

*На правах рукописи*



**Севко Дарья Анатольевна**

**КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОСТЕРОИДОВ С  
ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ СОРБЕНТОВ И  
ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова)

*Научный руководитель:* доктор химических наук, ведущий научный сотрудник  
**Беклемишев Михаил Константинович**

*Официальные оппоненты:* **Ермолаева Татьяна Николаевна**  
доктор химических наук, профессор, Липецкий государственный технический университет

**Борисов Роман Сергеевич**  
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Институт нефтехимического синтеза имени А.В. Топчиева Российской академии наук

*Ведущая организация:* **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»**

Защита состоится 27 апреля 2016 г. в 16 ч. 30 мин. в аудитории 446 химического факультета на заседании диссертационного совета Д501.001.88 по химическим наукам в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 3, химический факультет.

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

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д501.001.88,  
кандидат химических наук

О.В. Моногорова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Фитоэкдистероиды (далее – фитостероиды, рис. 1) являются физиологически активными компонентами многих лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе растений. Эти соединения обладают адаптогенными и антимикробными свойствами, стимулируют иммунные процессы, снижают артериальное давление, снимают спазмы и головные боли. Согласно Отраслевому стандарту Министерства здравоохранения (Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. М.: 2000) в лекарственных средствах помимо основного действующего компонента необходимо определять также и родственные ему соединения. В связи с этим разработка подхода к селективному выделению и определению группы соединений данного класса представляется актуальной.

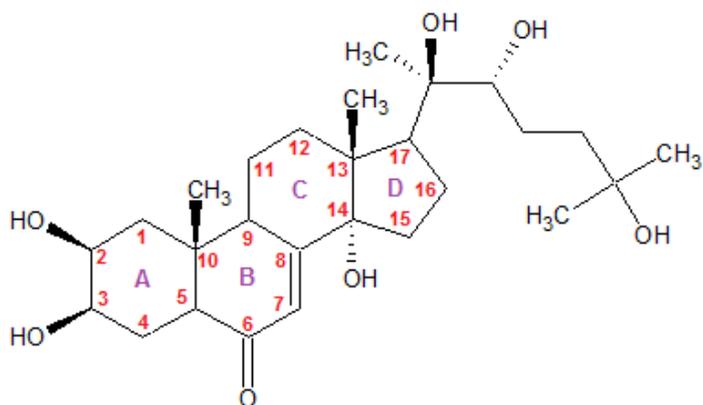


Рис. 1. Структурная формула 20-гидроксиэкдизона (далее – экдистен) – одного из основных представителей фитостероидов

Для идентификации фитостероидов в растительных экстрактах и фармпрепаратах чаще всего используют метод ВЭЖХ-МС (МС/МС) или ВЭЖХ-ЯМР. ЯМР-детектирование позволяет получить точную информацию о строении каждого аналита по совокупности  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -спектров, однако в анализе растительных экстрактов применение ЯМР не всегда целесообразно, поскольку регистрация ЯМР-спектров требует выделения каждого фитостероида в миллиграммовых количествах. Для решения подобных задач целесообразнее использовать метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, который позволяет детектировать фитостероиды на уровне наногرامмов без их выделения в виде отдельных фракций, а по информации о фрагментации продуктов ионизации аналитов устанавливать их строение. В этом случае информация о строении менее полна, чем в случае ЯМР, но зачастую достаточна для установления строения аналита, особенно в сочетании с литературными данными и программами обработки МС-данных. При использовании тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения можно с высокой точностью установить брутто-формулу каждого фрагмента.

В литературе описаны, в основном, масс-спектры низкого разрешения отдельных фитостероидов, а спектры высокого разрешения приводятся редко; для некоторых соединений можно найти экспериментально полученные значения точных масс ионов  $[\text{M}+\text{H}]$  или  $[\text{M}-\text{H}]$ , однако эти данные не систематизированы. Редко указывается также, в каком режиме ионизации лучше регистрировать соединения этого класса. Поэтому для их достоверной *идентификации* в растительном экстракте или фармпрепарате необходимо более детально изучить масс-спектрометрические характеристики с применением тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Использование

такого подхода позволило бы также идентифицировать фитостероиды при отсутствии стандартных образцов.

Для *определения* фитостероидов в растительных экстрактах ВЭЖХ-МС представляется наиболее подходящим методом, однако он менее распространен; чаще всего используют флуоресцентный и радиоиммунный методы детектирования. Согласно Фармакопее РФ, для фармпрепаратов и биологически активных добавок в основном используют указанные методы в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Однако указанные виды детектирования имеют ряд ограничений, связанных с присутствием мешающих компонентов. При использовании флуоресцентного метода возможно побочное образование флуоресцирующих производных других гидроксилсодержащих соединений. Радиоиммунный анализ позволяет определить не индивидуальные соединения, а только экдизон-подобную активность. Решить эти проблемы можно при селективном извлечении группы целевых аналитов на стадии пробоподготовки образца с использованием сорбентов с молекулярными отпечатками. Использование таких сорбентов в твердофазной экстракции или препаративном разделении позволило бы сократить число стадий выделения фитостероидов из сложных матриц, в том числе из растительных экстрактов. В настоящее время для выделения фитостероидов используют длительные и многостадийные схемы, требующие больших объемов органических растворителей. Они сочетают в себе комбинации стадий препаративного хроматографического разделения на различных сорбентах (оксиде алюминия, силикагеле), позволяющие отделить примеси различной полярности от целевых соединений. Это делает выделение длительным и трудоемким, при этом потери на каждой стадии могут привести к низкому выходу выделяемых аналитов. Сорбенты с молекулярными отпечатками целевых аналитов позволили бы упростить выделение фитостероидов из сложных матриц, а также сделать его более селективным.

**Целью** данной работы был выбор условий идентификации и определения соединений группы фитостероидов методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения и способа селективного концентрирования этих соединений с применением молекулярного импринтинга.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Получение масс-спектрометрических характеристик соединений класса фитостероидов на примере стандартных образцов известной структуры (эктистена и туркестерона) методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения.

2. Выявление закономерностей фрагментации фитостероидов и установление характеристичных переходов, которые могут быть использованы при отнесении неизвестных соединений к этому классу.

3. Анализ экстрактов серпухи венценосной и левзеи методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, идентификация и определение в них фитостероидов в расчете на эктистен.

4. Выбор способов молекулярного импринтинга и систем «матрица – подложка» для получения молекулярных отпечатков эктистена как самого распространенного представителя класса фитостероидов. Изучение с этой целью систем «матрица – подложка» с различной конформационной жесткостью каждой из составляющих.

5. Выявление возможности групповой сорбции фитостероидов из растительных экстрактов (серпухи венценосной, левзеи) и фармпрепаратов с использованием импринтированного эктистеном носителя и оценка селективности такого извлечения. Сравнение свойств полученного импринтированного носителя со свойствами коммерчески доступного гидрофобизованного силикагеля.

## **Научная новизна**

1. Разработан подход к идентификации фитостероидов методом tandemной масс-спектрометрии в объектах сложного состава, основанный на наличии в МС/МС-спектрах фитостероидов фрагментных ионов, соответствующих стероидному фрагменту молекулы, общему для этого класса веществ ( $m/z$  301 или 317).

2. Показана возможность получения молекулярных отпечатков фитостероидов.

3. Обнаружено, что воспроизводимые отпечатки фитостероидов «наилучшего качества» (с наиболее высоким импринтинг-фактором) образуются при использовании конформационно жесткой матрицы. Установлено, что использование в качестве темплата комплекса экдистена с 3-аминофенилборной кислотой позволяет увеличить степени извлечения фитостероидов на 30–50% по сравнению с использованием экдистена как темплата.

4. На примере импринтированного экдистеном сорбента на основе  $TiO_2$  показано преимущество использования сорбентов с молекулярными отпечатками по сравнению с коммерчески доступным обращеннофазовым силикагелем для группового извлечения фитостероидов из матриц растительных экстрактов и лекарственных препаратов.

## **Практическая значимость**

1. Выявлены характеристичные фрагментные ионы, позволяющие определять принадлежность неизвестных соединений к классу фитостероидов. Разработана экспрессная методика ВЭЖХ-МС/МС идентификации и определения фитостероидов в растительных экстрактах и лекарственных препаратах.

2. Разработана методика получения молекулярно-импринтированных сорбентов для концентрирования фитостероидов путем импринтинга экдистена в гель диоксида титана на наночастицах  $TiO_2$ .

3. Получены картриджи для твердофазной экстракции фитостероидов и разработана методика селективного концентрирования группы фитостероидов из растительных экстрактов или лекарственных препаратов перед ВЭЖХ-МС/МС анализом.

## **На защиту выносятся следующие положения:**

1. Условия идентификации фитостероидов в сложных матрицах и смесях (таких как растительные экстракты и препараты) и отнесение неизвестных соединений к этому классу веществ с помощью tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения. Схемы фрагментации этих соединений при ионизации электроспреем. Результаты применения разработанного алгоритма при идентификации фитостероидов в растительных экстрактах и фармпрепаратах на основе серпухи венценосной и левзеи.

2. Условия получения импринтированного экдистеном сорбента на основе наночастиц диоксида титана с нанесенным золь-гель методом поверхностным слоем диоксида титана.

3. Условия группового концентрирования фитостероидов из фармпрепаратов и растительных экстрактов (серпухи венценосной, левзеи) с использованием картриджей для твердофазной экстракции на основе импринтированного  $TiO_2$ .

## **Апробация работы**

Результаты работы докладывались на 7-ой Международной конференции по молекулярно импринтированным полимерам «MIP-2012» (Париж, Франция, 2012), 3-ей научной конференции с международным участием «Химия–2013. Физическая химия.

Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика и преподавание» (Москва, 2013), Втором съезде аналитиков России (Москва, 2013), Всероссийской конференции с международным участием «Теория и практика хроматографии» (Самара, 2015), IX Всероссийской научной конференции с международным участием «Химия и технология растительных веществ» (Москва, 2015).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в российских журналах и 5 тезисов докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 131 странице, содержит 46 рисунков, 7 схем и 29 таблиц, в списке литературы 131 источник.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

**Обзор литературы** включает две главы. В *первой главе* рассмотрены методы поверхностного молекулярного импринтинга: в полиэлектролитные мультислои и на поверхности неорганических носителей (силикагеля, магнитных частиц и диоксида титана). По литературным данным, импринтинг аналитов различной природы наиболее воспроизводим при использовании именно перечисленных матриц. Их детальное изучение позволило нам выбрать варианты используемых систем.

*Вторая глава* посвящена рассмотрению используемых методов определения целевых аналитов – фитостероидов, являющихся активными компонентами растительного сырья. Описаны подходы к определению этих соединений методами тонкослойной, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографией, обсуждены их достоинства и недостатки. Рассмотрены существующие подходы к идентификации и подтверждению структуры новых соединений класса фитостероидов.

**Экспериментальная часть** посвящена перечислению исходных веществ, их характеристик, использованного оборудования. Приведены методики молекулярного импринтинга в различных системах «матрица-подложка»: в полимерных мультислоях на трековой мембране, в слое белка на поверхности частиц силикагеля, в слое геля  $TiO_2$  на частицах  $TiO_2$ . Описаны методики изучения сорбционных свойств полученных сорбентов, оценки эффективности импринтинга, извлечения целевых аналитов из растительных экстрактов и их определения методом ВЭЖХ–МС/МС высокого разрешения.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОСТЕРОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ И ФАРМПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ–МС/МС ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Анализ литературных данных показал, что наиболее экспрессным и чувствительным методом идентификации фитостероидов является тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения. Однако в литературе, как правило, приводятся масс-спектры низкого разрешения фитостероидов, а данные о систематических исследованиях фрагментации соединений этого класса методом тандемной масс-спектрометрии практически отсутствуют. Поэтому первая часть нашей работы посвящена детальному выбору условий идентификации фитостероидов методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

а) Масс-спектрометрические характеристики фитостероидов

Масс-спектры высокого разрешения доступных стандартов фитостероидов – эктистена и туркестерона – получали в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов. В первом случае спектры содержат  $m/z$  только вида  $[M+H-nH_2O]^+$ , что малоинформативно для изучения их строения и закономерностей фрагментации. В режиме регистрации отрицательных ионов спектры позволяют получить информацию о строении радикала при C17 и скелетного стероидного фрагмента. В этом режиме наблюдали одинаковую схему фрагментации фитостероидов – разрыв связи C17–C20, что и позволило нам определить условия идентификации соединений данного класса. Приводимые ниже спектры получены в режиме регистрации отрицательных ионов.

Для эктистена и туркестерона в масс-спектре первого порядка (рис. 2А, 3А) характерно наличие одного интенсивного пика  $[M+HCOOH-H]^-$  — аддукта квазимолекулярного иона с муравьиной кислотой, являющейся компонентом подвижной фазы (А – смесь ацетонитрил – вода (5 / 95 об.) с добавкой 0.1% (об.) HCOOH; В – ацетонитрил с добавкой 0.1% (об.) HCOOH).

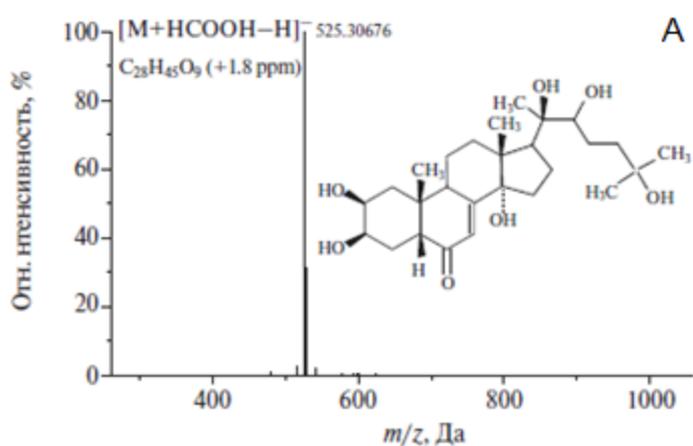
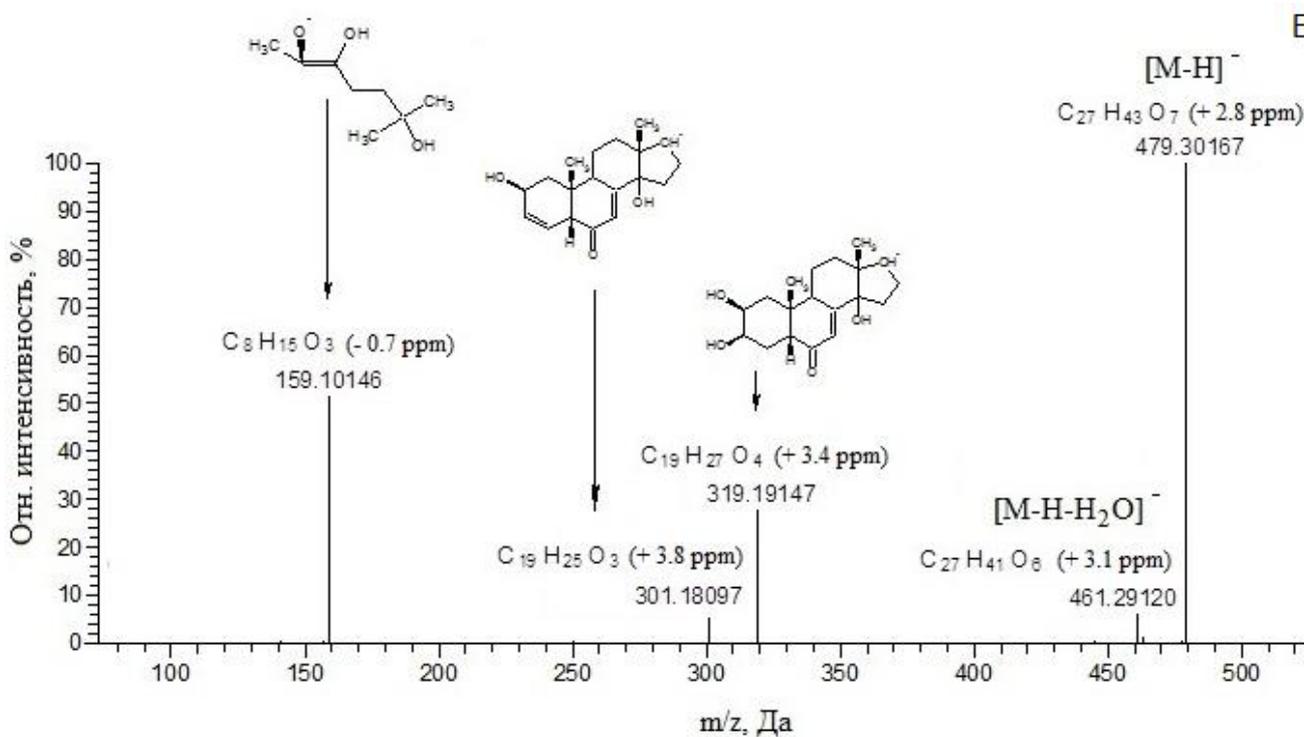


Рис. 2. Масс-спектры эктистена: первого порядка (А) и тандемный второго порядка (ион-предшественник  $m/z$  525.31) (В).



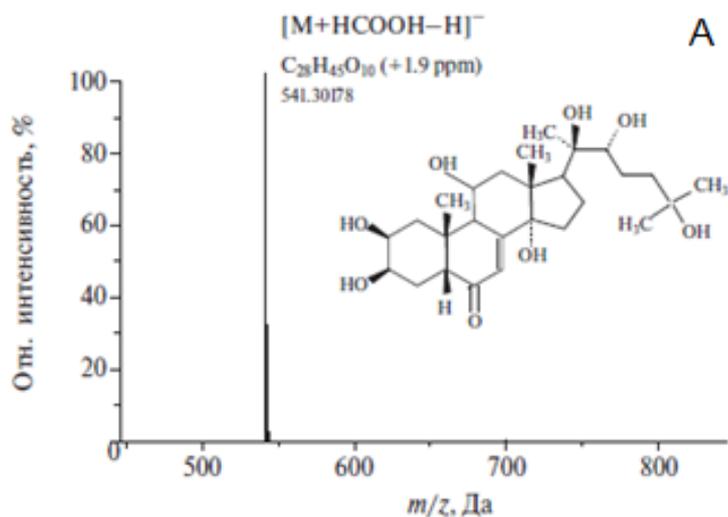
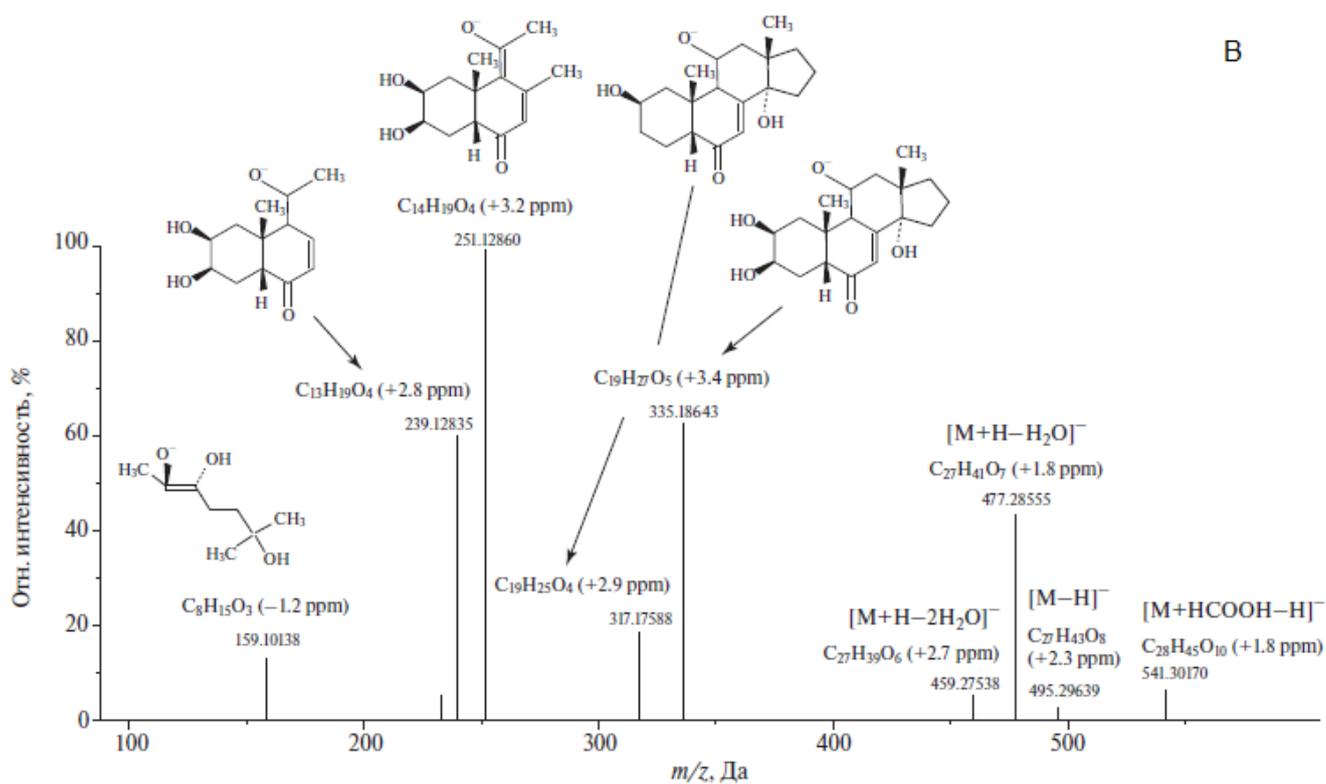


Рис. 3. Масс-спектры туркестерона: первого порядка (А) и тандемный второго порядка (ион-предшественник  $m/z$  541.30) (В).



В растительных экстрактах могут присутствовать неидентифицированные соединения, которые могли бы относиться к классу фитостероидов. Для определения условий идентификации фитостероидов изучена фрагментация экдистена и туркестерона и получены их МС/МС-спектры (рис. 2В, 3В). В спектрах второго порядка присутствуют интенсивные пики ионов-продуктов, соответствующих  $m/z$  фрагментов молекулы, содержащих стероидное ядро (кольца А, В, С, D, рис. 1) и образующихся при отщеплении от исходной молекулы боковой цепи при С-17 (301 и 319 для экдистена; 317 и 335 для туркестерона). Эти значения масс могут служить характеристичными при идентификации неизвестных фитостероидов и их отнесении к этому классу соединений, так как они соответствуют фрагментам стероидного ядра, общим для данного класса соединений. Различие в  $m/z$  этих ионов связано со структурными отличиями двух соединений: в молекуле туркестерона присутствует дополнительная ОН-группа в скелете при наличии того же бокового радикала при С-17, что и у экдистена.

Наличие в МС/МС-спектрах обоих стандартов сигнала с  $m/z$  159 (рис. 2В, 3В) соответствует общему для экидистена и туркестерона фрагменту, представляющему собой боковую цепь при С-17.

В итоге для подтверждения принадлежности неизвестного соединения к классу фитостероидов необходимо придерживаться следующего плана:

- 1) регистрация масс-спектра второго порядка неизвестного соединения;
- 2) поиск в этом спектре  $m/z$  характеристичных ионов-продуктов соединений класса фитостероидов (301 и 319, или 317 и 335);
- 3) сравнение экспериментально полученных точных значений  $m/z$  и брутто-формул с аналогичными параметрами стандартных образцов фитостероидов.

Данный алгоритм использовали при идентификации фитостероидов в растительных экстрактах.

На примере экидистена и туркестерона нам удалось экспериментально показать, что закономерности фрагментации фитостероидов сохраняются и при использовании масс-спектрометрии низкого разрешения.

#### *б) Анализ экстракта серпухи венценосной*

Помимо экидистена и туркестерона в экстракте обнаружили несколько соединений, предположительно также принадлежащих к фитостероидам (ФС-1 – ФС-4). Для их однозначной идентификации получили масс-спектры первого и второго порядка.

В МС/МС-спектре (рис. 4) первого из предполагаемых фитостероидов (ФС-1) присутствуют характерные для экидистена ионы-продукты с  $m/z$  301 и 319, содержащие стероидное ядро и совпадающие с ними по точной массе и рассчитанной брутто-формуле, что позволяет отнести соединение ФС-1 к фитостероидам. Дальнейшее сопоставление спектров (рис. 2В и 4) позволяет отнести  $m/z$  493 к  $[M-H]^-$ -иону ФС-1, а  $m/z$  173 – к его боковому радикалу, отличающемуся от бокового радикала экидистена на одну  $CH_2$ -группу. Согласно литературным данным, фитостероид с таким строением – это макистерон А, о котором известно, что он содержится в этом растении.

Аналогично, в тандемных масс-спектрах остальных предполагаемых фитостероидов – ФС-2, 3 и 4 также присутствуют фрагментные ионы с  $m/z$  301 и 319, что позволяет отнести все эти соединения к классу фитостероидов. Дальнейший анализ их МС/МС-спектров и сопоставление со спектрами стандартов позволили установить их строение, а по литературным данным – названия: ФС-2 – экизон; ФС-3 – дакрихайнанстерон; ФС-4 – макистерон С.

Спектры первого порядка ФС-1, ФС-2, ФС-3, ФС-4 содержат один интенсивный пик  $[M+HCOOH-H]^-$  — аддукта молекулярного иона с муравьиной кислотой, как и в случае соответствующих спектров экидистена и туркестерона. Точные массы указанных ионов приведены в табл. 1.

Содержание экидистена и туркестерона в экстракте серпухи венценосной определяли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием коммерчески доступных стандартов этих веществ. Градуировочные зависимости в диапазоне от 5 нг до 5 мкг имели вид: для экидистена  $y_1 = 56224 \cdot x$ , коэффициент корреляции  $r_1 = 0.997$ ; для туркестерона  $y_2 = 15779 \cdot x$ ,  $r_2 = 0.995$ . Содержания фитостероидов ФС-1, 2, 3, 4 оценивали по градуировочной зависимости для экидистена, как это принято при оценке содержания минорных фитостероидов в литературе. Результаты определения приведены в табл. 1.

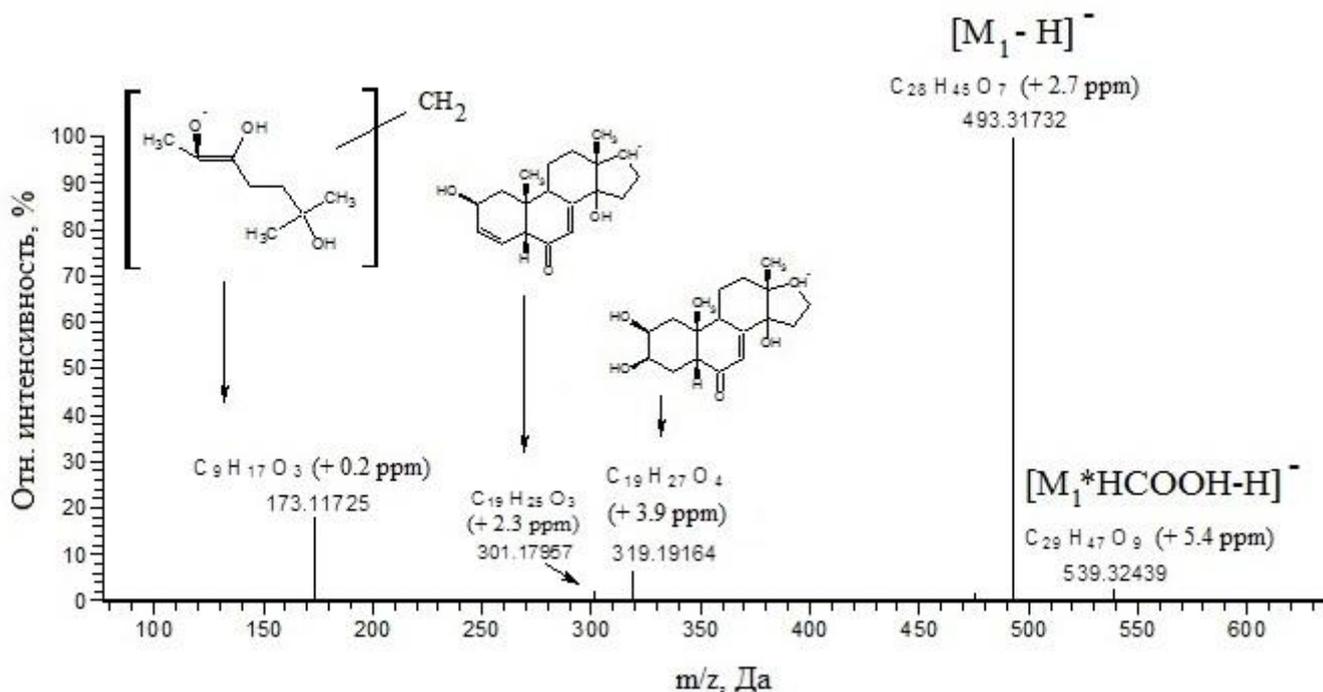


Рис. 4. Масс-спектр второго порядка соединения ФС-1 (ион-предшественник  $m/z$  539.32).

Таблица 1. Экспериментально полученные значения точных масс ионов  $[M-H]^-$  и  $[M+HCOOH-H]^-$  и результаты определения фитостероидов ( $n = 3, P = 0.95$ )

Аналит	$[M-H]^-$ , Да	$[M+HCOOH-H]^-$ , Да	Содержание в экстракте, мг/г
Экдистен	479.30167	525.30676	$8.2 \pm 0.7$
Туркестерон	495.29639	541.30176	$1.5 \pm 0.3$
ФС-1 (макистерон А)	493.31732	539.32270	$0.05 \pm 0.01$
ФС-2 (экдизон)	463.30673	509.31208	$0.10 \pm 0.02$
ФС-3 (дакрихайнанстерон)	461.29118	507.29635	$0.80 \pm 0.06$
ФС-4 (макистерон С)	507.33276	553.33862	$0.040 \pm 0.005$

*в) Анализ препаратов на основе левзеи*

При хроматографическом анализе препаратов на основе левзеи в их составе найден экдистен, а также еще одно соединение, предположительно являющееся фитостероидом (определение принадлежности этого вещества к фитостероидам проводили тем же способом, что и при анализе экстракта серпухи венценосной). Этот аналит совпадал по рассчитанным брутто-формуле и точной молекулярной массе с экдистеном, т.е. был его изомером.

Анализ МС/МС-спектров показал (рис. 5), что в стероидном скелете изучаемого соединения на одну ОН-группу больше, а в радикале при С-17 – на одну ОН-группу меньше. По литературным данным, среди фитостероидов, присутствующих в левзее, соединение с такой структурой – это аюгастерон С.

Содержания фитостероидов (табл. 2), как и в пункте б, устанавливали по градуировочному графику для определения экдистена.

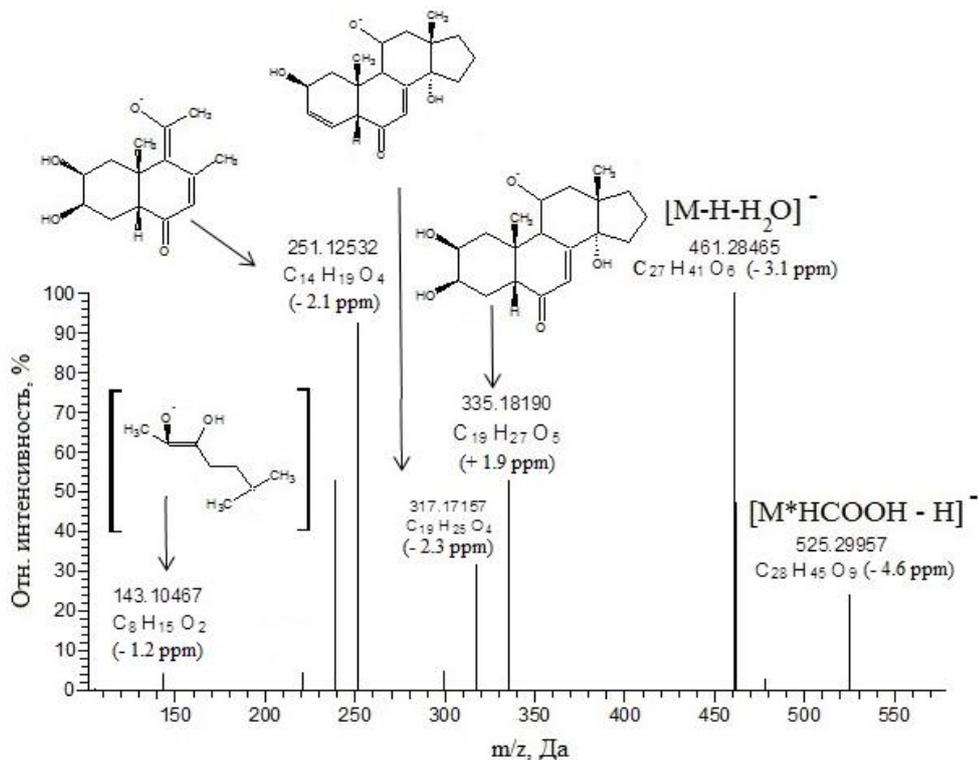


Рис. 5. Масс-спектр второго порядка изомера эхдистена (аюгастерона С) (ион-предшественник  $m/z$  525.31).

Таблица 2. Содержание фитостероидов в препаратах на основе левзеи ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Препарат, единицы концентрации	Эхдистен	Аюгастерон С
Таблетки "Левзея", мкг/табл.	$40 \pm 3$	$5.0 \pm 0.4$
Экстракт левзеи, мкг/мл	$365 \pm 15$	$42 \pm 2$

Несмотря на то, что тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения является мощным методом идентификации и определения органических соединений в сложных смесях, фитостероиды чаще определяют флуоресцентным и радиоиммунным методами, а также масс-спектрометрией низкого разрешения. Однако если для использования последнего метода может быть адаптирован описанный нами выше алгоритм, то остальные названные методы требуют предварительного селективного извлечения и концентрирования фитостероидов. Подходом к селективному выделению группы анализов из образцов сложного состава может служить использование молекулярно-импринтированных сорбентов.

### ВЫБОР СИСТЕМ ДЛЯ ПОВЕРХНОСТНОГО ИМПРИНТИНГА ФИТОСТЕРОИДОВ

Молекулярный импринтинг – полимеризация функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекулы-шаблона (темплата) (рис. 6). Принято считать, что после удаления темплата из полимерной стуртуры в ней остается полость, по форме и размеру соответствующая темплату (отпечаток). Этот метод позволяет получать селективные сорбенты для выделения и концентрирования анализов (в том числе групп родственных соединений) из матриц сложного состава. Количественной характеристикой эффективности импринтинга и мерой качества молекулярных отпечатков служит *импринтинг-фактор*, представляющий собой отношение:

$$ИФ = \frac{C_{импринт}}{C_{контр}}, \text{ где } C_{импринт} - \text{какая-либо количественная характеристика}$$

импринтированного сорбента (например, процент сорбции темплата),  $C_{контр}$  – то же для контрольного (неимпринтированного) сорбента.

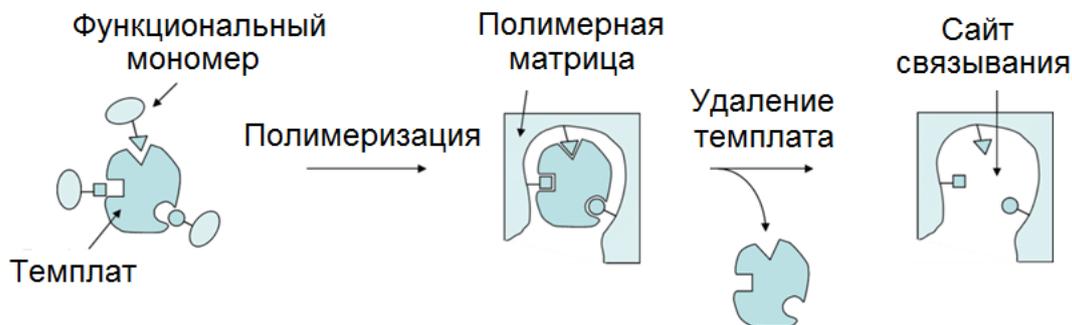


Рис. 6. Принцип молекулярного импринтинга.

В молекулярном импринтинге используют понятия матрицы и подложки. *Матрица* – вещество, в котором формируется отпечаток темплата (основной компонент импринтированного слоя). Она может быть закреплена на подложке. *Подложка* – основа для закрепления импринтированного слоя; она может представлять собой пористую пленку (мембрану), твердые частицы (сорбент) и т. п.

В литературе нет сведений о получении молекулярных отпечатков фитостероидов. Не существует и алгоритма, позволяющего однозначно выбрать наилучшую матрицу для конкретного анализита или класса веществ. Поэтому при выборе систем для импринтинга фитостероидов мы исходили из литературной информации о том, что для анализитов различной природы наиболее воспроизводим импринтинг в такие матрицы, как акриловые мономеры, силикагель и диоксид титана(IV). В то же время, наименее трудоемок импринтинг в слои полиэлектrolитов.

Матрицу часто наносят на подложку тонким слоем, реализуя *поверхностный импринтинг*, который позволяет минимизировать проблемы, связанные с глубоким расположением отпечатков.

Матрицы различной природы, используемые в молекулярном импринтинге (например, слои полиэлектrolитов, в т. ч. белков, или неорганические оксиды) отличаются по жесткости атомно-молекулярной структуры, окружающей молекулу темплата и сохраняющей отпечаток после его удаления. В работе мы изучили как самую простую в технике получения и одновременно конформационно гибкую матрицу (слой полиэлектrolита, в том числе белка), так и весьма жесткую – неорганический оксид (TiO<sub>2</sub>).

#### *Полиэлектrolитный мультислой на лавсановой мембране*

Импринтинг в полиэлектrolитные мультислой – один из простейших вариантов поверхностного молекулярного импринтинга, включающий послойное нанесение разноименно заряженных полимеров в присутствии темплата, который затем удаляют. В литературе есть данные об успешном импринтинге некоторых соединений с использованием этого подхода (импринтировали порфирин, теофиллин, нарингин, 2,4-дихлорфенол, аденозинмонофосфат), хотя рутинным такой способ импринтинга пока не стал.

В качестве подложки для полимерных слоев использовали полиэтилентерефталатную трековую мембрану, а сами слои формировали из

полиакриловой кислоты (ПАК) и гидрохлорида полиаллиламина (ПААГХ), как наиболее часто используемых полиэлектролитов. Однако импринтинг экдистена в полученные слои полимеров оказался малоэффективным: малы были как степень переноса темплата, так и воспроизводимость скоростей его переноса через импринтированные мембраны. Попытки повысить качество получаемых отпечатков (увеличение ионной силы в исходных растворах, использование различных способов сшивки слоев полимеров) не привели к значительному увеличению степеней переноса через импринтированную мембрану (табл. 3).

Таблица 3. Степень переноса экдистена через полиэтилентерефталатные трековые мембраны при различных временах диффузии. Сшивка слоев полимеров с использованием эпихлоргидрина (0.5% этанольный раствор), время сшивки – 15 мин ( $n = 3, P = 0.95$ )

Трековая мембрана	Степень переноса, %		
	15 сек	3 мин	7 мин
Импринтированная	6	5.5 ± 3.6	5
Контрольная	3	2.0 ± 1.5	6

В целом же импринтинг экдистена в полиэлектролитные мультислои оказался малоэффективным: малы были как степень переноса темплата, так и воспроизводимость скоростей его переноса через импринтированные мембраны.

Далее мы увеличили разнообразие функциональных групп в полимере, используемом для импринтинга (перейдя к полипептиду и белку), а также закрепили эту полимерную матрицу на более жесткой подложке, чтобы ограничить ее конформационную гибкость (перейдя к силикагелю в качестве подложки).

#### *Слой белка на силикагеле*

БСА закрепляли на силикагеле нековалентно или ковалентно (за счет сшивки 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом с привитыми иминодиацетатными группами силикагеля). Использовали денатурированный (дБСА) и нативный белок (натБСА). Оказалось, что при *ковалентном* закреплении БСА степень сорбции темплата невелика вне зависимости от конформации используемого при синтезе белка. Сильнее сорбируют экдистен образцы силикагеля с *нековалентным* закреплении белка (табл. 4), однако только в случае использования денатурированного БСА нековалентно модифицированный образец с молекулярными отпечатками удерживает почти вдвое больше экдистена, чем контрольный образец, что свидетельствует об образовании сайтов связывания фитостероидов в исследуемой матрице.

Таблица 4. Сорбционные свойства образцов «силикагель – БСА» по отношению к экдистену

Вид закрепления БСА	Образец БСА	Количество сорбированного экдистена на 1 мг SiO <sub>2</sub> , мкг	
		контрольный сорбент	импринтированный сорбент
Ковалентная пришивка	дБСА	0.07	0.06
	натБСА	0.06	0.06
Нековалентное закрепление	дБСА	0.24	<b>0.43</b>
	натБСА	0.23	0.17

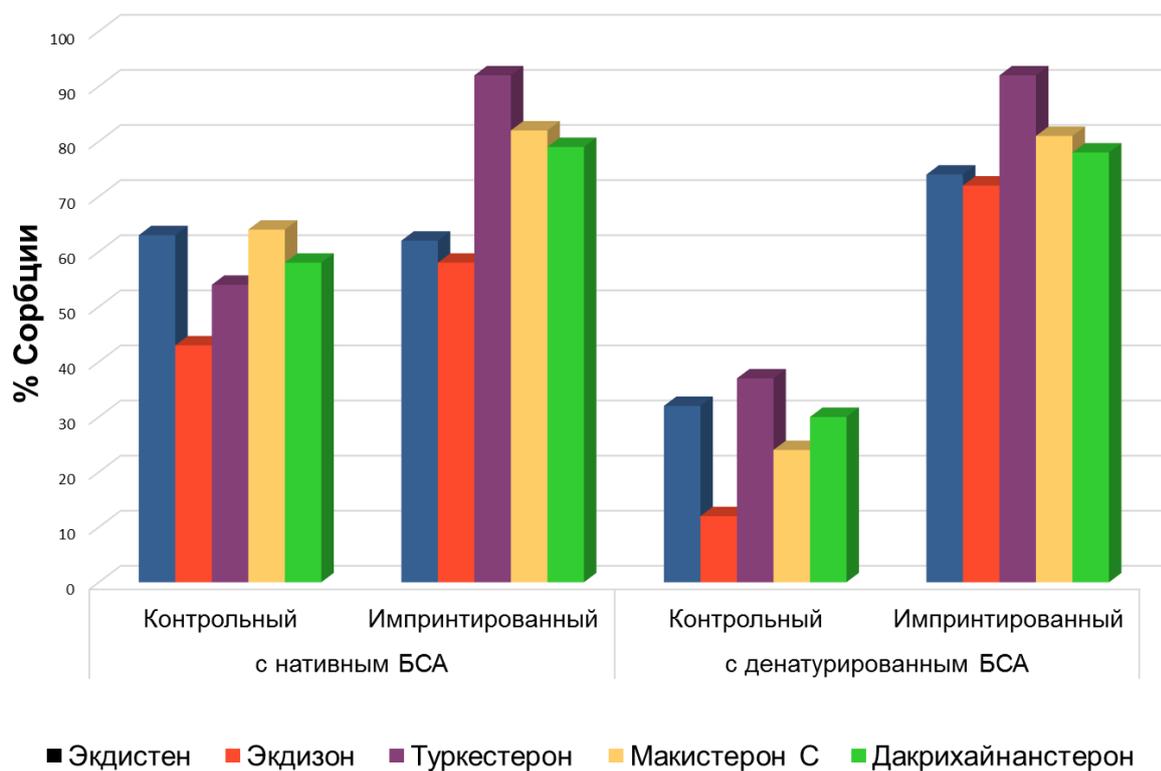


Рис. 7. Степень сорбции (%) фитостероидов из экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*) сорбентами на основе силикагеля с нековалентно закрепленным дБСА с молекулярными отпечатками и без них.

Далее использовали полученный сорбент для выделения фитостероидов из экстракта серпухи венценосной. Обнаружили групповую сорбцию фитостероидов из такого экстракта (рис. 7), при этом степень сорбции как основных (эkdизона и эkdистена), так и минорных фитостероидов (туркестерона, макистерона С, дакрихайнанстерона) оказалась значительно выше в случае образцов с молекулярными отпечатками, чем без них, что подтверждает наличие сайтов селективного связывания этой группы аналитов.

Особенность полученных сорбентов заключается в том, что, импринтированные только эkdистеном, они проявляют свойство групповой сорбции по отношению к соединениям того же класса.

Однако воспроизводимость сорбционных свойств разных партий полученных сорбентов оказалась низкой, что не позволило признать их пригодными для сорбции фитостероидов из реальных объектов. Возможно, это связано со сложностью совмещения поверхностного привитого белкового слоя на силикагеле с органической средой, из которой проводили сорбцию.

Таким образом, мы изучили возможность импринтинга эkdистена в конформационно гибких матрицах (полиэлектролитном мультислое, белке), закрепленных различными способами на различных подложках (трековой мембране и силикагеле). Полученные при этом молекулярные отпечатки позволили наблюдать групповую сорбцию фитостероидов, однако нестабильность получаемых результатов заставила нас заменить матрицу на более конформационно жесткую.

### Гель $TiO_2$ на частицах $TiO_2$

Общий подход к созданию «жесткой» матрицы для молекулярного отпечатка мог бы заключаться в формировании неорганического полимера ( $SiO_2$  или  $TiO_2$ ) вокруг молекул темплата на неорганической подложке того же состава ( $SiO_2$  или  $TiO_2$ ). Однако молекулы темплата не могут проникать внутрь такой неорганической матрицы в отличие от органополимерной, т.е. молекулярные отпечатки образуются только на ее поверхности. В связи с этим мы предприняли попытку не только получить такие поверхностные отпечатки, но и «достроить» их прививаемыми к поверхности полимерными цепями с функциональными группами, которые также могли бы дополнительно координироваться с молекулами темплата, способствуя его селективному связыванию. Поэтому следующим этапом работы был импринтинг экдистена на поверхности наночастиц диоксида титана, на которые наносили дополнительный тонкий слой  $TiO_2$  путем гидролиза *n*-бутоксид титана по методу Кунитакэ, а затем прививали дополнительные поверхностные группы (рис. 8).

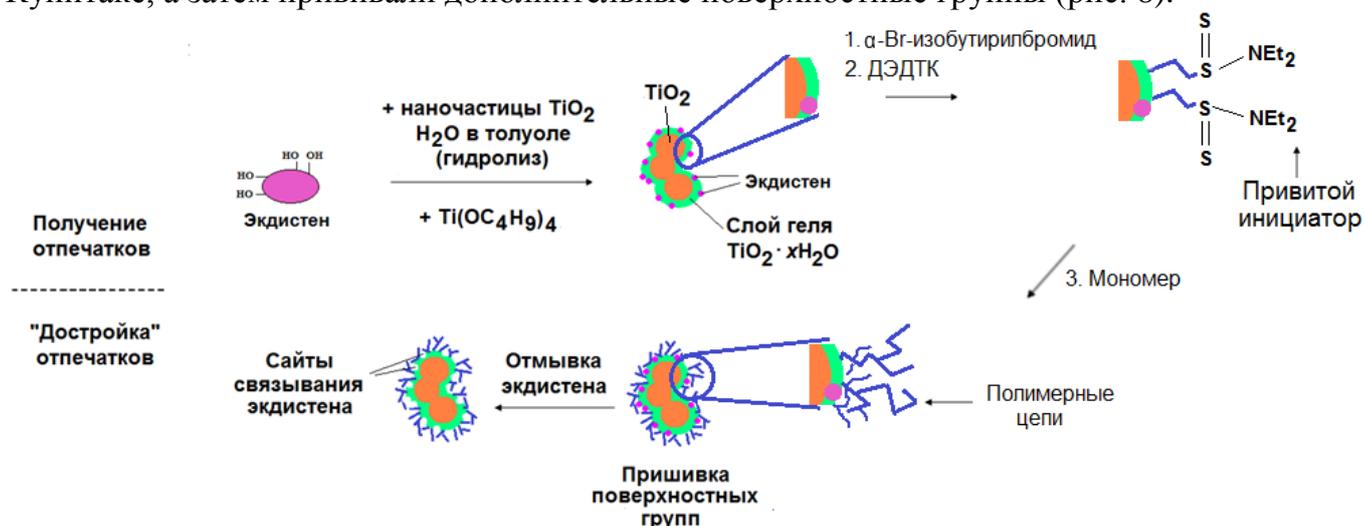


Рис. 8. Получение и «достройка» молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц диоксида титана.

### Влияние условий получения импринтированных сорбентов

Для повышения качества молекулярных отпечатков темплат иногда вводят в виде комплексов. Мы изучили возможность импринтинга экдистена в форме соединения с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК) (рис. 9).

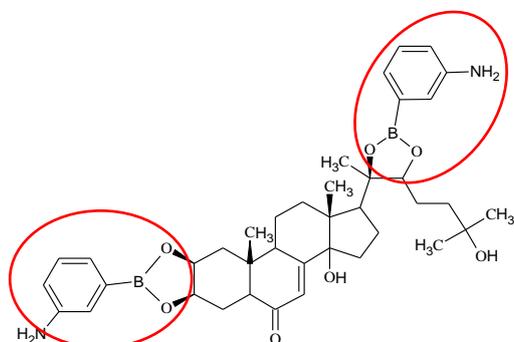


Рис. 9. Комплекс экдистена с 3-аминофенилборной кислотой

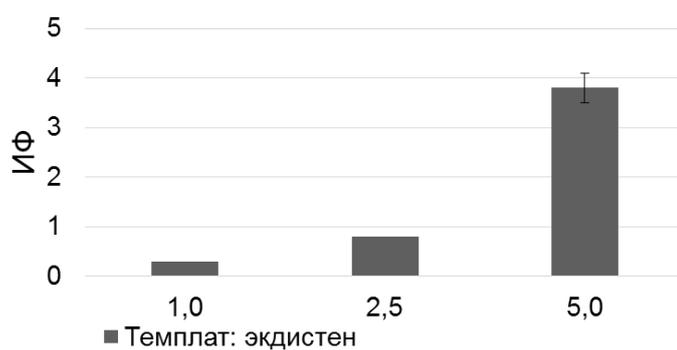
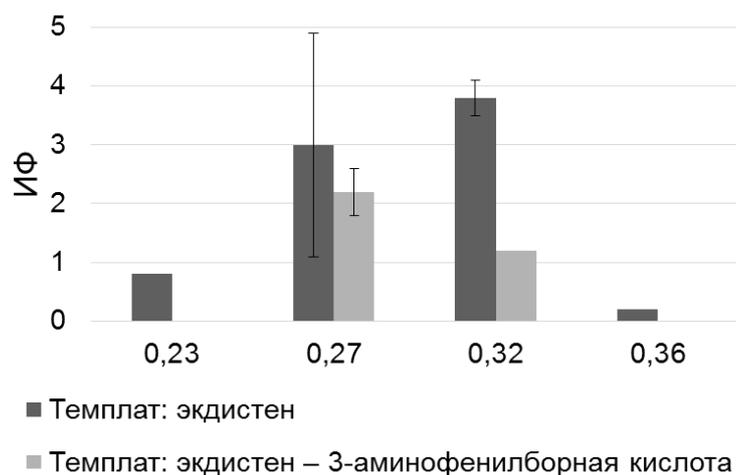
Сначала методом нормально-фазовой ВЭЖХ исследовали комплексообразование в системе экдистен – *n*-бутоксид титана(IV) – АФБК в изопропанол. Времена удерживания экдистена в присутствии и в отсутствие АФБК различаются, что подтверждает образование комплекса экдистен – АФБК. Добавление к этой смеси *n*-бутоксид титана

не приводит к изменению времен удерживания, то есть комплекс экдистена с буюксидом неустойчив или вовсе не образуется.

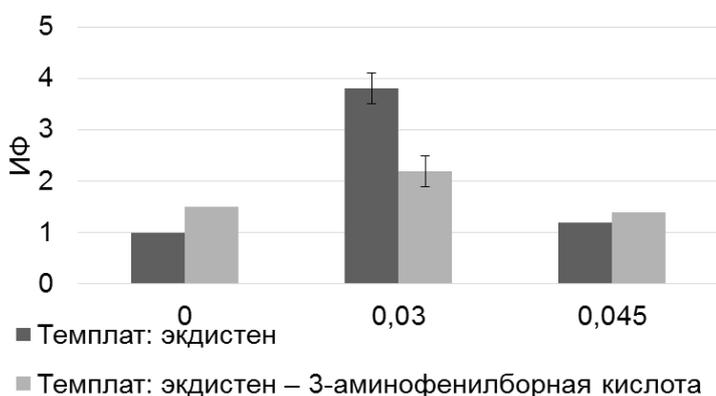
При выборе условий получения импринтированных сорбентов выяснилось, что на величины ИФ существенно влияет *концентрация n-буюксида титана(IV)* в реакционной смеси. Импринтинг экдистена (ИФ > 1) наблюдается в относительно узком диапазоне концентраций буюксида титана; оптимальное его содержание в реакционной смеси при импринтинге экдистена и его комплекса с 3-аминофенилборной кислотой немного различалось (рис. 10).

Для получения отпечатков необходима определенная *концентрация темплата*, вводимого при импринтинге: при ее увеличении наблюдали рост ИФ (рис. 10). В дальнейшей работе использовали 5 мг темплата, поскольку дальнейшее увеличение количества темплата затрудняло его удаление.

Еще один фактор, влияющий на качество получаемых отпечатков фитостероидов, – *содержание воды* в реакционной смеси при импринтинге, поскольку от нее зависит скорость гидролиза алкоксида титана и формирования геля, в котором образуются отпечатки. Обнаружено, что как в отсутствие воды, так и при ее избытке (количество воды выше ее растворимости в толуоле) качество молекулярных отпечатков снижается (импринтинг-факторы уменьшаются, рис. 10). Далее для гидролиза алкоксида титана использовали 0.03% (об.) раствор воды в толуоле, что соответствует почти насыщенному раствору.



Масса темплата, мг



Содержание воды в реакционной смеси, %

Рис. 10. Влияние условий синтеза импринтированных сорбентов на величину импринтинг-фактора

### Прививка дополнительных поверхностных слоев полимеров

Для «достройки» молекулярных отпечатков экдистена на поверхности диоксида титана закрепляли иницирующий агент: диэтилдитиокарбаминат (ДЭДТК), (триметоксисилил)пропилметакрилат (МПС) или (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС) и затем по методикам, использованным в литературе для других матриц, полимеризовали слой мономера: акриламида (АА), метакриловой кислоты (МАК) или 4-винилпиридина (ВП), получая привитые полимерные цепи (табл. 6).

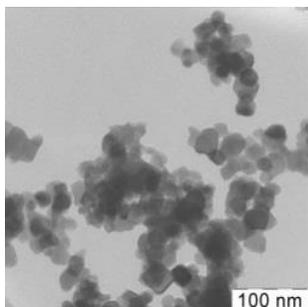


Рис. 11. Частицы импринтированного сорбента

Как видно из табл. 6, наилучшими по своим сорбционным свойствам и величине импринтинг-фактора оказались сорбенты с импринтированным слоем  $TiO_2$  без привитого слоя полимера. Они (рис. 11) и были использованы на дальнейшем этапе работы – получении картриджей для твердофазной экстракции фитостероидов.

Таблица 6. Зависимость импринтинг-фактора (ИФ) при статической сорбции экдистена из его этанольного раствора от способа поверхностной модификации частиц диоксида титана(IV)

Сорбент		Процент сорбции экдистена на 1 мг сорбента		ИФ
		импринтированного	контрольного	
Без модификации	$TiO_2$	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>3.8</b>
Поверхностная модификация	$TiO_2$ -ДЭДТК-АА	4	2	1.7
	$TiO_2$ -ДЭДТК-МАК	6	10	0.6
	$TiO_2$ -ДЭДТК-ВП	6	9	0.8
	$TiO_2$ -МПС-АА	4	4	1.0
	$TiO_2$ -АПТЭС-АА	5	6	0.9

### ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ФИТОСТЕРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ ИМПРИНТИРОВАННЫХ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ $TiO_2$

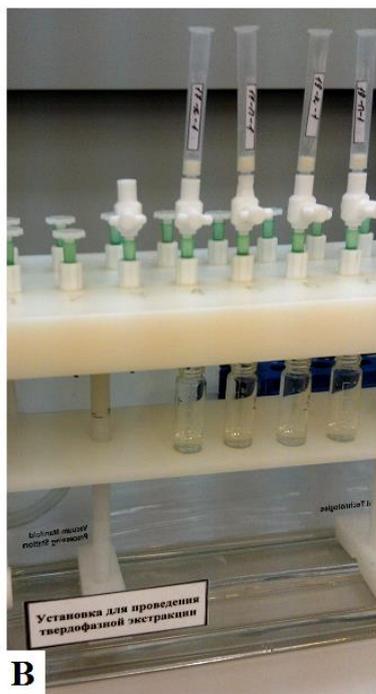
При анализе таких сложных объектов, как растительные экстракты, методом ВЭЖХ с радиоиммунным или флуоресцентным детектированием значительное мешающее влияние оказывают сопутствующие компоненты, а существующие методы выделения отдельных фитостероидов, как правило, многостадийны. В нашу задачу входила оценка возможности использования разработанных импринтированных сорбентов для селективной сорбции группы фитостероидов (без выделения отдельных фракций) на стадии пробоподготовки экстракта.



А



Б



В

Рис. 12. Картриджи для твердофазной экстракции фитостероидов:

А – коммерческий картридж Thermo и его пустой корпус,

Б – корпуса картриджей Thermo, заполненные импринтированным и контрольным сорбентами,

В – манифолд для твердофазной экстракции Agilent.

### Выбор условий сорбции и десорбции фитостероидов

Условия групповой сорбции фитостероидов выбирали на примере экидистена. Для изучения свойств импринтированных экидистеном сорбентов их помещали в картриджи для твердофазной экстракции (рис. 12) и пропускали через них раствор экидистена в этаноле.

Элюенты, используемые при работе с картриджами, выбирали из рассмотренного ряда растворителей с высокой элюирующей силой и их смесей (табл. 7) изменение степени извлечения этими растворителями экидистена согласуется с увеличением содержания полярного компонента в смеси (сверху вниз).

Таблица 7. Выбор элюента для десорбции экидистена с картриджем с импринтированным сорбентом

Элюент	Степень извлечения экидистена, %	
	Темплат: экидистен	Темплат: экидистен – 3-аминофенилборная кислота
Хлористый метилен	0.2	-
Этилацетат	0	-
Ацетонитрил + 0.1% HCOOH	31	3
Ацетон / ацетонитрил / изопропанол (10 / 45 / 45)	<b>74</b>	79
Ацетон / ацетонитрил / изопропанол (10 / 45 / 45) + 1% HCOOH	37	<b>85</b>

Как видно из табл. 8, степень извлечения экидистена импринтированными сорбентами (МИП) в 2.3–3.3 раза выше, чем неимпринтированным (НИП), что согласуется с образованием молекулярных отпечатков экидистена на поверхности TiO<sub>2</sub>. При этом использование комплекса экидистена с аминофенилборной кислотой в качестве темплата позволяет повысить степень извлечения на 7–22 % по сравнению с использованием свободного экидистена в качестве темплата. Из табл. 8 также можно

видеть, что для относительно концентрированных растворов экидистена (до 50 мкг/мл) степень извлечения не снижается.

Таблица 8. Степень извлечения экидистена после его сорбции из этанольного раствора на картриджах для ТФЭ, заполненных МИП-сорбентами

Концентрация экидистена в исходном растворе, мкг/мл	Темплат: экидистен		Темплат: экидистен – 3-аминофенилборная кислота	
	Степень извлечения, %	ИФ*	Степень извлечения, %	ИФ*
1	65	2.3	79	2.8
5	74	2.6	85	3.1
10	76	2.7	92	3.3
25	74	2.7	88	3.1
50	80	2.9	87	3.1

\* ИФ = степень извлечения (МИП) / степень извлечения (НИП), где степень извлечения НИП составила  $(28 \pm 3)\%$  ( $n = 3, P=0.95$ ).

Сорбенты сохраняют свои свойства при хранении (ИФ, измеренные через 5 дней и 2 месяца после синтеза сорбента, различались не более чем на 6%), что свидетельствует о стабильности молекулярных отпечатков, полученных в матрице оксида титана(IV).

### *Групповая сорбция и определение фитостероидов*

#### *а) Сорбция из экстракта серпухи венценосной*

Фитостероиды извлекали из экстракта серпухи венценосной, содержащего их в большом количестве, пропуская этанольный раствор экстракта через картридж с исследуемым сорбентом. Десорбцию проводили так же, как и при индивидуальной сорбции экидистена. Элюаты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Предполагали, что из-за сходства структур все фитостероиды будут связываться отпечатками экидистена. Как видно из табл. 5, все обнаруженные в экстракте фитостероиды действительно извлекаются сорбентом, импринтированным экидистеном, причем даже в большей степени, чем сам экидистен. Существенно, что компоненты матрицы экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме, не сорбируются (табл. 9), что свидетельствует о селективности полученных сорбентов по отношению к фитостероидам.

На сорбенте, полученном в присутствии 3-аминофенилборной кислоты, степени извлечения фитостероидов выше (70–85%), чем без нее. Однако возрастает и степень извлечения посторонних компонентов экстракта, особенно одного из них (компонент III в табл. 9). Таким образом, сорбенты, импринтированные экидистеном и комплексом экидистен – АФБК, по свойствам взаимно дополняют друг друга.

Селективность сорбентов оценивали следующим образом: рассчитали коэффициент селективности (табл. 10) как отношение усредненной степени извлечения фитостероидов к степени извлечения компонентов экстракта I, II и III.

Таблица 9. Степени извлечения фитостероидов (%) из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции на картриджах с сорбентами, импринтированными экдистеном или его комплексом с 3-аминофенилборной кислотой (МИП), и неимпринтированными сорбентами (НИП), и величины импринтинг-факторов (доверительные интервалы приведены для разных партий сорбента)

Аналит	Темплат					
	Экдистен			Экдистен – 3-аминофенилборная кислота		
	НИП	МИП	ИФ <sup>#</sup>	НИП	МИП	ИФ <sup>#</sup>
Экдистен	23±3**	41±4	1.8	7.3±0.5	80±4	11
Экдизон	39±3	73±2	1.9	0.9±0.3	78±3	83
Туркестерон	37±2	68±7	1.9	1.1±0.3	70±3	62
Дакрихайнанстерон	33±2	93±3	2.8	1.6±0.3	75±3	48
Макистерон А	15±3	46±4	3.0	0.13±0.06	76±3	— <sup>##</sup>
Макистерон С	58±3	111±8	1.9	0.3±0.1	85±3	— <sup>##</sup>
Компонент матрицы I*	0.07±0.01	0.24±0.06	3.4	0.12±0.04	0.34±0.08	2.8
Компонент матрицы II*	0.10±0.01	0.14±0.03	1.4	0.16±0.03	0.46±0.09	2.9
Компонент матрицы III*	2.2±0.2	6.7±0.5	3.0	2.80±0.25	64±5	23

\* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме (не идентифицированы)

\*\* Доверительные интервалы рассчитаны из трех параллельных измерений

# Импринтинг-фактор, рассчитанный как отношение степеней извлечения компонента импринтированным и неимпринтированным TiO<sub>2</sub>

## Эти значения имеют высокую погрешность из-за низкой сорбции макистеронов на неимпринтированном TiO<sub>2</sub>

Таблица 10. Коэффициенты селективности импринтированных сорбентов и силикагеля С-18 по отношению к компонентам экстракта

Компонент экстракта	Импринтированные		Силикагель С-18
	Экдистен	Экдистен – 3-АФБК	
I	$3.0 \cdot 10^2$	$2.2 \cdot 10^2$	1.4
II	$5.1 \cdot 10^2$	$1.7 \cdot 10^2$	1.2
III	11	1.2	1.0

Как видно из табл. 10, сорбенты, импринтированные как экдистеном, так и его комплексом с производным борной кислоты, обеспечивают высокие факторы разделения фитостероидов и посторонних компонентов экстракта I и II (порядка сотен), тогда как гидрофобизованный силикагель фактически не позволяет проводить такое разделение. Что касается еще одного компонента экстракта (вещество III), отделение от него наиболее эффективно при использовании сорбента, импринтированного экдистеном (фактор разделения около 10).

К достоинствам разработанной методики концентрирования относится возможность одновременного выделения и группового концентрирования фитостероидов из растительного экстракта при одновременном отделении примесей.

#### б) Сорбция фитостероидов из фармпрепаратов на основе левзеи

С использованием картриджей с импринтированным сорбентом на основе  $TiO_2$  выделяли и концентрировали фитостероиды из препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*): биологически активная добавка в таблетках «Левзея» и спиртовая настойка «Экстракт левзеи». Препараты содержали два фитостероида: экдистен и аюгастерон С. Импринтированный сорбент позволяет извлекать из «Экстракта левзеи» более 80% экдистена и более 70% аюгастерона С, то есть в 3–10 раз больше, чем сорбент без молекулярных отпечатков (рис. 13).

Различие в сорбции импринтированным образцом фитостероидов из таблеток и экстракта мы связываем с наличием в таблетках вспомогательных веществ (лактоза, метилцеллюлоза, стеарат кальция, тальк, твин 80, диоксид титана, краситель E122). Возможно, степень сорбции аюгастерона из таблеток была ниже вследствие превышения емкости сорбента из-за более высокой концентрации фитостероидов в образце.

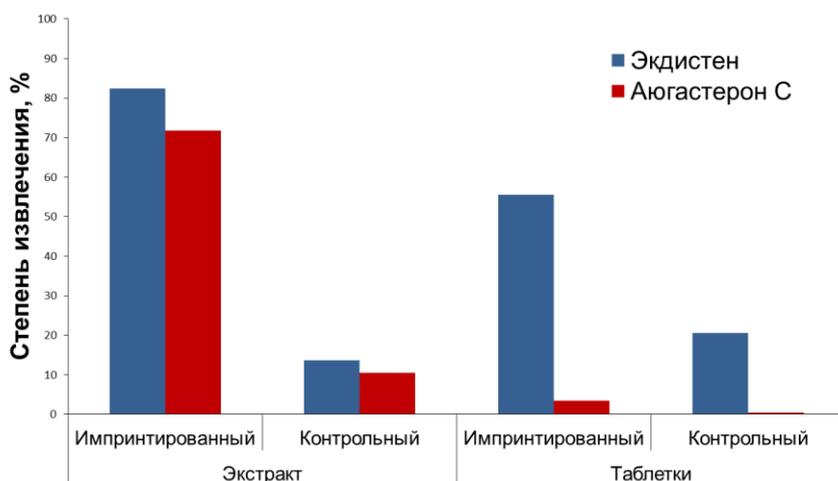


Рис. 13. Степени извлечения фитостероидов из фармпрепаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*) после твердофазной экстракции на картриджах с сорбентами на основе  $TiO_2$  (импринтированными и неимпринтированными).

#### в) Сорбция фитостероидов на гидрофобизированном силикагеле

Для сравнения селективности импринтированных сорбентов и эффективности концентрирования целевых аналитов провели сорбцию на коммерчески доступных картриджах Zorbax C18 с гидрофобизированным силикагелем.

На этом сорбенте минорные фитостероиды из экстракта серпухи венценосной (табл. 11) удерживаются, но сам экдистен (основной фитостероид) сорбируется слабо (примерно в той же степени, как на неимпринтированном  $TiO_2$ ). Кроме того, гидрофобизованный силикагель значительно (более чем на 50%) извлекает компоненты матрицы экстракта. Эти данные подтверждают преимущества сорбентов на основе  $TiO_2$ .

При сорбции из препаратов на основе левзеи (рис. 14) сорбенты с силикагелем C18 сорбируют фитостероиды менее эффективно (до 60% из экстракта и до 10% из таблеток), чем импринтированные сорбенты (рис. 13), при этом ниже и селективность извлечения целевых аналитов.

Таблица 11. Степени извлечения (%) фитостероидов из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции (картриджи с силикагелем-С18) (n = 3, P = 0,95)

Аналит	Степень извлечения, %
Экдистен	28 ± 3
Экдизон	84 ± 8
Туркестерон	75 ± 6
Дакрихайнанстерон	85 ± 10
Макистерон А	109 ± 8
Макистерон С	108 ± 11
Компонент матрицы 1*	57 ± 8
Компонент матрицы 2*	66 ± 9
Компонент матрицы 3*	78 ± 7

\* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме

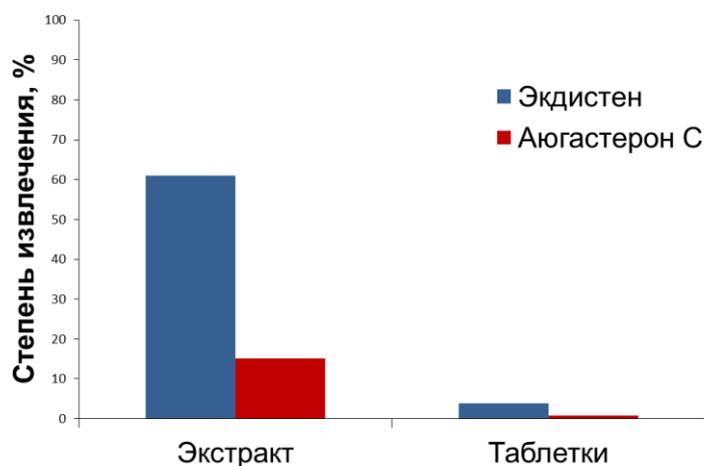


Рис. 14. Степени извлечения фитостероидов из препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*) после твердофазной экстракции на картриджах с гидрофобизованным силикагелем.

г) Применение импринтированных сорбентов при анализе растительных экстрактов методом ВЭЖХ-МС низкого разрешения

Полученные картриджи были опробованы для анализа растительных экстрактов серпухи и левзеи методами ВЭЖХ-МС (рис. 15–16) низкого разрешения и ВЭЖХ-УФ.

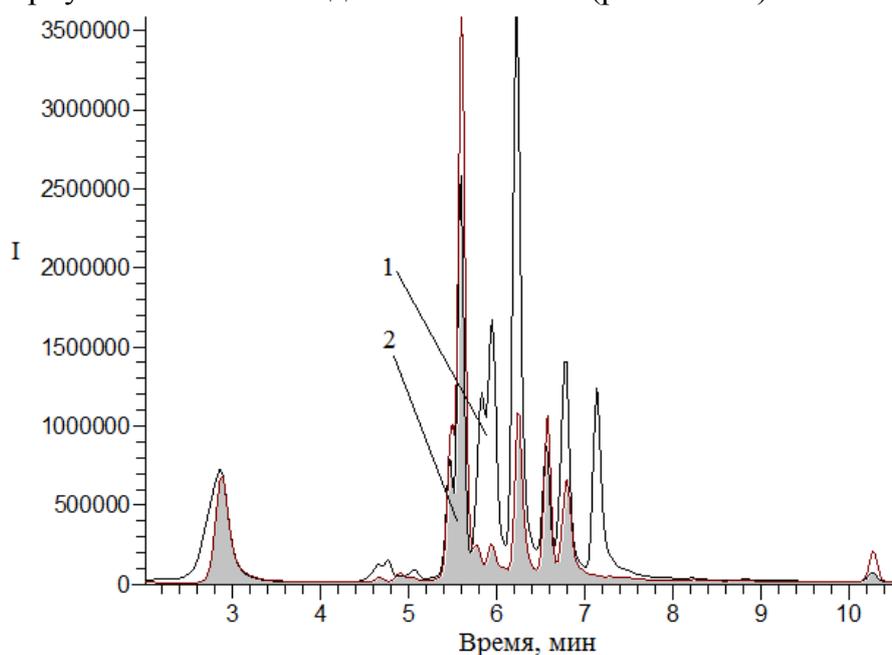


Рис. 15. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта левзеи: 1 – исходный образец, 2 – после сорбции на силикагеле-С-18 (экдистен – 5.6 мин, аюгастерон С – 6.8 мин).

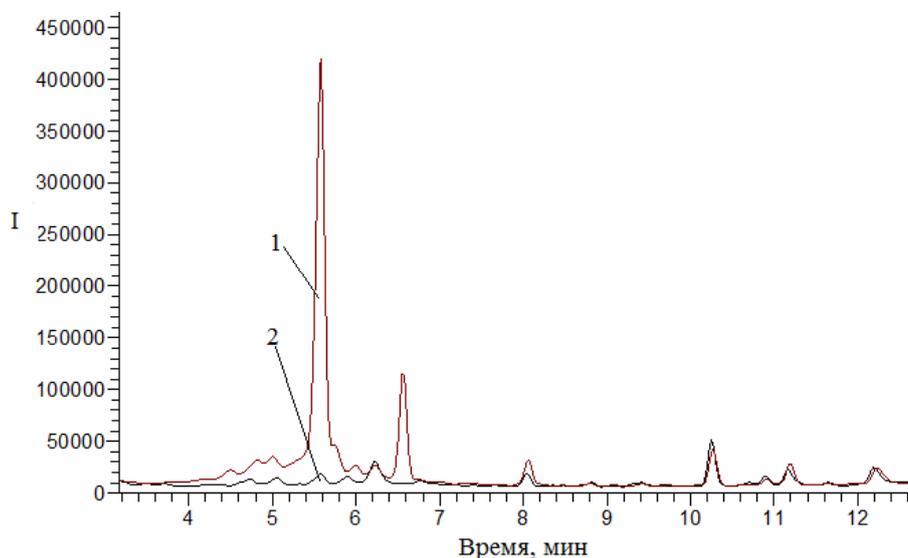


Рис. 16. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта левзеи: 1 – после сорбции на импринтированном  $\text{TiO}_2$ , 2 – после сорбции на контрольном  $\text{TiO}_2$  (экдистен – 5.6 мин, аюгастерон С – 6.8 мин).

Видно, что картриджи с импринтированным сорбентом позволяют избавиться от многих компонентов матрицы, причем в большей степени, чем силикагель С-18. После сорбции на импринтированном сорбенте (рис. 16(1)) на хроматограмме отчетливо видны пики фитостероидов (экдистен, аюгастерон). Отметим, что импринтированный сорбент не обладает абсолютной селективностью, и отдельные примеси в элюате также присутствуют (время удерживания 8.1, 10.2, 10.9, 11.2, 12.2 мин).

Как отмечалось ранее, нами была показана возможность прямого определения фитостероидов в растительном экстракте методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией низкого разрешения. Тем не менее, импринтированные сорбенты могут найти применение при невозможности хроматографического отделения фитостероида от компонента какого-то другого растительного экстракта. Кроме того, концентрирование фитостероидов на импринтированном сорбенте позволит сделать анализ более экспрессным, т.к. не потребуется полное разделение всех соединений, если основную их часть можно будет отделить на стадии сорбции.

\* \* \*

В результате проведенного исследования удалось получить сорбенты с молекулярными отпечатками экдистена и его комплекса с 3-аминофенилборной кислотой для групповой сорбции фитостероидов из растительных экстрактов и препаратов. Существующие методы выделения и концентрирования фитостероидов из растительных экстрактов в основном относятся к сорбционным и хроматографическим, состоят из большого числа стадий и весьма длительны. Такой подход нецелесообразно использовать, если нет задачи выделения каждого фитостероида отдельно. Разработанные нами картриджи для твердофазной экстракции на основе импринтированных сорбентов позволяют экспрессно концентрировать целевые аналиты и их селективно выделять. Показано их преимущество перед коммерчески доступными картриджами (с гидрофобизованным силикагелем С-18).

## Выводы

1. Выбраны условия экспрессной идентификации соединений класса фитоэкдистероидов, позволяющие идентифицировать их в сложных матрицах и смесях (таких как растительные экстракты и фармпрепараты) без предварительного препаративного разделения или использования большого числа стандартных образцов фитоэкдистероидов. Разработана методика идентификации и определения фитоэкдистероидов в матрице растительного экстракта методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения.

2. Определены характеристичные переходы для определяемых фитоэкдистероидов, описаны и подтверждены схемы их фрагментации. В анализируемых образцах растительных экстрактов и фармпрепаратов на основе серпухи венценосной и левзеи среди найденных неизвестных соединений идентифицированы фитоэкдистероиды и определено их содержание в расчете на экдистен.

3. Получены молекулярные отпечатки фитоэкдистероидов. Для получения отпечатков использован слой  $TiO_2$ , нанесенный на наночастицы  $TiO_2$  путем гидролиза *n*-бутоксид титана. Показана возможность групповой сорбции фитоэкдистероидов сорбентом с отпечатками одного из представителей соединений этого класса – экдистена. Степени извлечения фитоэкдистероидов импринтированным сорбентом в 2–3 раза выше, чем неимпринтированным. На примере экдистена в качестве темплата показано, что стабильность молекулярного отпечатка в матрице  $TiO_2$  выше, чем в полиэлектролитном мультислое и белке, что объяснено увеличением конформационной жесткости матрицы.

4. С использованием молекулярно-импринтированных сорбентов получены картриджи для твердофазной экстракции и разработана экспрессная методика селективного извлечения фитоэкдистероидов из растительного экстракта. Факторы разделения фитоэкдистероидов и посторонних компонентов растительного экстракта составляют  $10^1$ – $10^2$ . Сорбент, импринтированный комплексом экдистена с 3-аминофенилборной кислотой, более эффективен, чем импринтированный только экдистеном (степень извлечения фитостероидов из растительного экстракта до 75–80%), однако менее селективен (степень извлечения некоторых компонентов матрицы до 64%). Показана более высокая селективность импринтированных сорбентов по сравнению с гидрофобизованным силикагелем.

### Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Полянина Д. А., Беклемишев М. К. Молекулярно-импринтированные неорганические носители в высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции // *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 3. С. 1 – 11.

2. Севко Д. А., Беклемишев М. К., Родин И. А., Ихалайнен А. А., Антохин А. М., Таранченко В. Ф., Гончаров В. М., Аксенов А. В., Митрофанов Д. А. Изучение фитоэкдистероидного профиля экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения // *Масс-спектрометрия*. 2015. Т. 3. С. 177 – 183.

3. Севко Д. А., Абрамчук С. С., Ихалайнен А. А., Антохин А. М., Таранченко В. Ф., Гончаров В. М., Аксенов А. В., Митрофанов Д. А., Синуцын М. Ю., Беклемишев М. К. Селективное извлечение фитоэкдистероидов из растительного экстракта молекулярно-импринтированным сорбентом на основе диоксида титана // *Хим. раст. сырья*. 2015. № 2. С. 59 – 68.

4. Polyanina D. A., Lokhova L. O., Beklemishev M. K. Molecular imprinting of penicillin V and 20-hydroxyecdysterone in polyelectrolyte multilayers formed on a track-etched membrane by deposition from an organic solvent. MIP-2012. Paris, 2012.

5. Самарина Т. О., Крившенко Г. А., Лохова Л. О., Карпов В. М., Полянина Д. А., Беклемишев М. К. Молекулярно-импринтированные наноструктуры в "мокроем" химическом анализе. 3-я научн. конф. с межд. участием «Химия-2013. Физическая химия. Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика, преподавание». Москва, 14–16 марта 2013 г. Тезисы докладов. С. 79–81.

6. Полянина Д. А., Беклемишев М. К. Сорбенты кремнезем-белок, импринтированные экдистероном, для ВЭЖХ-МС анализа растительных экстрактов на фитостероиды. Тезисы докладов Второго съезда аналитиков. Москва, 23-27 сентября 2013. С. 374.

7. Севко Д. А., Беклемишев М. К. Селективное концентрирование фитостероидов с помощью молекулярно-импринтированного сорбента на основе диоксида титана. Тезисы конференции «Теория и практика хроматографии». Самара, 24-29 мая 2015. С. 199.

8. Севко Д. А., Беклемишев М. К. и др. Изучение фитостероидного профиля растений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. IX Всероссийская научная конференция с международным участием «Химия и технология растительных веществ». Москва. 28-30 сентября 2015 г.

*Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам, аспирантам и студентам лаборатории кинетических методов анализа за постоянное внимание к работе, помощь в ее выполнении и обсуждении результатов; руководству и сотрудникам ФГУП «НЦ "Сигнал"» за помощь в выполнении экспериментальной части и предоставленное оборудование; к.х.н. И.А.Родину за помощь в проведении масс-спектрометрического эксперимента; к.х.н. М.А.Статкусу за проведение рентгенофлуоресцентного анализа, к.х.н. С.С.Абрамчуку за получение микрофотографий.*