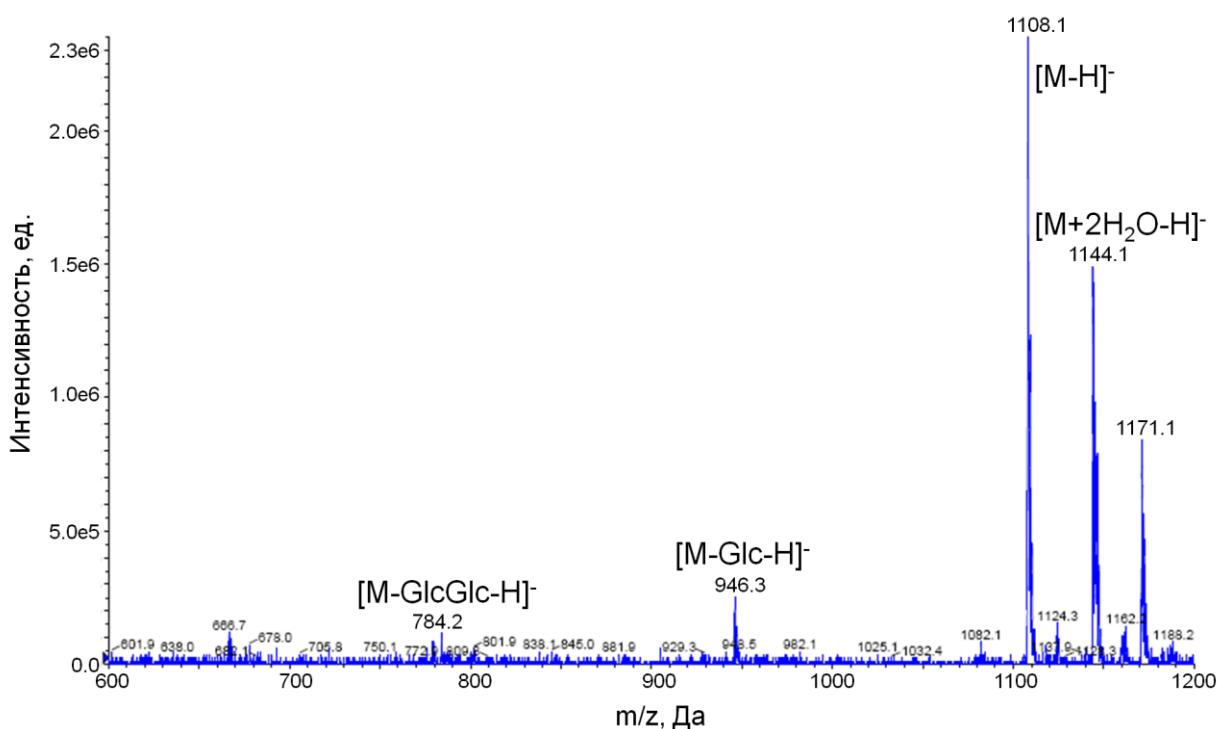


Рис. 1. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора Rb1. Режим ИЭР в варианте регистрации отрицательных ионов.

протопанаксадиольных (ППД) и октиллольных (ОТ) гинсенозидов. Изучали их масс-спектрометрическое поведение в вариантах ХИАД и ИЭР ионизации и регистрации в режиме выбранных ионных переходов и режиме сканирования с использованием ЛИЛ. Согласно экспериментальным данным, использование ИЭР и режима регистрации отрицательно заряженных ионов позволяет получить интенсивные сигналы депротонированных молекул (рис. 1) и их аддукты с молекулами воды.

Для каждого анализата выбирали значения ВП и ПД, при которых интенсивность сигнала депротонированной молекулы была наибольшей. Далее исследовали возможность получения интенсивных сигналов фрагментных ионов в ячейке соударений при разных значениях величины ЭС (табл. 1). Диссоциация, активированная соударением, в случае ППТ и ППД гинсенозидов проходила со значительно меньшим выходом по фрагментным ионам, чем для ОТ гинсенозидов.

Таблица 1. Оптимальные условия детектирования гинсенозидов с использованием ИЭР(-) в режиме регистрации выбранных ионных переходов.

Параметр	Выбранное значение для Rb1	Выбранное значение для Rg1	Выбранное значение для RT5
Потенциал декластеризации (ПД)	-130 В	-80 В	-65 В
Входной потенциал на нулевом квадруполе (ВП)	-10 В	-10 В	-10 В
Энергия соударений (ЭС)	-70 В	-33 В	-30 В
Выбранный ионный переход №1	1107 → 179	799 → 160	653 → 161
Выбранный ионный переход №2	1107 → 946	799 → 475	653 → 491

В варианте ИЭР(+) важной особенностью масс-спектров псевдогинсенозидов – физиологически активных компонентов *P. quinquefolius*, имеющих ОТ сапогенин, было присутствие интенсивного сигнала $[M+H]^+$. Образование этого иона, вероятней всего, происходит за счет протонирования атома кислорода, входящего в состав молекулы ОТ пятичленного цикла (рис. 2). Была показана возможность получения характеристических фрагментных ионов из $[M+H]^+$ при ДАС.

Результаты исследования показали, что для МС детектирования псевдогинсенозидов F11 и RT5 необходимо использовать близкие по величине значения ПД и ВП на нулевом квадруполе, которые оказались равны, соответственно, 50 и 8 В. Для количественного анализа следует использовать самый интенсивный ион (m/z 143), а для качественного – характерный для ОТ сапогенина ион с m/z 439. Таким образом, выбрали два ионных перехода с m/z 801→143 и 801→439 для регистрации F11, а для псевдогинсенозида RT5 – переходы с m/z 655→143 и 655→439. Для получения максимального аналитического сигнала необходимо задавать значение ЭС на уровне 30 В для все четырех выбранных ионных переходов. В результате

экспериментов для разделения F11 и RT5 наилучшим оказалось изократическое элюирование 32 % раствором ацетонитрила в деионизированной воде с добавкой 0.34 % муравьиной кислоты (табл. 2).

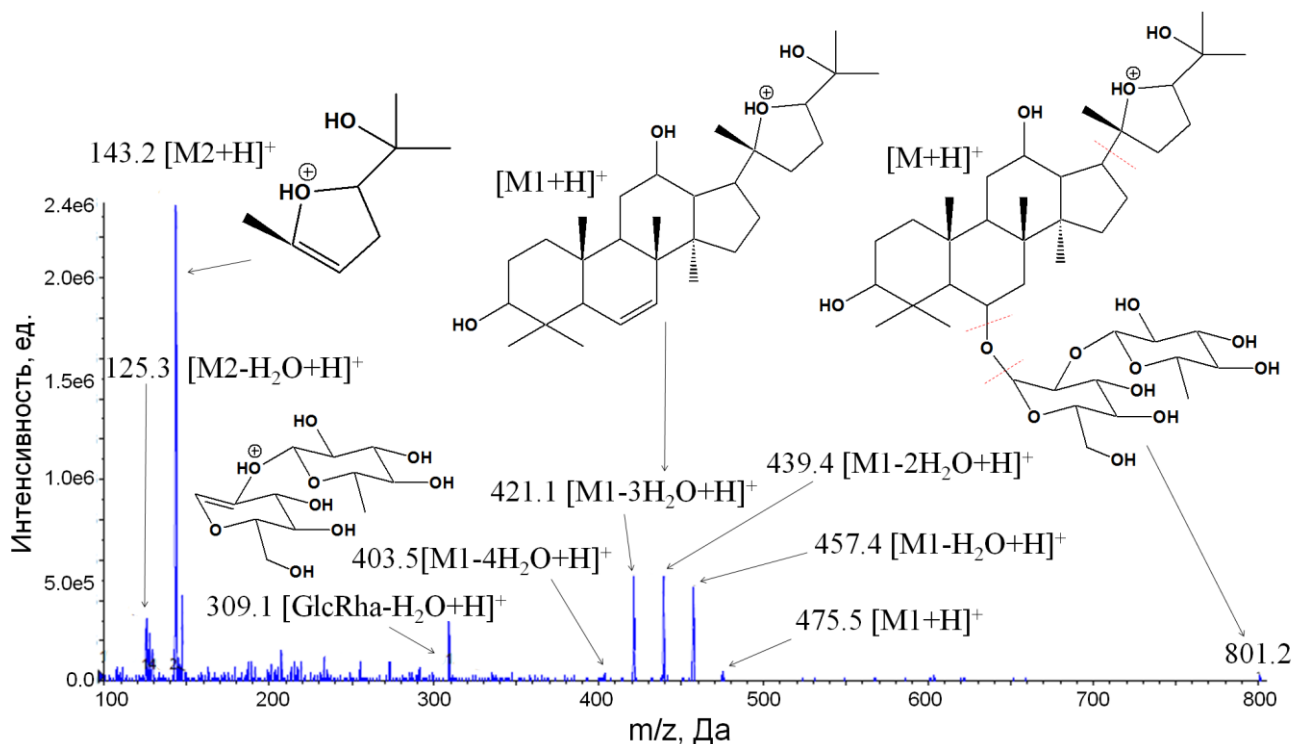


Рис. 2. Спектр фрагментных ионов и их структуры для депротонированной молекулы F11 с $m/z=801$ в варианте ИЭР(+). $M = 800$ Да, $M1 = 474$ Да, $M2 = 142$ Да.

Альтернативой режиму регистрации выбранных ионных переходов служит сканирование с использованием ЛИЛ тройного квадрупольного масс-анализатора, в специальном режиме сканирования с использованием ЛИЛ. В источнике ИЭР происходит образование протонированных молекул и аддуктов, а также их фрагментов, после чего эти ионы проходят через нулевой и первый квадруполь, далее идет ДАС во втором квадруполе и, наконец, образовавшиеся ионы накапливаются в третьем квадруполе, функционирующем в качестве ЛИЛ. Затем стабилизированные в ЛИЛ ионы порциями (с определенным m/z) перемещаются к

Таблица 2. Хроматографические параметры при разделении F11 и RT5 на колонке Acclaim RSLC C18.

Параметры Соединение	Время удерживания, мин	Коэффициент емкости*	Разрешение пиков	N, ТТ/м
F11	4.1	5.1	1.0	2500
RT5	4.5	5.6	1.0	750

* – мертвое время колонки (t_m) составляет 0.80 мин.

детектору за счет приложения соответствующего выходного потенциала. При этом наблюдается лучшее соответствие сигналов в масс-спектрах теоретическим значениям масс веществ и их фрагментов, и увеличение относительной интенсивности «полезных» сигналов к

шуму, по сравнению с масс-спектрами, получаемыми в режиме сканирования на первом квадруполе. Для получения максимального аналитического сигнала, так же как и в случае регистрации выбранных ионных переходов, выбирали величины ВП и ПД, при которых наблюдались наибольшие площади пиков гинсенозидов Rg1 и Rb1 на хроматограммах стандартных растворов (рис. 3).

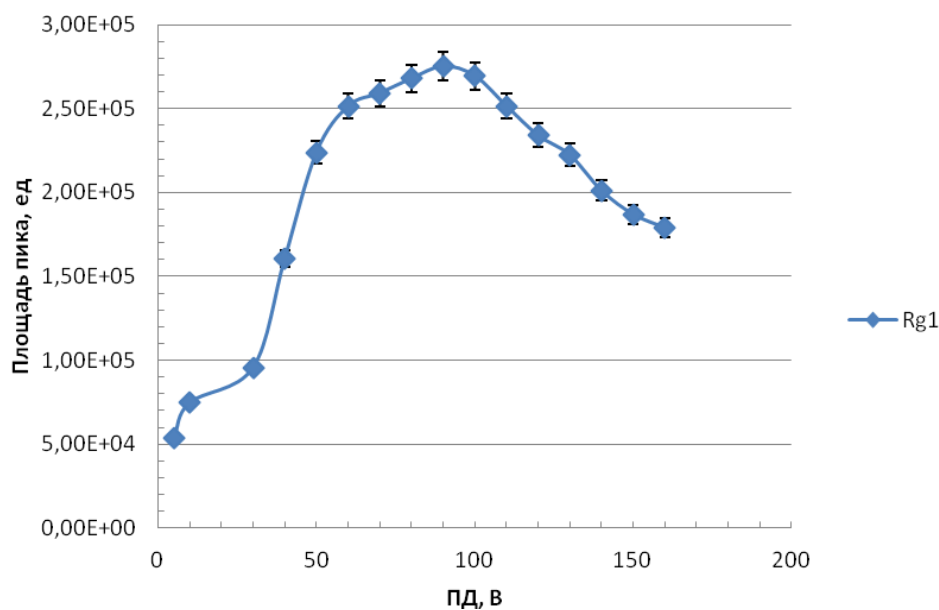


Рис. 3. Зависимость площади пика гинсенозида Rg1 от заданной величины ПД при масс-спектрометрическом детектировании в режиме сканирования ($n=3$, $P=0.95$).

В экспериментах со стандартными растворами 17 гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ было установлено, что даже при минимальном значении ЭС в масс-спектрах присутствуют интенсивные фрагментные ионы, образующиеся в источнике ИЭР и при декластеризации, а интенсивность сигналов аддуктов молекул гинсенозидов сильно уменьшается при увеличении ЭС. Таким образом, для регистрации масс-спектров женьшеневых сапонинов в выбранном режиме сканирования использовали следующие величины параметров: ВП – 10 В, ПД – 70 В и ЭС – 5 В.

Для одновременного определения гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ были выбрали условия хроматографического разделения 17 стандартных сапонинов в варианте градиентного элюирования. В случае гинсенозидов, проявляющих слабые кислотные свойства, оптимально использование сильнокислых подвижных фаз, что позволяет перевести аналиты в форму протонированных молекул или аддуктов с находящимися в растворе катионами металлов. Таким образом, в качестве элюентов были выбраны ацетонитрил (элюент В) и 0.5% водный раствор муравьиной кислоты (элюент А). В результате исследований был предложен следующий режим градиентного элюирования: после 3 минутного отрезка элюирования 20% раствором В, концентрацию ацетонитрила линейно изменяли от 20% до 40% в течение 22 мин; далее за 10 мин линейно увеличили концентрацию элюента В до 75%; 100% концентрация В, достигнутая за 1 мин, поддерживалась постоянной на протяжении 4 мин, перед каждым анализом колонку промывали подвижной фазой с начальным соотношением

элюентов А и В (4:1) в течение 5 мин. В качестве неподвижной фазы, используемой для хроматографического разделения, был выбран сорбент на основе силикагеля, модифицированный группами Acclaim RSLC C18 (рис. 4). Температура термостата колонки составляла 25 °С, объем вводимой пробы – 0.020 мл.

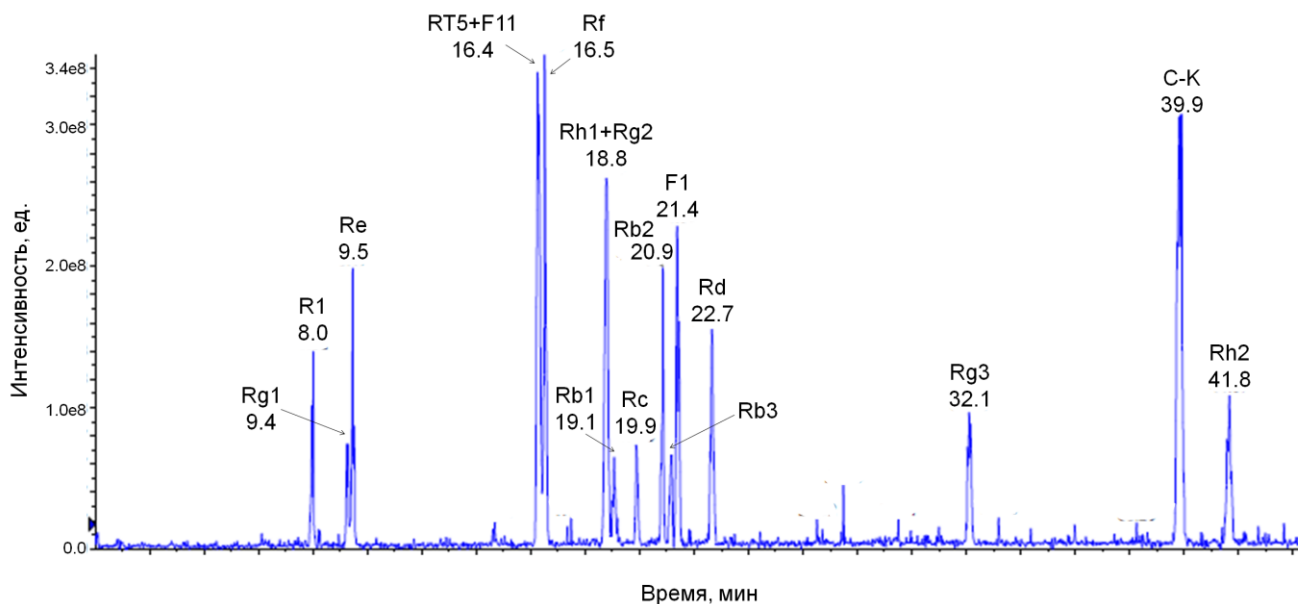


Рис. 4. Хроматографическое разделение гинсенозидов в выбранных условиях градиентного элюирования на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 3 мкм.

В выбранных условиях псевдогинсенозиды F11 и RT5, а также гинсенозиды Rg2 и Rh1 имеют одинаковые времена удерживания, а разрешение для всех остальных пар пиков превышало значение 0.7.

Проведенные эксперименты показали, что для оценки содержания в смеси или образце гинсенозидов с ППТ сапогенинами, например Rg1, Rf и Re, следует использовать ионы с m/z 459.4, 441.4, 423.4 и 405.5, а для гинсенозидов с ППД сапогенинами, например Rb1, были выбраны ионы с m/z 443.4, 425.4 и 407.5. Эти наборы ионов не только являются характеристичными для ППД и ППТ гинсенозидов, но и являются самыми интенсивными в масс-спектрах, получаемых в режиме сканирования с использованием ЛИЛ. Для увеличения чувствительности можно использовать режим селективной регистрации выбранных ионов, однако получаемые в таком случае пределы обнаружения оказываются в 2–3 раза выше, чем в случае сканирования с использованием ЛИЛ (табл. 3).

Помимо разработки способов МС детектирования и количественной оценки содержаний гинсенозидов, одной из проблем, рассмотренных в данной главе, было создание быстрого способа извлечения женьшеневых сапонинов из растительного сырья и коммерческих продуктов. При этом известно, что во время переработки растительного материала, производстве лекарственных средств и других продуктов, а также некоторых стадий пробоподготовки при их анализе, гинсенозиды могут претерпевать химические превращения. Аналогичные процессы происходят при производстве лекарственных средств и других продуктов на основе женьшеня. Во время анализа растительного сырья и таких продуктов применяют различные способы пробоподготовки, что также приводит к изменению состава и структуры гинсенозидов.

Была изучена возможность извлечения гинсенозидов с использованием ультразвука в различных условиях без последующего упаривания и перерастворения экстракта. Для этого было изучено влияние на эффективность извлечения таких факторов, как: состав растворителя, объем смеси, используемой в качестве растворителя, и число последовательных актов экстрагирования (рис. 4,5).

Таблица 3. Метрологические характеристики предложенного подхода определения гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.

Вещество	Диапазон линейности, мкг мл ⁻¹	Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r ²	Предел обнаружения*, мкг мл ⁻¹
Rg1	0.02–5	$y = 5.0 \times 10^7 x + 5.4 \times 10^6$	0.9924	0.006
Rf	0.01–5	$y = 10.2 \times 10^7 x + 4.5 \times 10^6$	0.9985	0.003
Re	0.03–5	$y = 3.2 \times 10^7 x + 1.4 \times 10^6$	0.9977	0.009
Rb1	0.04–5	$y = 1.4 \times 10^7 x + 0.3 \times 10^6$	0.9999	0.01

* – предел обнаружения при соотношении сигнал/шум равном 3

В результате экспериментов было выяснено, что для ускорения процедуры пробоподготовки и скрининговых анализов коммерческих продуктов достаточно проводить однократное извлечение 10 мл растворителя, поскольку в таком случае потери аналитов не превышают 10–15 % в сравнении с многократным извлечением тем же растворителем. Использование ультразвуковой экстракции при 30 °С не позволяет полностью извлекать сапонины из растительной матрицы, однако сильное нагревание и смена растворителя во время пробоподготовки приводит к резкому уменьшению площадей пиков основных гинсенозидов и возникновению большого числа пиков примесей на хроматограммах. Таким образом, несмотря на то, что извлечение 50–70 % растворами метанола и этанола в 1.5–2 раза эффективнее

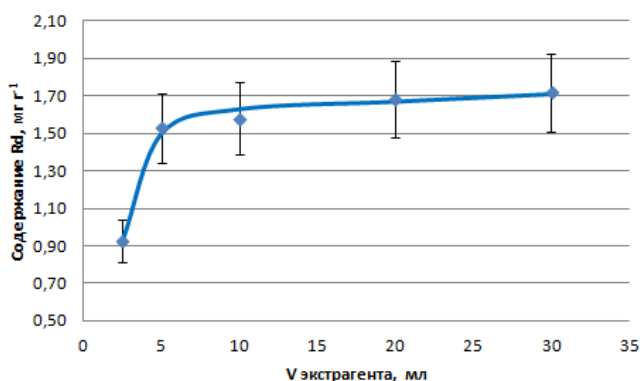


Рис. 4. Зависимость содержания гинсенозида Rd от объема растворителя. Объемы 20 и 30 мл добавляли порциями по 10 мл.

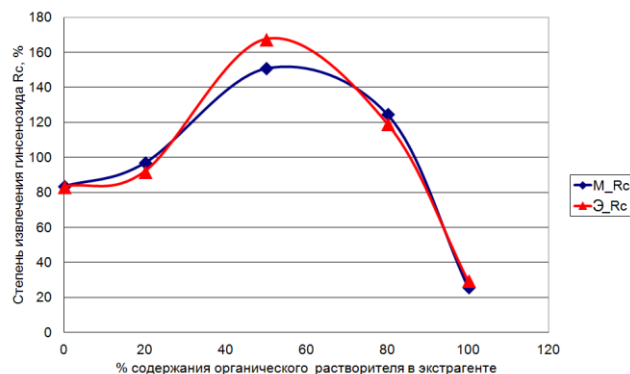


Рис. 5. Зависимость степени извлечения* от концентрации органического растворителя в экстрагенте для гинсенозидов Rg1 и Rb1 (M – метанол, Э – этанол).

* – за 100% принимали значение концентрации гинсенозидов после 3-х последовательных экстракций 10 мл 20% раствора метанола в воде.

экстракции 20 % метанолом, использование смеси метанол:вода (1:4) оказывается наиболее удачным, поскольку состав смеси максимально близок к начальному составу подвижной фазы в выбранных условиях ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Применимость предложенного способа извлечения проверяли по методу «введено–найдено». Для этого к трем навескам корня женьшеня и трем пробам *Rhodiola rosea* была сделана добавка 100 мкл стандартных образцов гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc с концентрацией 400, 600 и 700 мг л⁻¹, соответственно.

Из таблицы 4 видно, что для двух исследованных образцов с добавкой наблюдается почти полное извлечение гинсенозидов, это связано с тем, что добавленные в виде раствора гинсенозиды находятся в несвязанной форме на поверхности растительного материала, поэтому они практически полностью смываются органическим растворителем во время экстрагирования. При использовании извлечения в ультразвуковом поле при 30 °С гинсенозиды Rb1 и Rc не превращались в гинсенозиды Rg3 и Rh2.

Таблица 4. Содержание гинсенозидов в образцах растительного материала и образцах с добавкой ($N=3$, $P=0.95$)

Образец \ Гинсенозид	Гинсенозид Rg1		Гинсенозид Rb1		Гинсенозид Rc	
	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %
Корень сухой	7.9 ± 0.2	-	45 ± 1	-	9.1 ± 0.2	-
Корень сухой с добавкой	18.1 ± 0.4	98.8	50 ± 1	94.4	14.5 ± 0.3	99.1
Модельный образец с добавкой	10.9 ± 0.2	106.9	4.4 ± 0.1	79.3	4.8 ± 0.1	86.6
Стд. водный раствор*	10.2 ± 0.2	-	5.5 ± 0.1	-	5.5 ± 0.1	-

* – за 100% принимали значение концентрации гинсенозидов

Четвертая глава посвящена основным принципам интерпретации масс-спектров гинсенозидов и созданию алгоритма получения структурной информации о сапонилах, входящих в состав растительного сырья и коммерческих продуктов на основе женьшеня. Каждый масс-спектр гинсенозида, полученный в выбранных условиях сканирования с использованием ЛИЛ, можно, условно, разделить на три области. В первой области расположены сигналы протонированной молекулы, молекулярных аддуктов с натрием и калием, сигналы однозарядных кластеров из двух молекул сапонины, а также сигналы, соответствующие фрагментным ионам, образовавшимся путем отщепления сахаридных заместителей. Во второй области расположены сигналы фрагментных ионов сапогенина с потерей некоторого числа молекул воды, протонированных боковых цепей, а также крупные

фрагменты сапогенина. В третьей области, с небольшими значениями m/z , присутствуют важные для интерпретации масс-спектра сигналы моносахаридных фрагментов и других заместителей, а также фрагменты сапогенина. Из значений m/z сигналов натриевого и калиевого аддуктов можно вычислить молекулярную массу (M) гинсенозида. Формирование положительного заряда также может происходить при протонировании свободных от заместителей гидроксильных групп с отщеплением одной или нескольких молекул воды, например, в случае гинсенозида Rh1 (рис. 6).

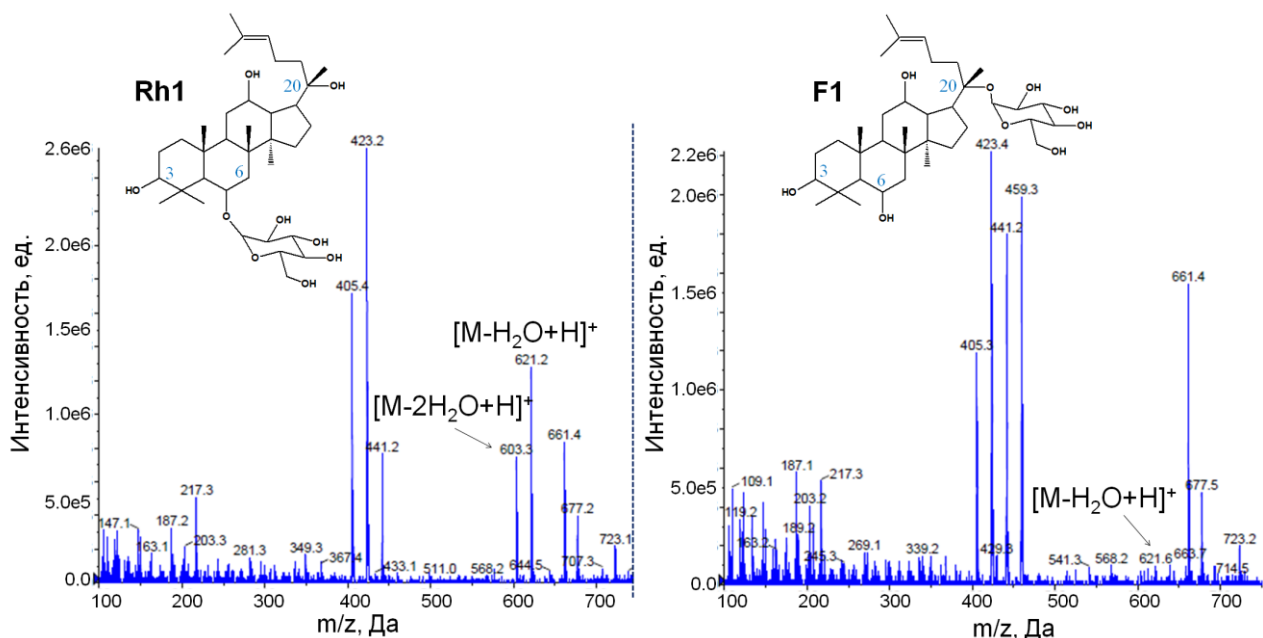


Рис. 6. Масс-спектры гинсенозидов Rh1 и F1, полученные в режиме сканирования в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

В гинсенозидах, содержащих в своем составе два или более сахаридных остатка, например Rg1 и Rf, вероятность отщепления одного глюкозного фрагмента (Glc) от молекулы, где они расположены в разных позициях (Rg1), больше, чем в случае гинсенозида Rf, в котором оба остатка образуют единую сахаридную цепь, и появляется возможность отщепления всей цепи путем разрыва одной глюкозидной связи. Таким образом, сигналы, относящиеся к потере одного из глюкозных остатков и, дополнительно, имеют большую относительную интенсивность в масс-спектре гинсенозида Rg1. Гинсенозиды Re и Rd, имеющие одинаковую молекулярную массу, представляют две подгруппы – ППТ и ППД гинсенозидов, соответственно. Наличие дополнительной гидроксильной группы в положении 6 у ППТ гинсенозидов увеличивает полярность, поэтому на хроматограмме (рис. 4) эти два изомерных гинсенозида разделены на 14 мин. Однако различить их можно и на основе масс-спектров. Так, ППД гинсенозид Rd при фрагментации в источнике ИЭР или при ДАС образует положительно заряженный ион с m/z 443. Аналогично при отщеплении дополнительно 1 или 2 молекул воды образуются ионы с m/z 425 и 403 соответственно. Во второй области масс-спектров гинсенозидов Rd и Re, таким образом, располагаются серии сигналов, отвечающих строению их сапогенина.

В масс-спектре гинсенозида Rb1 (рис. 7) пара сигналов с m/z 985 и 969 свидетельствует о возможности отщепления глюкозного заместителя с сохранением свободной ОН-группы

(масса уходящего фрагмента 162 а.е.м.) и структуры калиевого и натриевого аддуктов, соответственно ($1147 - 162 = 985$, $1131 - 162 = 969$). Другая пара сигналов с m/z 947 и 929 соответствует фрагментации исходной протонированной молекулы с отщеплением глюкозного остатка в положении C20 (без и с отсоединением молекулы воды, соответственно), таким образом, можно установить, что в молекуле, рассматриваемого гинсенозида присутствует две боковые сахаридные цепочки, оканчивающиеся глюкозой.

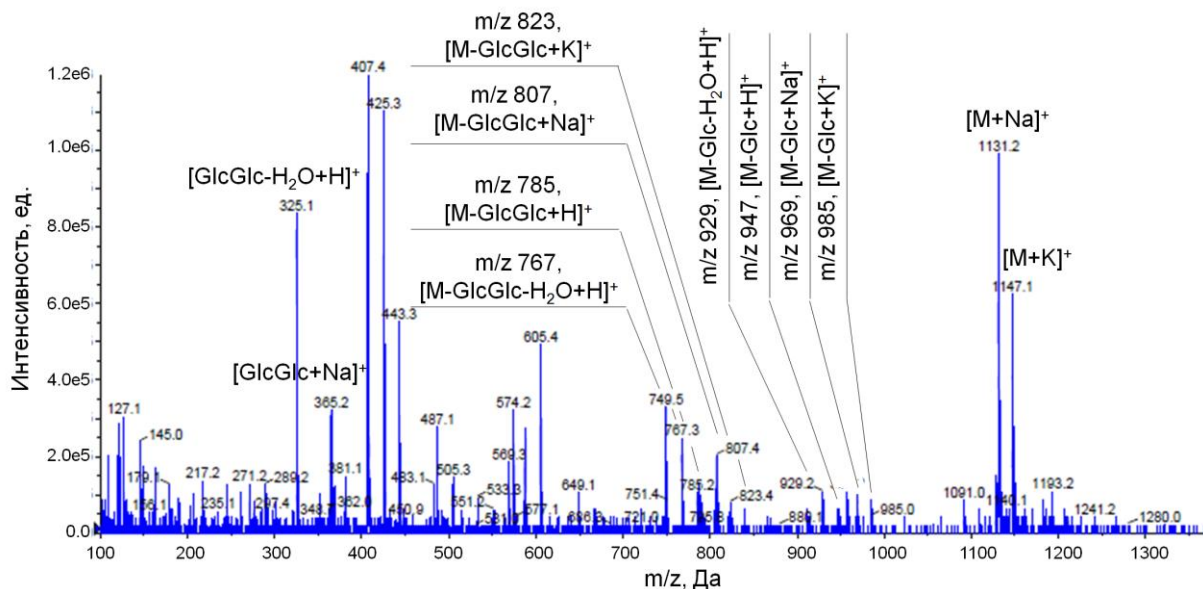


Рис. 7. Масс-спектр гинсенозида Rb1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования с использованием ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

Далее наличие сигналов с m/z 823 и 807 указывает на возможность отщепления цепочки из двух глюкозидных моносахаридов, присоединенной в положении C3, с сохранением целостности связи молекулы с атомами калия и натрия, соответственно ($985 - 162 = 823$, $969 - 162 = 807$). Аналогично рассуждая можно заключить, что из наличия сигналов с m/z 785 и 767 следует, что боковая цепь в положении C20 идентична боковой цепи в положении C3 и содержит два глюкозидных остатка.

После вычисления M гинсенозида и установления типа и числа сахаридных заместителей в молекуле, в рамках разработанного алгоритма получения структурной информации из масс-спектра женьшеневого сапонина, проводится расчет M_s (массы сапогенина гинсенозида) путем вычитания из M масс всех найденных сахаридных остатков. Для исследованных стандартных ППТ, ППД и ОТ производных гинсенозидов M_s равны 476, 460 и 492 соответственно. Поскольку значения M_s для гинсенозидов с изомерными сапогенинами совпадают, следует обратить внимание на присутствие интенсивного сигнала протонированной молекулы в масс-спектре. Таким образом, отношение интенсивностей сигналов протонированной молекулы гинсенозида и натриевого аддукта ($I_{H/Na} = I_{[M+H]^+}/I_{[M+Na]^+}$) будет еще одним характеристичным параметром, особенно значимым при идентификации псевдогинсенозидов.

Тип сапогенина гинсенозида можно установить по наличию характеристических сигналов в паттерне фрагментации (рис. 8). Как видно из таблицы 5 сигналы в паттернах фрагментации различных сапогенинов могут совпадать, кроме того, можно предположить, что в

случае дегидратированного ППТ сапогенина будут наблюдаться те же сигналы, что и для ППТ, поскольку все его фрагментные ионы образуются с потерей молекулы воды и образованием двойной связи в положении C20 (рис. 8).

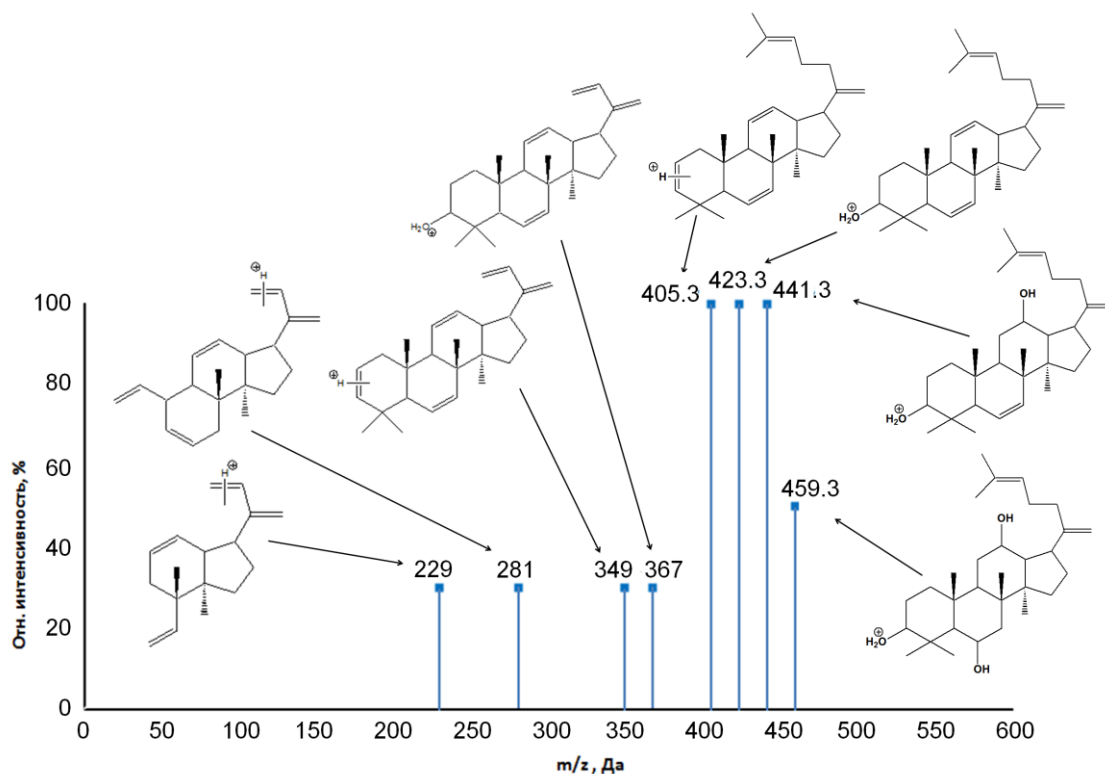


Рис. 8. Паттерн фрагментации ППТ сапогенина.

Таблица 5. Характеристические сигналы из паттернов фрагментации сапогенинов.

Сапогенин	Число сигналов	Сигналы, m/z
ППТ	8	459, 441, 423, 405, 367, 349, 281, 229
ППД	7	443, 425, 407, 369, 351, 283, 231
ОТ	8	475, 457, 439, 421, 403, 143, 125, 107
ОАК*	4	457, 439, 393, 249

* – паттерн фрагментации ОАК сапогенина предложен на основе масс-спектров сапонинов из исследованных образцов корней женьшеня и коммерческих продуктов

Дополнительным источником информации о структуре гинсенозида может служить его время удерживания (t_R) на хроматограмме. Полярность гинсенозидов зависит от типа сапогенина, а также числа, положения и структуры заместителей. Так, было установлено, что в ряду сапогенинов удерживание на ОФ колонках увеличивается в ряду:



А в ряду заместителей, где Ara(f) – арабинофуранозный, Ara(p) – арабинопиранозный, Xyl – ксилонный, а Rha – рамнозный остатки, выполняется следующая закономерность удерживания от числа и типа моносахаридных остатков:



Таким образом, алгоритм ВЭЖХ-МС/МС идентификации структурных фрагментов неизвестных гинсенозидов в варианте ИЭР(+) сводится к вычислению M гинсенозида из значений m/z сигналов натриевого и калиевого аддуктов и установлению по характеристичным сигналам фрагментов в масс-спектре типа и числа сахаридных заместителей в молекуле, с последующим расчетом M_s . По значениям M_s , $I_{H/Na}$ и совпадению сигналов в масс-спектре с полученными в эксперименте для стандартных образцов паттернами фрагментации сапогенинов проводится классификация неизвестного гинсенозида по типу сапогенина. Дополнительным источником информации, полезным при идентификации изомерных гинсенозидов может служить время удерживания на ОФ колонках. При отсутствии стандартных образцов гинсенозидов с измененным сапогенином предположение их структур, используя данный алгоритм, можно сделать, исходя из наблюдаемого паттерна фрагментации сапогенина, однако для достоверной идентификации необходимо использовать метод встречного синтеза или спектроскопию ЯМР с предварительным выделением из образца фракции, содержащей неизвестный компонент.

Пятая глава посвящена проверке разработанных способов обнаружения и оценки содержаний гинсенозидов, извлеченных из растительного сырья и продуктов на его основе в выбранных условиях проведения экстрагирования. Содержания сапонинов были определены с использованием градуировочных зависимостей (табл. 3). Наибольшие концентрации гинсенозидов Rg1 и Rf – основных маркеров *P. ginseng* были определены в экстракте из корня женьшеня, собранного и высушенного на Дальнем Востоке. Высокие концентрации гинсенозидов, обнаруженные в измельченных образцах свежего корня женьшеня, по сравнению с не измельченным, свидетельствуют о большей эффективности извлечения из измельченных образцов корня. Содержания основных гинсенозидов в коммерческих продуктах оказалось меньше, по сравнению с экстрактами из растительного материала, однако число обнаруженных сапонинов, имеющих измененный сапогенин оказалось большим.

Предложенная в работе система классификации по паттернам фрагментации ППТ, ППД и ОТ сапогенинов, при использовании тестового набора данных, состоящего из масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в тестовой смеси и масс-спектров тех же 17 соединений, обнаруженных в экстрактах, позволяет правильно классифицировать ППТ, ППД и ОТ гинсенозиды (рис. 9). Для гинсенозидов, имеющих ОАК сапогенин, паттерн фрагментации будет сильно отличаться (табл. 5), поэтому такие гинсенозиды не будут ложно классифицированы в выбранной системе переменных (рис. 10).

Для проверки разработанного способа определения псевдогинсенозидов с детектированием в режиме регистрации выбранных ионных переходов были проанализированы образцы экстрактов из высушенного корня растения *P. ginseng* и коммерческого образца высушенных колец корня *P. quinquefolius*. Извлечение проводили 20% раствором метанола в воде.

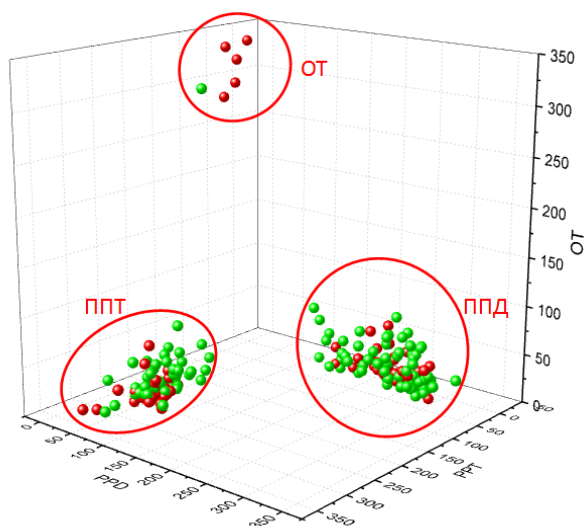


Рис. 9. Тестовая выборка масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в пространстве трех заданных координат*; обнаруженные в экстрактах гинсенозиды с ППТ, ППД и ОТ сапогенинами.

* – выбранные в качестве независимых переменных (признаков) относительные интенсивности сигналов из паттернов фрагментации были объединены в три новые переменные – суммы для ППТ, ППД и ОТ сапогенинов.

В одном из образцов сухого корня азиатского женьшеня была обнаружена примесь псевдогинсенозида F11 (табл. 8). Этот факт был подтвержден с применением разработанного подхода детектирования гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ (табл. 6).

Таблица 8. Содержания псевдогинсенозидов F11 и RT5 в образцах корня женьшеня (N=3, P=0.95)

Образец	Содержание F11, мкг г ⁻¹	Содержание RT5, мкг г ⁻¹
Кольца корня <i>P. quinquefolius</i>	200±20	< ПО*
Женьшень сухой «Сибирь»	76±7	На уровне ПО*
Женьшень сухой «Брянская область»	< ПО*	< ПО*

* – пределы обнаружения (при соотношении сигнал/шум равном 3) для псевдогинсенозидов F11 и RT5 в режиме регистрации выбранных ионных переходов составили 20 и 10 нг мл⁻¹ соответственно

Отдельно были исследованы образцы женьшеневого чая (Улуна). В состав этого объекта входит чайный лист и экстракт из корня женьшеня. Получаемые в ходе процесса ферментации чая соединения могут отличаться от исходных женьшеневых сапонинов. На сегодняшний день в литературе отсутствуют упоминания о структуре сапонинов, входящих в состав подобных Улуну продуктов, поэтому в целях уточнения структуры этих соединений было решено применить метод ЯМР. ВЭЖХ-МС/МС анализ двух образцов чая, приобретенных в России и Китае, показал, что в их составе присутствуют соединения близкие по структуре женьшеневым сапонином (рис. 11).

Паттерн фрагментации сапогенина X, одинаковый для нескольких сапонинов, обнаруженных в образцах, отличается наличием двух серий сигналов (с m/z 439→421→403 и m/z 485→467→449→431) с последовательным отщеплением молекул воды.

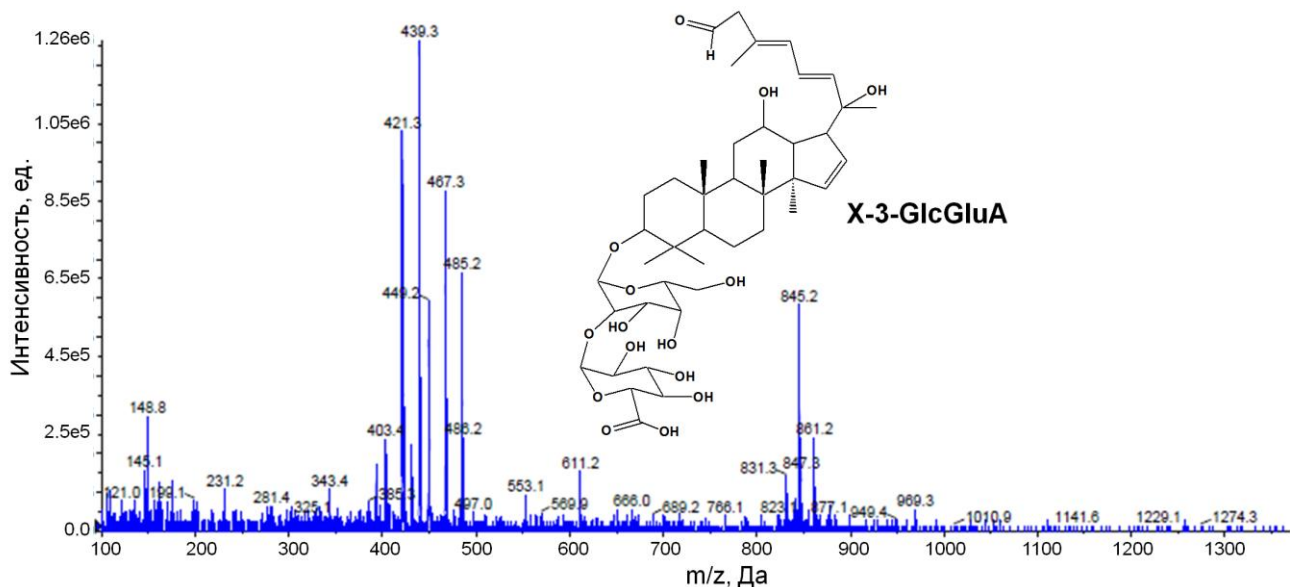


Рис. 11. Масс-спектр самого интенсивного пика ($t_R=27.75$), присутствующего на хроматограммах женьшеневого чая.

Для уточнения структуры этих веществ разработали способ препаративного выделения фракции, масс-спектр которой представлен на рисунке. Отбор фракции осуществляли путем переключения крана-дозатора на входе в МС детектор. Согласно результатам ВЭЖХ-МС/МС экспериментов в исследованных образцах женьшеневого чая содержатся сапонины с различными заместителями (табл. 9).

Таблица 9. Сокращенные структурные формулы неизвестных компонентов чая на основе женьшеня

Образцы	Женьшеневые сапонины
Женьшеневый чай (Huanglongtai tea co., ltd., Китай)	X-3-GlcGluA, X-20-GluA-3-Glc(Mal), X-3-Glc(Mal)GluA, X-20-Glc-3-Glc(Mal), X-20-GluA-3-Glc(Ac), X-20-Glc-3-Glc(Ac), X-3-Glc(Ac)GluA, X-Glc-3-Glc(Ac)Glc
Женьшеневый чай (Леаланис, Россия)	X-3-GlcGluA, X-3-Glc(Mal)GluA, X-20-Glc-3-Glc(Ac), X-3-Glc(Ac)GluA, X-Glc-3-Glc(Ac)Glc
Женьшеневый чай (Niktea, Россия)	X-3-GlcGlc, X-3-GlcGluA, X-20-GluA-3-Glc(Mal), X-3-Glc(Mal)GluA, X-20-Glc-3-Glc(Mal), X-20-Glc(Mal)-3-Glc, X-20-Glc-3-Glc(Mal), X-20-GluA-3-Glc(Ac), X-20-Glc-3-Glc(Ac), X-3-Glc(Ac)GluA, X-Glc-3-Glc(Ac)Glc

* – GluA – остаток глюкуроновой кислоты.

Таблица 10. Спектральные данные ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O (δ в м.д.)

Положение	δ_{H}	δ_{C}	Положение	δ_{H}	δ_{C}
1	1.74-1.82 (1H, м)	29.5	21	1.60 (3H, с.)	18.2
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		22	5.00-5.04 (1H, м.)	127.0
2	2.25-2.40 (1H, перекр.)	45.3	23	5.02-5.07 (1H, д.)	128.6
	1.79-1.91 (1H, м.)		24	5.30-5.38 (1H, д.)	132.2
3	3.92-4.01 (1H, м.)	77.4	25	-	126.1
4	-	48.1	26	1.94 (3H, с.)	19.4

Таблица 10. Спектральные данные ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O (δ в м.д.) (Продолжение)

Положение	δ_{H}	δ_{C}	Положение	δ_{H}	δ_{C}
5	0.80-0.95 (1H, перекр.)	33.1	27	2.41-2.54 (1H, перекр.)	52.9
6	1.60-1.69 (1H, перекр.)	27.4		2.02-2.10 (1H, перекр.)	
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		28	1.18 (3H, с.)	31.0
7	1.69-1.74 (1H, перекр.)	25.5	29	1.50 (3H, с.)	17.2
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		30	1.03 (3H, с.)	14.8
8	-	41.5	31	-	160.1
9	0.80-0.95 (1H, перекр.)	32.2	1'	4.40-4.48 (1H, перекр.)	103.0
10	-	40.6	2'	4.28-4.34 (1H, перекр.)	80.3
11	2.25-2.40 (1H, перекр.)	35.5	3'	4.14-4.19 (1H, м.)	76.2
	1.82-1.93 (1H, м.)		4'	3.70-3.74 (1H, м.)	72.6
12	2.62-2.71 (1H, м.)	70.2	5'	3.61-3.70 (1H, перекр.)	70.8
13	2.21-2.25 (1H, м.)	44.1	6'	4.28-4.34 (1H, перекр.)	61.4
14	-	53.2		4.01-4.08 (1H, перекр.)	
15	4.72-4.80 (1H, перекр.)	124.1	1''	4.47-4.58 (1H, перекр.)	105.0
16	4.72-4.80 (1H, перекр.)	124.9	2''	4.34-4.40 (1H, м.)	76.7
17	2.41-2.54 (1H, перекр.)	49.1	3''	4.19-4.23 (1H, м.)	75.1
18	0.74 (3H, с.)	13.3	4''	4.01-4.08 (1H, перекр.)	71.8
19	0.92 (3H, с.)	14.6	5''	3.61-3.70 (1H, перекр.)	70.7
20	-	70.2	6''	-	175.0

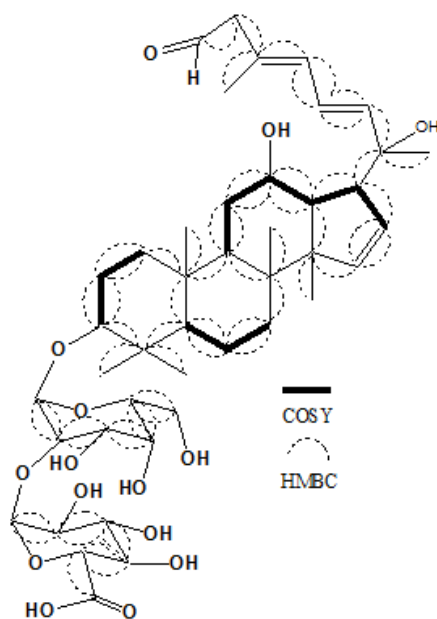


Рис. 12. ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^{13}C HMBC корреляции, полученные из ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) спектров фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

Анализ методом ЯМР проводили после лиофильной сушки 90 мл собранной фракции № 2 (рис. 11) и растворения осадка в дейтеро-пиридине. Сопоставление спектральных данных ПМР и ^{13}C ЯМР (табл. 10), а также кросс-сигналы в корреляционных экспериментах ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^{13}C НМВС подтвердили правильность сделанных по МС данным предположений о структуре сапогенина X (рис. 12).

ВЫВОДЫ

1. Изучены закономерности формирования масс-спектров женьшеневых сапонинов при использовании электрораспылительной ионизации и линейной ионной ловушки (ЛИЛ). Показано, что использование ЛИЛ позволяет получать высокоинформативные масс-спектры, содержащие характеристичные сигналы молекулярных и фрагментных ионов.

2. Разработан алгоритм, позволяющий проводить идентификацию структурных фрагментов определяемых соединений по их масс-спектрам. Выделены паттерны фрагментации для трех основных сапогенинов (ППТ, ППД и ОТ) и, на основе экспериментальных данных, предложен паттерн фрагментации олеанолового кислотного сапогенина.

3. Показана возможность применения метода ВЭЖХ-МС/МС для совместного определения ППТ, ППД и ОТ гинсенозидов в режиме градиентного элюирования. Выбраны условия совместного определения 17 гинсенозидов с пределами обнаружения 1-10 нг/мл. Показана высокая селективность разделения производных в случае изомерных гинсенозидов с различными сапогенинами, и низкая – в случае гинсенозидов, отличающихся наличием рамнозного сахаридного остатка.

4. Разработан способ извлечения гинсенозидов из растительного сырья смесью метанол:вода (1:4) в ультразвуковом поле. Показано, что во время экстрагирования не происходит разрушения структуры аналитов.

5. Разработан быстрый способ селективного ВЭЖХ-МС/МС определения псевдогинсенозидов RT5 и F11 в присутствии других женьшеневых сапонинов в режиме регистрации выбранных ионных переходов в условиях электрораспылительной ионизации. Пределы обнаружения RT5 и F11 составляют 10 и 20 нг/мл, что позволяет проводить определение псевдогинсенозидов в растительном сырье и продуктах на его основе.

6. Применение разработанного подхода позволило установить структуры гинсенозидов, входящих в состав женьшеневого чая (улуна). Анализ выделенной с помощью ВЭЖХ сапониновой фракции методом ЯМР подтвердил правильность полученных результатов.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. *A.N. Stavrianiidi, I.A. Rodin, A.V. Braun, O.A. Shpigun.* The use of linear ion trap for qualitative analysis of phytochemicals in Korean ginseng tea. // *Biomed. Chrom.* 2012. Vol. 27. № 6. P. 765-774.

2. *А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, О.А. Шпигун.* Современные способы идентификации и определения гинсенозидов. // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* 2013. Т. 54. № 3. С. 135-153.

3. *А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, О.А. Шпигун, Е.И. Беризовская.* Одновременное определение гинсенозидов методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. // Масс-спектр. 2013. Т. 10. № 2. С. 129–135.

4. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, О.А. Шпигун. Быстрый способ ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа. // Анал. Контр. 2013. Т. 17. № 4. С. 459-464.

5. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, Е.А. Стеколыщикова, О.А. Шпигун. Определение биомаркеров *P. quinquefolius* в растительных материалах и коммерческих продуктах комбинированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. // Масс-спектр. 2014. Т. 11. № 1. С. 45–52.

6. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, О.А. Шпигун. Новые подходы к групповой идентификации Гинсенозидов и других компонентов в лекарственном растительном сырье методом жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. / Материалы «Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием», Краснодар, 23-29 сентября 2012 г., С. 207.

7. A.N. Stavrianiidi, I.A. Rodin, A.V. Braun, O.A. Shpigun. Standard-free qualitative analysis of ginsenosides in plants by HPLC-MS/MS. / Abstract book of 8th Annual LC/MS/MS Workshop on environmental applications and food safety, Barcelona, Spain, 2-4 July 2012. P. 217.

8. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун. Определение и идентификация физиологически активных веществ в биологических объектах методом УВЭЖХ-МС/МС. / Ломоносовские чтения секция химии, Москва, 15 - 23 апреля 2013 г. С. 6.

9. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун. Новые подходы к групповой идентификации гинсенозидов в лекарственном растительном сырье методом жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. / Материалы «Всероссийской конференции по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу», Краснодар, 26-31 мая 2013 г. С. 132.

10. A.N. Stavrianiidi, I.A. Rodin, A.V. Braun, O.A. Shpigun. The Use of Linear Ion Trap for Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemicals in Ginseng Samples. / Abstract book of 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013), Amsterdam, Netherlands, 16-20 June 2013. P. 136.

11. А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, О.А. Шпигун. Групповое определение физиологически активных компонентов растительного сырья: масс-спектрометрическое детектирование гинсенозидов. / Тезисы V Всероссийской Конференции «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», пос. Московский, 08-11 октября 2013 г. С. 32.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю к.х.н. И.А. Родину, а также чл.-корр. РАН, проф. О.А. Шпигуну, д.х.н. А.В. Пирогову, к.х.н. А.А. Бендрьшеву, к.х.н. А.Д. Смоленкову, к.х.н. И.А. Годовикову, к.х.н. А.В. Брауну и Е.А. Стеколыщиковой за постоянное внимание, помощь в работе и обсуждении результатов.

Подписано в печать 08 апреля 2014 г.
Объем 1,0 п.л. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии «Реглет». Заказ № 375
119526 г. Москва, пр-т Вернадского, д. 39
[www. reglet. ru](http://www.reglet.ru); тел. +7 495 363 78 90