

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и инноваци-
ям ВятГУ



С.Г. Литвинец

2017 г.

Отчет по проведенным исследованиям на тему:

**Разработка методики определения содержания бетулина
в растительном экстракте,**

выполненной в рамках договора № 714/2017 от 19.12.2017 г.

Руководитель НИР, к.т.н.

 /Мартинсон Е.А./

Киров, 2017

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являются, предоставленные Заказчиком образцы экстракта бересты: № 1 - № 5, № 8, №9, №10.

Цель исследования – разработка методики количественного определения содержания бетулина в составе образцов экстракта бересты.

Для проведения исследования были использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии.

Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия является гибридным методом и объединяет независимые друг от друга процессы жидкостного хроматографического разделения и масс-спектрометрического анализа. Значение жидкостной хроматографии объясняется её способностью эффективно разделять большой круг органических веществ различной природы, включая термолабильные компоненты и соединения с достаточно высокой молекулярной массой. Масс-спектрометрия - один из наиболее мощных и информативных методов исследования структуры органических соединений и анализа сложных веществ и их смесей. Это прямой метод, позволяющий непосредственно определять молекулярную массу, состав молекул и их фрагментов, их связь между собой, изучать механизмы фрагментации. На основании этих данных находятся корреляционные зависимости между структурными характеристиками молекул и ионов, образующихся в результате распада молекул при ионизации. В современных высокочувствительных приборах – хроматомасс-спектрометрах реализуется, как правило, метод тандемной (двухстадийной) масс-спектрометрии.

Принцип работы такого прибора заключается в следующем. Проба исследуемой смеси с потоком подвижной фазы проходит через колонку жидкостного хроматографа. При этом происходит разделение смеси на отдельные компоненты, которые поочерёдно выходят (элюируются) из колонки и попадают в масс-

спектрометр. Первый масс-фильтр (квадруполь) осуществляет разделение первичных ионов, образующихся на первой стадии в результате «мягкой» электро-распылительной ионизации компонентов пробы, поступающих из жидкостного хроматографа. По структуре эти частицы, как правило, близки к исходным неионизированным молекулам и носят название ионов-прекурсоров (родительских ионов). Далее ионы-прекурсоры поступают во второй квадруполь, где подвергаются фрагментации за счет энергии соударения с атомами инертного газа (аргона). Образующиеся на второй стадии фрагментные ионы носят название ионов-продуктов (дочерних ионов). Таким образом, второй масс-фильтр (квадруполь) выполняет функцию ячейки соударительной диссоциации. Далее вторичные ионы-продукты, проходят фильтрацию в третьем масс-фильтре (квадруполе) и попадают на детектор.

В зависимости от выбранного режима работы масс-фильтров и соударительной ячейки, исследователь может получать спектры как ионов-прекурсоров, образующихся на первой стадии из анализируемых компонентов, так и продуктов их последующих превращений на второй стадии. Также можно настраивать масс-спектрометр на регистрацию отдельных ионов с определёнными массовыми числами, образующихся в результате заданных процессов распада выбранных молекулярных или осколочных ионов.

Исследования проводили на тандемном жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8040 («Шимадзу», Япония) с системой трёх квадруполей Научно-образовательного центра Нанотехнологии института Биологии и биотехнологии ВятГУ.

Прибор оснащён хроматографической колонкой «Dr. Maisch Reprosil-Pur Basic C18» 100 × 2 мм с размером зерен неподвижной фазы 3 мкм.

Экспериментальная часть

Подготовка проб к анализу

Точную навеску исследуемого образца, около 1 мг, помещали в пробирку Эппендорфа (1,5 мл) и растворяли в 1 мл метанола с использованием вортекса (встряхивателя). Содержимое пробирки центрифугировали с целью отделения нерастворившегося остатка. Надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой полиамидный фильтр «Chromafil Xtra PA-20/25» с диаметром пор 0,2 мкм и помещали в виалу автосамплера.

Условия проведения анализа

Дозируемый объем пробы	3 мкл;
Температура термостата колонок	35°C;
Расход подвижной фазы	0,25 мл/мин;
Режим элюирования – бинарный градиент:	
Фаза А – водный 0,1 %-ный раствор формиата аммония;	
Фаза Б - ацетонитрил: начальное содержание 70 % с 0 мин, увеличение до 95 % в течение 6 мин; выдержка при 95 % в течение 10 мин.	
Тип ионизации – электроспрей (положительная полярность);	
Ионизирующее напряжение	3,5 кВ;
Температура интерфейса	400°C;
Температура линии десольватации	250°C;
Расход газа – распылителя (азот)	3 л/мин;
Расход газа – осушителя (азот)	15 л/мин
Режимы сбора данных	Q3 Scan в диапазоне 400-500 а.е.м.,

Последующую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения LabSolutions LCMS 5.86.

Результаты исследования представлены в приложении в виде стандартного протокола, сформированного программой обработки данных.

На хроматограммах всех образцов присутствует единичный пик, обусловленный детектированием ряда ионов, из которых наиболее интенсивным является ион с m/z 425, соответствующий протонированному продукту отщепления воды

от молекулы бетулина: $[M - H_2O + H]^+$, где M – молекулярная масса бетулина, равная 442, 73. В масс-спектре компонента присутствуют также протонированные молекулярные ионы: $[M + H]^+$ с m/z 443, что дополнительно подтверждает соответствие хроматографического пика бетулину.

В таблице 1 приведены значения содержания бетулина в исследуемых образцах.

Таблица 1 – Содержание бетулина в исследуемых образцах

Исследуемый образец	Содержание бетулина, % по массе
№ 1	81,2
№ 2	84,5
№ 3	78,6
№ 4	97,2
№ 5	96,8
№ 8	94,3
№9	84,8
№10	100,0

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика для определения в образцах экстракта бересты содержание бетулина.

2. Содержание бетулина в исследованных образцах составляет от 78,6 до 100,0 %.