

на правах рукописи



ПАВЛОВА ЛАРИСА ВИКТОРОВНА

**ЭКСТРАКЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЦВЕТОВ «РОМАШКИ
АПТЕЧНОЙ» И ЛИСТЬЕВ «ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО»**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Воронеж 2015

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева (национальный исследовательский университет)» (СГАУ).

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Платонов Игорь Артемьевич

Официальные оппоненты: Дейнека Виктор Иванович,
доктор химических наук, профессор,
ФГАОУ ВПО «Белгородский
государственный национальный
исследовательский университет», институт
инженерных технологий и естественных наук,
кафедра общей химии, профессор

Рудакова Людмила Васильевна,
доктор химических наук, доцент, ГБОУ ВПО
«Воронежский государственный медицинский
университет имени Н. Н. Бурденко»,
фармацевтический факультет, кафедра
фармацевтической химии и фармацевтической
технологии, заведующий

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

Защита состоится «20» января 2016 г. в 14 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.038.19 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1, ауд. № 439.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «20» ноября 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

 Столповская Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие новых направлений пищевой промышленности, создание спецпитания для лиц, подвергающихся экстремальным нагрузкам, расширение ассортимента фитопрепаратов, влечет за собой разработку и внедрение прогрессивных химико-технологических процессов переработки лекарственных растений (ЛР). Замена органических растворителей водой при проведении процесса экстракции, а также использование высоких температур и давления, позволяет сократить время экстракции и получить экологически безопасный продукт.

Большинство физиологически или биологически активных соединений (БАС), содержащихся в лекарственных растениях (ЛР), относятся к терпеноидам и ароматическим соединениям, индивидуальную идентификацию и количественную оценку которых зачастую нет возможности провести, в связи с бесконечным разнообразием БАС и отсутствием стандартных образцов. Вследствие этого, оценку качества и подлинности ЛР проводят по единичным компонентам, оставляя без внимания остальные БАС, присутствие которых в ЛР также может влиять на его эффективность. Научный интерес представляет применение спектров, полученных хроматографическими или спектроскопическими методами, для сертификации растений и препаратов на их основе. В различных источниках данный подход называется по-разному: «безэталонный метод оценки качества», «фингерпринт» метод или метод распознавания общего образа объекта, который обозначен в числе приоритетных направлений развития аналитической химии. Кроме того незаслуженно мало внимания уделяется применению парофазного анализа (ПФА) для определения терпеноидных и ароматических соединений ЛР, хотя данный метод анализа имеет явные преимущества, по сравнению с анализом экстрактов и эфирных масел, за счет экономии сырья и времени анализа.

По имеющимся данным прослеживается консервативное отношение к внедрению в практику контроля растительных лекарственных препаратов методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС. Поэтому очень актуальна задача разработки новых методик идентификации и оценки качества ЛР с применением хроматографических методов.

Целью данной диссертационной работы является разработка комплексного подхода к извлечению и определению терпеноидных и ароматических соединений цветов «ромашки аптечной» (*Chamomilla recutita R.*) и листьев «эвкалипта прутовидного» (*Eucalypti viminalis Labill*) для получения общего образа объекта.

Задачи исследования.

1. Определить оптимальные условия пробоподготовки ЛР для проведения парофазного анализа, обеспечивающих эффективное извлечение определяемых компонентов из растительного сырья.

2. Провести качественный и количественный анализ терпеноидных и ароматических соединений экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

3. Оценить возможности применения ПФА для получения общего образа цветов «ромашки аптечной» и общего образа листьев «эвкалипта прутовидного» на основе хроматографического спектра.

4. Провести сравнение различных сорбентов для концентрирования летучих терпеноидных, ароматических и других органических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» с целью их применения в качестве образцов состава ЛОС.

5. Выявить закономерности извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» субкритической водой и водно-этанольными смесями в статических и динамических режимах при различных температурах и давлении с целью получения общего образа объекта на основе хроматографического спектра.

Научная новизна.

Впервые на основе хроматографических спектров летучих и нелетучих терпеноидных и ароматических соединений определены ГХ-МС и ВЭЖХ-УФ «фингерпринты» цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Впервые разработаны образцы состава терпеноидных и ароматических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» в виде сорбционных микротрубок, которые могут использоваться также для идентификации органических соединений.

Доказана эффективность и выявлены закономерности использования субкритической воды и водно-этанольных смесей при повышенном давлении и температуре для извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Практическая значимость.

На основании сравнительного анализа хроматографических спектров терпеноидных и ароматических соединений разработана схема идентификации цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Предложенные в работе новые методические решения идентификации и анализа цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» внедрены в практику работы следующих предприятий Самарской области: ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (г. Самара), ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Самара), ООО «Центр-Аналитика» (г. Самара), Филиал № 3 ФГКУ «111 Главного Государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России (г. Самара).

На защиту выносятся следующие положения.

1. Результаты определения оптимальных условий пробоподготовки для проведения парофазного анализа цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

2. Использование хроматографических спектров, полученных методом ПФА, в качестве «фингерпринтов» цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

3. Применение сорбционных микротрубок в качестве образцов состава ЛОС цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

4. Закономерности извлечения терпеноидных и ароматических соединений из цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» с помощью воды

и водно-этанольных смесей при повышенных температуре и давлении для получения «фингерпринтов» в виде хроматографических спектров.

5. Качественное и количественное определение терпеноидных и ароматических соединений экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» хроматографическими методами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Апробация работы. Основные результаты докладывались на следующих научных конференциях: на Первой зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), на X Международном Курнаковском совещании по физико-химическому анализу (Самара, 2013), на Втором съезде аналитиков России (Москва 2013), на Втором Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» (Краснодарский край, 2013), на XIV конференция «Иониты -2014» и Третьем симпозиуме «Кинетика и динамика обменных процессов» (Воронеж, 2014), на Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» (Самара, 2015).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, списка используемой литературы (171 наименование).

Диссертационная работа изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 44 таблицы и 47 рисунков.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ проект 13-03-97012-р_поволжье_a; поддержана Минобрнауки РФ в рамках государственного задания на выполнение работ, проект № 608.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дано обоснование актуальности темы исследования, сформулированы цели и задачи.

В **первой главе** «Обзор литературы» обсуждаются подходы к анализу ЛР по характерному хроматографическому спектру, рассмотрены основные принципы применения данного метода. Кроме этого приведен обзор исследований по идентификации компонентов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

Во **второй главе** «Экспериментальная часть» приведен перечень используемых материалов, оборудования, а также методов пробоподготовки.

Объекты исследования: цветки «ромашки аптечной» (*Chamomilla recutita R.*), выращенные в Самарском Ботаническом саду в 2014 г., а также производства ООО «Красногорсклексредства» (КЛС) 2012 и 2014 года выпуска, ПКФ «Фитофарм» ООО 2012 г., ООО «Камелия-ЛТ» 2012 г., ООО «Рослекраспром» 2012 г.; листья «эвкалипта прутовидного» (*Eucalypti viminalis Labill*)» ПКФ «Фитофарм» ООО; ООО «Красногорсклексредства».

Эксперимент по изучению ЛОС в экстрактах цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 GC, совмещенный с масс-селективным детектором с ионизацией электронным

ударом 5975 С производства Agilent Technologies (США). Разделение проводили с использованием кварцевых капиллярных колонок различной полярности в режиме программирования температуры.

Концентрирование газового экстракта ЛР проводили на сорбционные микротрубки на основе инъекционных игл размером 0.8 × 38 мм, для заполнения которых использовали сорбенты: Tenax TA, Carborack B, Porapak Q, Haye Sep N, MN-202.

Жидкостная экстракция БАС из ЛР осуществлялась в условиях, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Условия проведения экстрагирования БАС из листьев «эвкалипта прутовидного» и цветов «ромашки аптечной»

ЛР	Экстрагент	Режим экстрагирования	Диапазон температур, °С	Давление, МПа	Условное обозначение экстракта
«листья эвкалипта»	Вода	Статика	95	0.1	ВЭ 95°С 0.1МПа
	Вода	Динамика	120,160,200	5	ЭСВ120, 160, 200°С 5МПа
	Вода : Этанол 30:70	Статика	25°С	0.1	ЭЭ 70%25°С 0.1МПа
	Вода : Этанол 90:10	Динамика	200	5	ЭЭ 10%200°С 5МПа
	Вода : Этанол 50:50	Динамика	200	5	ЭЭ 50%200°С 5МПа
	Вода : Этанол 30:70	Динамика	200	5	ЭЭ70% 200°С 5 МПа
«цветы ромашки аптечной»	Вода	Статика	95	0.1	ВЭ 95°С 0.1МПа
	Вода	Динамика	150,200	5	ЭСВ 150, 200°С 5МПа
	Вода : Этанол 50:50	Статика	25	0.1	ЭЭ 50%25°С 0.1МПа
	Вода : Этанол 30:70	Статика	25	0.1	ЭЭ 70%25°С 0.1МПа
	Вода : Этанол 90:10	Динамика	150,200	5	ЭЭ 10% 150, 200°С 5МПа
	Вода : Этанол 50:50	Динамика	150,200	5	ЭЭ 50% 150, 200°С 5МПа
	Вода : Этанол 30:70	Динамика	150,200	5	ЭЭ 70% 150, 200°С 5 МПа

Отбор проб для анализа при динамической экстракции осуществлялся фракциями по 5 см³, с последующим анализом каждой фракции методами ГХ-МС, ВЭЖХ-УФ, МС, УФ- и ИК-спектроскопии.

Для получения общего образа объектов исследования в виде хроматографического спектра нелетучих БАС методом ВЭЖХ анализ экстрактов осуществляли в обращенно-фазовом варианте (ОФ) ВЭЖХ в градиентном режиме со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 210, 278 и 340 нм. Разделение осуществляли на колонке Luna C₁₈ Phenomenex (США) 250 мм × 4.6 мм×5 мкм – для экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного», на колонке Luna C₁₈ Phenomenex (США) 250мм × 3мм × 5мкм – для экстрактов цветов «ромашки аптечной». В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 0.01М фосфатного буфера (рН=3).

В третьей главе «Определение физиологически активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» для получения общего образа объекта методом парофазного анализа» приведены экспериментальные данные оптимизации режима пробоподготовки ЛР для проведения ПФА; результаты идентификации терпеноидных и ароматических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» методом ПФА; результаты использования хроматографического спектра в качестве общего образа «ромашки аптечной» и общего образа «эвкалипта прутовидного»; результаты применения сорбционных трубок на основе инъекционных игл в

качестве образцов состава ЛОС цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного».

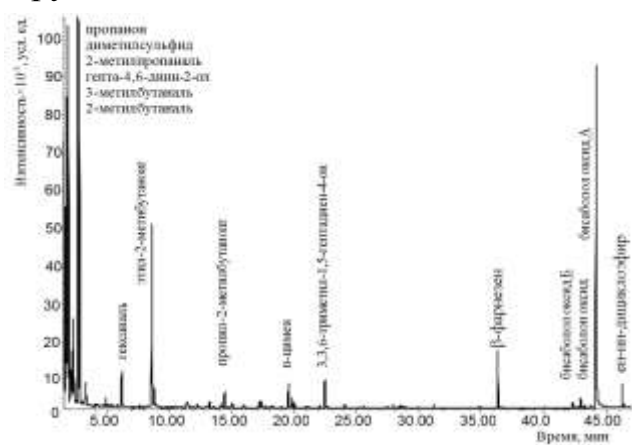


Рисунок 1 – Хроматографический спектр, цветов «ромашки аптечной», полученный при ПФА.

Установлены оптимальные условия получения газовых экстрактов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»: термостатирование 1 г сырья в герметичном флаконе при температуре 100°C в течение 30 мин. Идентификация ЛОС проводилась по масс-спектрам и индексам удерживания, полученным в режиме линейного

программирования температуры с использованием имеющихся баз данных. Всего при ПФА цветов «ромашки аптечной» обнаружено 45 соединений, которые по имеющимся данным являются физиологически активными веществами, большинство из них относится к терпеноидам. Установлено, что данные компоненты присутствуют во всех изучаемых образцах «ромашки аптечной». Основные компоненты газового экстракта цветов «ромашки аптечной», имеющие наиболее интенсивные пики на хроматограмме, и хроматографический спектр представлены на рисунке 1.

Таблица 2 – Соотношение доминирующих компонентов газового экстракта цветов «ромашки аптечной» разных производителей.

Производитель	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A} \pm \Delta$, n=5, P=0.95									
	2-Пропанон	Диметилсульфид	2-Метилпропаналь	Гепта-4,6-дин-2-ол	3-Метилбутаналь	2-Метилбутаналь	Этил-2-метилбутанат	Пропил-2-метилбутанат	3,3,6-Триметил-1,5-гептадиен-4-он	Бисаболол оксид А
«Рослекраспром» 2012 Краснодарский край	9.78 ±1.58	13.59 ±0.49	12.20 ±0.25	13.17 ±1.80	11.77 ±0.20	23.87 ±1.59	6.24 ±0.69	0.72 ±0.05	2.09 ±0.16	6.57 ±0.98
«Камелия» 2012 г. Пенза	5.84 ±0.19	15.55 ±0.82	10.03 ±0.59	11.97 ±1	15.53 ±0.18	24.77 ±0.12	8.98 ±0.28	0.78 ±0.21	2.20 ±0.40	4.37 ±0.22
«Фитофарм» 2012 г. Анапа	4.70 ±0.52	7.93 ±0.95	9.03 ±0.33	12.98 ±0.13	10.61 ±0.51	19.29 ±0.53	20.42 ±0.96	1.84 ±0.07	3.45 ±0.15	10.94 ±0.59
«Красногорсклексредства» 2012, Московская обл.	2.41 ±0.87	11.39 ±0.80	13.40 ±0.88	6.30 ±1.2	14.54 ±0.25	16.34 ±1.74	11.25 ±1.73	1.08 ±0.12	2.14 ±0.27	19.97 ±1.69
«Красногорсклексредства» 2014 Московская обл.	3.84 ±1.14	10.60 ±0.51	8.67 ±0.99	4.89 ±1.07	11.02 ±0.71	22.44 ±0.64	29.29 ±3.09	2.55 ±0.40	4.25 ±0.43	2.45 ±0.60
Самарский Ботанический сад 2014 г. Самара	1.98 ±0.14	39.27 ±1.46	5.08 ±0.95	1.48 ±0.18	6.23 ±1.13	12.03 ±0.14	24.05 ±0.37	1.92 ±0.18	4.88 ±0.61	3.08 ±0.12
$\mu \pm \Delta$, n=30, P=0.95	4.76 ±1.01	16.39 ±3.99	9.73 ±1.03	8.46 ±1.73	11.62 ±1.15	19.79 ±1.72	16.70 ±3.22	1.48 ±0.26	3.17 ±0.43	7.90 ±3.22
ОСКО, $\sigma_r(A)$	0.57	0.65	0.28	0.55	0.27	0.23	0.52	0.47	0.36	0.79

Для оценки возможности использования соотношения основных компонентов на хроматограмме, полученной методом ПФА, в качестве общего образа «ромашки аптечной», был проведен анализ цветов «ромашки аптечной» разных производителей (табл.2). Установлено, что соотношение компонентов

хроматографического спектра не воспроизводится при сравнении образцов, ОСКО колеблется в зависимости от компонента от 0.23 до 0.79. Для выявления связи между образцами результаты обработали по методу главных компонент (МГК) (рис. 2). Данные по соотношению компонентов сгруппировались как по производителям – четко выделяются образцы, выращенные в Самаре, так и, вероятно, по происхождению растений – сказывается климатический, географический факторы, следовательно, хроматограмма, полученная методом ПФА цветов «ромашки аптечной», может указываться лишь в качестве общего образа или «фингерпринта» партии ЛР.

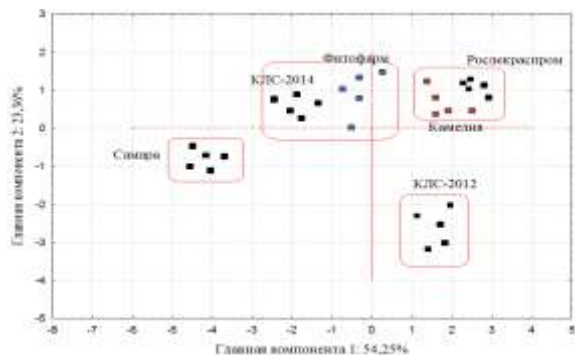


Рисунок 2 – График ПФА-хроматографических спектров образцов цветов «ромашки аптечной» разных производителей в координатах главных компонент 1 и 2.

По аналогии с цветами «ромашки аптечной» был проведен анализ ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного». При ПФА обнаружено 119 компонентов, из которых 76 удалось идентифицировать. Практически все идентифицированные соединения относятся к терпеноидам. Соотношение площадей наиболее интенсивных пиков на хроматограмме газового экстракта (рис.3-а), приняли за характерный хроматографический спектр листьев «эвкалипта прутовидного» (табл.3).

При анализе образцов листьев «эвкалипта прутовидного» разных производителей установлено, что хроматографический спектр, полученный методом ПФА, является воспроизводимой характеристикой, ОСКО составляет в среднем 0.11. Обработка данных МГК показала, что результаты, полученные при анализе ЛР разных производителей, образуют единую группу. Следовательно, хроматографический спектр, полученный методом ПФА, может использоваться в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного».

Таблица 3 – Соотношение доминирующих компонентов газовых экстрактов листьев «эвкалипта прутовидного» (ЭП) и листьев «эвкалипта шаровидного»(ЭШ)

ЛР	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A}_i \pm \Delta$, n=5, P=0.95								
	α -Пинен	Камфен	β -Пинен	α -Феландрен	<i>n</i> -Цимен	1,8-Цинеол	4-Терпинеол	α -Терпинеол	Аромандрен
ЭП	26.45 ± 0.74	0.98 ± 0.12	8.10 ± 0.66	1.55 ± 0.48	10.94 ± 1.10	47.02 ± 1.30	0.76 ± 0.20	0.78 ± 0.22	3.43 ± 0.54
$S_r(A)$	0.01	0.11	0.07	0.24	0.03	0.02	0.13	0.18	0.11
ЭШ	7.32 ± 1.18	0.21 ± 0.08	0.36 ± 0.18	1.30 ± 0.24	4.73 ± 0.88	86.04 ± 2.11	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.003 ± 0.001
$S_r(A)$	0.13	0.31	0.41	0.15	0.15	0.02	0.23	0.36	0.26

По имеющимся данным общий образ объекта или «фингерпринт» используется для идентификации ЛР. Для установления этой возможности в отношении листьев «эвкалипта прутовидного», было проведено сравнение хроматографических спектров листьев «эвкалипта прутовидного» и листьев «эвкалипта шаровидного», полученных методом ПФА (рис. 3).

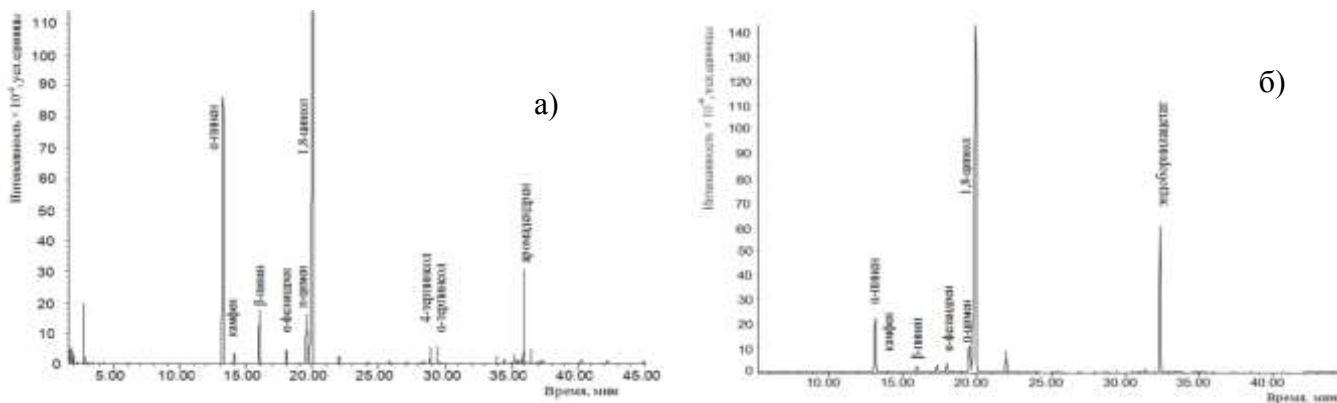


Рисунок 3 – Хроматографические спектры, полученные при ПФА (а) – листьев «эвкалипта прутовидного»; (б) – листьев «эвкалипта шаровидного».

Обработка результатов МГК продемонстрировала четкую группировку результатов по видам эвкалипта (рис. 4).

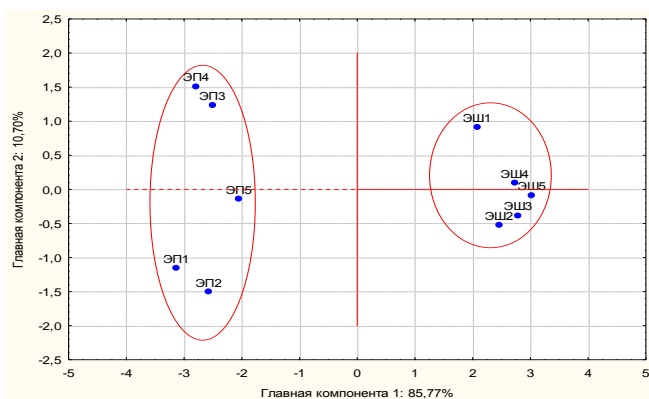


Рисунок 4 – График результатов ПФА «эвкалипта прутовидного» в координатах главных компонент 1 и 2.

Результаты проведенного эксперимента показывают, что хроматографический спектр листьев «эвкалипта прутовидного», полученный методом прямого ПФА, является воспроизводимой характеристикой и может использоваться в качестве общего образа объекта, в том числе и для

идентификации листьев «эвкалипта прутовидного».

В целях повышения информативности анализа проводили твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ) ЛОС с последующей термодесорбцией. Кроме этого в практике хроматографического анализа представляет интерес использовать этот прием для получения образцов известного качественного состава ЛОС, которые могут быть использованы для идентификации компонентов смесей органических соединений природного и техногенного происхождения.

Известно, что определение объема до проскока осуществляется до выхода первого компонента смеси. Оценка сорбционных свойств указанных выше сорбентов проводилась для листьев «эвкалипта прутовидного» – по α-пинену, компоненту, который элюируется первым на хроматограмме газового экстракта; для цветов «ромашки аптечной» – по 2-метилбутаналу, который при определении объема до проскока выходит одновременно с первыми компонентами, такими как 2-пентанон, диметилсульфид, 2-метилпропаналь, гепта-4,6-диин-2-ол, 3-метилбутаналь, кроме этого пик 2-метилбутанала имеет большую интенсивность и хорошо разделяется с соседними компонентами газового экстракта.

В отношении ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» самыми эффективными сорбентами оказались Haye Sep N, MN 202 и Porapak Q (рис. 5).

Для ЛОС цветов «ромашки аптечной», исходя из рисунка 6, наиболее эффективными сорбционными характеристиками обладают сорбенты Carborapak B, MN-202 и Porapak Q, но предпочтение нужно отдать Porapak Q, поскольку он показывает лучшие результаты по сорбции-десорбции ЛОС.

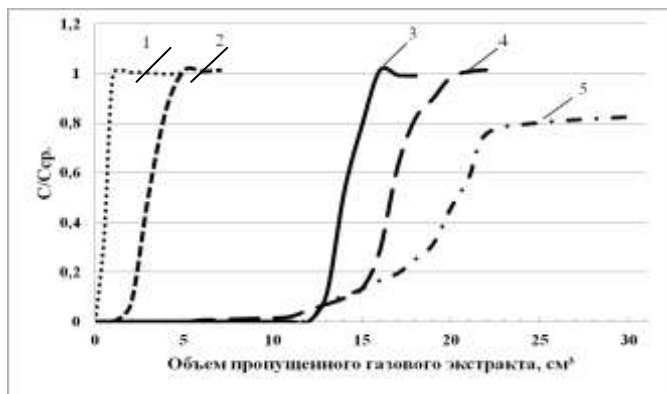


Рисунок 5 – Выходные кривые сорбции ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного»: 1 – Tenax TA, 2 – Carborack B, 3 – MN-202, 4 – Haye Sep N, 5 – Porapak Q.

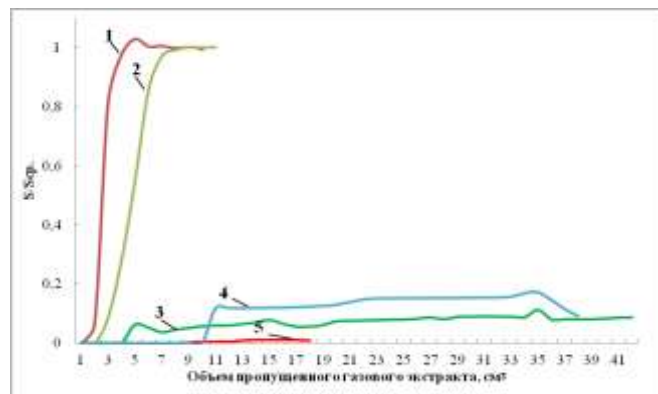


Рисунок 6 – Выходные кривые сорбции ЛОС цветов «ромашки аптечной»: 1 – Tenax TA, 2 – Haye Sep N, 3 – Porapak Q, 4 – Carborack B, 5 – MN-202.

Обработка данных ТФМЭ с последующей термодесорбцией по МГК показала (рис. 7), что ТФМЭ на Haye Sep N, MN-202 и Porapak Q дополняет картину, полученную при ПФА, усиливая достоверность общего образа «эвкалипта прутовидного», поэтому данные сорбенты являются наиболее предпочтительными для ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного».

В отношении ЛОС цветов «ромашки аптечной» было отмечено, что при ТФМЭ на всех рассматриваемых сорбентах не воспроизводится хроматографический спектр ЛОС, полученный при ПФА, в отличие от листьев «эвкалипта прутовидного». Доминирующими компонентами при ТФМЭ являются 3-метилбутаналь, 2-метилбутаналь, этил-2-метилбутаноат, пропил-2-метилбутаноат, *n*-цимен, 3,3,6-триметил-1,5-гептадиен-4-он, β -фарнезен, α -бисаболол оксид Б, бисаболон оксид, бисаболол оксид А.

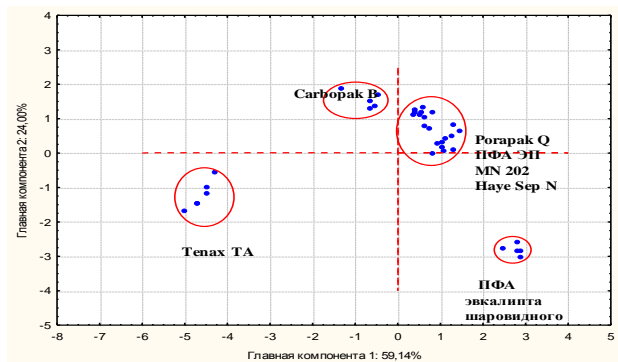


Рисунок 7 – График результатов ТФМЭ и ПФА газового экстракта листьев «эвкалипта прутовидного» (ПФА ЭП) и листьев «эвкалипта шаровидного» в координатах главных компонент 1 и 2.

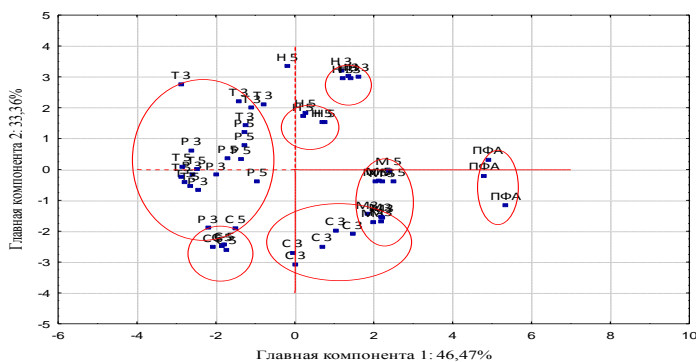


Рисунок 8 – График результатов ТФМЭ ЛОС цветов «ромашки аптечной» в координатах главных компонент 1 и 2. (ПФА – прямой ПФА газового экстракта; С – ТФМЭ на Carborack B; Т – ТФМЭ на Tenax TA; Р – ТФМЭ на Porapak Q; М – ТФМЭ на MN-202; Н – ТФМЭ на Haye Sep N. Цифровое обозначение указывает на объем концентрирования при ТФМЭ).

Обработка результатов ТФМЭ ЛОС цветов «ромашки аптечной» с последующей термодесорбцией МГК (рис. 8) показала, что взаимозаменяемыми для получения хроматографического спектра «ромашки аптечной» могут быть только Tenax TA и Porapak Q. Использование рассматриваемых сорбентов для ТФМЭ ЛОС

цветов «ромашки аптечной» с последующей термодесорбцией, дает индивидуальный хроматографический спектр, который может рассматриваться в качестве общего образа «ромашки аптечной» только с привязкой к конкретному сорбенту и конкретной партии ЛР.

По имеющимся данным срок хранения сорбционных трубок, содержащих ЛОС, может составлять до 25 месяцев. Для установления срока хранения сорбционных микротрубок с ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» и цветов «ромашки аптечной» был проведен контроль содержания α -пинена, n -цимена, 1,8-цинеола, β -фарнезена и бисаболол оксида А с периодичностью 3 месяца в течение 1 года. Изменение концентрации α -пинена, n -цимена, 1,8-цинеола, β -фарнезена и бисаболол оксида А находится в пределах 5-10%, что укладывается в величину ОСКО определения концентрации данных компонентов при ТФМЭ. На текущий момент срок хранения сорбционных микротрубок с ЛОС «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного» составляет 12 месяцев.

В четвертой главе «Определение физиологически активных компонентов в жидких экстрактах листьев «эвкалипта прутовидного» и цветов «ромашки аптечной» для получения общего образа объекта» изучается эффективность использования субкритической воды и водно-этанольных смесей при повышенных температуре и давлении для извлечения БАС цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного», а также определяются условия получения общих образов жидких экстрактов изучаемых растений.

В ряде случаев парофазного анализа недостаточно для получения общего образа объекта растительного происхождения, поэтому для создания набора характеристик, а также более полного изучения компонентного состава были исследованы различные способы жидкостной экстракции: традиционные, а также экстракция горячими растворителями при повышенном давлении (табл. 1).

Для получения общего образа объекта необходимо использовать наиболее эффективное извлечение компонентов из матрицы. Эффективность извлечения ЛОС в экстрактах листьев «эвкалипта прутовидного» оценивали по содержанию α -пинена, β -пинена, α -феландрена, n -цимена, 1,8-цинеола (табл.4). Как показано в таблице 4, для наиболее полного извлечения ЛОС из «эвкалипта прутовидного» необходимо применять в качестве экстрагента 70% раствор этанола в воде при температуре 200°C и давлении 5 МПа, при этом экспериментальные данные по извлечению 1,8-цинеола субкритической водой при 200°C и 5 МПа сопоставимы с экстракцией 70% этанолом при 200°C 5 МПа в динамическом режиме. При экстракции традиционными способами (ВЭ 95°C 0.1МПа и ЭЭ 70% 25°C 0.1 МПа) ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» извлекается на несколько порядков меньше чем при субкритической экстракции. Кроме этого установлено, что экстракция субкритической водой при температурах 120°C и 160°C также не позволяет провести эффективное извлечение ЛОС из листьев «эвкалипта прутовидного». Систематическая погрешность определения концентрации составляет в среднем 0.02. При практически одинаковом извлечении 1,8-цинеола за время всего процесса (табл. 4) для ЭСВ 200°C 5МПа и ЭЭ 70% 200°C 5МПа, динамика экстракции неодинакова – чем больше этанола содержит экстрагент, тем быстрее происходит извлечение. Максимум извлечения ЛОС

экстрактов «эвкалипта прутовидного» наблюдается после прохождения 15-20 см³ экстрагента.

Таблица 4 – Масса извлекаемых ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» мкг/г растительного сырья в режиме динамической экстракции

ЛОС	ЛОС, $\bar{w} \pm \Delta$, n=5, P=0.95 мкг/г растительного сырья							
	ЭВ 95°C 0.1МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1МПа	ЭСВ 120°C 5МПа	ЭСВ 160°C 5МПа	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа
α-пинен		-	-	-	-	-	136.32±5.44	501.07±10.05
β-пинен		-	-	-	-	-	94.91±2.57	257.57±7.88
α-феландрен		0.61 ±0.08	-	-	-	-	301.27 ±9.62	1318.75 ±15.96
n-цимен	0.46 ±0.05	0.23 ±0.04	3.75 ±0.25	10.68 ±0.72	17.45 ±0.52	18.34 ±0.56	145.02 ±3.29	173.71 ±3.24
1,8-цинеол	14.16 ±0.09	20.44 ±0.05	494.95 ±8.09	749.98 ±13.25	1073.36 ±10.35	1038.55 ±10.97	1047.57 ±10.34	1098.57 ±11.62

Таблица 5 – Доминирующие компоненты и их соотношение на характерном хроматографическом спектре ЭЭ 70% 200°C 5МПа листьев «эвкалипта прутовидного», полученном методом ГХ-МС

№ п/п	Время удерживания, мин	Индекс удерживания I_i^T	ЛОС	Относительное содержание ЛОС, % $\bar{A} \pm \Delta$, n=5, P=0.95
1	13.23	926±2	α-пинен	9.31±0.85
2	15.12	953±2	1,1-диэтокси-3-метилбутан	1.56±0.13
3	16.03	967±2	β-пинен	3.98±0.41
4	18.08	997±2	α-феландрен	7.25±0.69
5	19.56	1017±2	n-цимен	5.99±0.57
6	19.81	1021±2	лимонен	3.08±0.44
7	19.98	1023±2	1,8-цинеол	14.57±1.12
8	22.05	1051±2	γ-терпинен	1.41±0.18
9	28.91	1169±2	4 терпинеол	1.04±0.15
10	29.44	1181±2	α-терпинеол	1.44±0.18
11	35.97	1444±2	аромадендрен	3.72±0.35
12	40.33	1592±2	глобулол	2.16±0.24
13	41.73	1637±2	γ-эудесмол	4.19±0.39
14	42.21	1649±2	β-эудесмол	15.18±1.12
15	42.28	1651±2	α-эудесмол	10.38±0.95
16	44.66	1781±2	10-ди-эпи-γ-эудесмол	1.12±0.17
17	45.31	1823±2	эпи-критомеридиол	6.19±0.62
18	47.18	1963±2	пальмитиновая кислота	2.12±0.19
19	48.46	2076±2	кембрен	1.48±0.13
20	54.56	2731±2	β-ситостерол	1.68±0.14

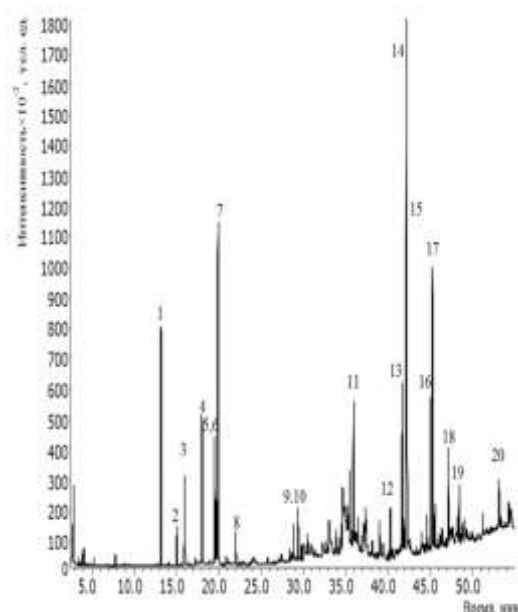


Рисунок 9 – Характерный ГХ-МС спектр ЭЭ 70% 200°C 5МПа листьев «эвкалипта прутовидного».

Хроматографический спектр ЭЭ 70% 200°C 5МПа, полученный методом ГХ-МС, будет иметь вид, представленный на рисунке 9. Данная характеристика воспроизводится с ОСКО 0.1, поэтому может быть использована в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного» (рис. 9, табл. 5).

Оценка эффективности экстракции физиологически активных компонентов из листьев «эвкалипта прутовидного» при ВЭЖХ анализе проводилась по содержанию

эвкалимина, относящегося к группе фенолоальдегидов. Как и в случае с ЛОС, экстракции эвкалимина при ЭВ 95°C 0.1 МПа, ЭСВ120°C 5 МПа и ЭСВ 160°C 5МПа происходит неэффективно. Установлено, что максимальное извлечение эвкалимина происходит при ЭЭ 70% 200°C 5 МПа (табл. 6), тем же условиям отвечает и максимальный выход сухого остатка полученных экстрактов. Систематическая погрешность определения эвкалимина определялась с использованием стандартного образца и составила 0.02. Изучение динамики извлечения эвкалимина, а также пофракционная оценка сухого остатка показали, что для получения ВЭЖХ-хроматографического спектра, содержащего наиболее интенсивные пики компонентов экстрактов, необходимо отбирать пробу, с начала процесса экстракции по 5 см³ экстракта, получаемого в динамическом режиме.

Таблица 6 – Концентрация эвкалимина в полученных экстрактах

Вид экстракта	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 25°C 0.1МПа
Концентрация эвкалимина, $X \pm \Delta$, $n=5, P=0.95, \text{мг/см}^3$	0.35±0.07	0.39±0.04	1.14±0.05	2.14±0.08	1.71±0.03

Используя литературные данные и результаты проведенного СВЭЖХ-МС анализа, установили, что доминирующими нелетучими БАС листьев «эвкалипта прутовидного» являются: фенольные кислоты: галловая кислота, хлорогеновая кислота, эллаговая кислота, кофейная кислота; а также хинная кислота, и терпеноиды: эуглобаль монотерпен, эуглобаль сесквитерпен, урсоловая кислота.

Таким образом, для получения общего образа листьев «эвкалипта прутовидного» в виде ВЭЖХ-хроматографического спектра, необходимо проводить экстракцию 70% раствором этанола в воде при температуре 200°C и давлении 5 МПа в динамическом режиме. Характерный хроматографический спектр в этом случае будет иметь вид, представленный на рисунке 10.

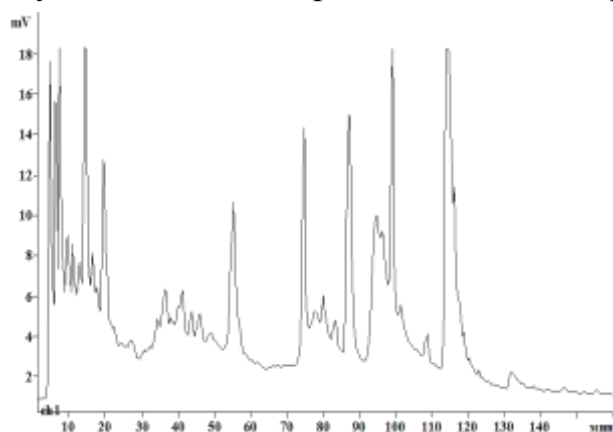


Рисунок 10 – Хроматографический спектр, полученный при ВЭЖХ анализе ЭЭ 70% 200°C 5 МПа листьев «эвкалипта прутовидного» при длине волны 210 нм.

ГХ-МС анализ жидких экстрактов цветов «ромашки аптечной», полученных согласно условиям, представленным в таблице 1, показал, что доминирующим компонентом во всех видах экстрактов, кроме ВЭ 95°C 0.1МПа, является 7-метоксикумарин – ароматическое соединение. Повышение температуры экстракции незначительно влияет на качественный состав, однако модификация воды 50 и 70% этанола увеличивает число извлекаемых соединений. Кроме 7-метоксикумарина во всех экстрактах содержатся терпеноиды: бисаболол оксид Б, бисаболон оксид, хамазулен, бисаболол оксид А, ен-ин-дициклоэфир, ен-ин-дициклоэфир-изомер;

также гексадекановая кислота, этилгексадеканат, 2(1H)октагидро-4а-фенилнафталенон. В ЭЭ 10% 200°C 5 МПа содержится кумарин. Такие соединения как стигмастерол, β -ситостерол, β -амирин, бетулин и 3 β -О-цинамоиллулеол присутствуют только в ЭЭ 50% 200°C 5 МПа и ЭЭ 70% 200 °С 5 МПа. Матрикарин извлекается только при температуре процесса 150°C, поскольку является термолабильным соединением.

Таблица 7 – Масса извлекаемых ЛОС цветов «ромашки аптечной» мкг/г растительного сырья

ЛОС	Содержание ЛОС в экстрактах, $\bar{w} \pm \Delta$, n=5, P=0.95 мкг/г растительного сырья							
	ЭСВ 150°C 5 МПа	ЭСВ 200°C 5МПа	ЭЭ10% 150°C 5МПа	ЭЭ 10% 200°C 5МПа	ЭЭ 50% 150°C 5МПа	ЭЭ 50% 200°C 5МПа	ЭЭ 70% 150°C 5МПа	ЭЭ 70% 200°C 5МПа
хамазулен	157.1 ±1.6	55.4 ±1.2	83.6 ±2.7	158.9 ±6.3	229.8 ±4.6	174.8 ±5.1	156.5 ±3.2	192.2 ±3.9
бисаболол оксид А	184.8 ±1.9	74.2 ±2.6	102.1 ±3.14	142.3 ±5.9	293.1 ±5.3	220.3 ±6.8	262.2 ±4.6	198.1 ±4.1
7- метоксикумарин	2021.9 ±2.6	751.5 ±5.1	802.6 ±6.98	1824.6 ±10.3	3012.2 ±10.5	2492.7 ±10.2	3839.2 ±10.9	3234.5 ±12.9

Обнаружено, что при ЭСВ 150°C 5 МПа количество извлекаемого хамазулена сопоставимо с ЭЭ 70% 150°C 5 МПа (табл. 7). Это можно объяснить изменением экстракционных характеристик воды при повышенной температуре и давлении за счет изменения плотности, вязкости, диэлектрической проницаемости. Также установлено, что максимальное извлечение хамазулена и бисаболол оксида А происходит при ЭЭ 50% 150°C 5 МПа, а 7-метоксикумарина при ЭЭ 70% 150°C 5 МПа, поэтому для оптимизации процесса экстракции предлагается проводить ее в градиентном режиме. Систематическая погрешность определения концентраций не превышала 0.01.

Таблица 8 – Соотношение компонентов характерного ГХ-МС-хроматографического спектра ЭЭ 50% 150°C 5 МПа

Время удерживания, мин	Индекс удерживания, I_i^T	ЛОС	Относительное содержание ЛОС, $\% \bar{A} \pm \Delta$, n=5, P=0.95
42.27	1661±2	бисаболол оксид Б	1.93±0.09
42.92	1690±2	бисаболол оксид	2.23±0.15
43.79	1709±2	7-метоксикумарин	39.23±0.95
43.88	1721±2	хамазулен	17.79±1.05
44.16	1731±2	бисаболол оксид А	7.90±0.52
46.26	1831±2	ен-ин-дициклоэфир	21.94±1.13
46.433	1833±2	ен-ин-дициклоэфир-изомер	3.31±0.29
50.34	2270±2	2(1H)октагидро-4а-фенилнафталенон	3.05±0.21
52.19	2379±2	матрикарин	2.72±0.19

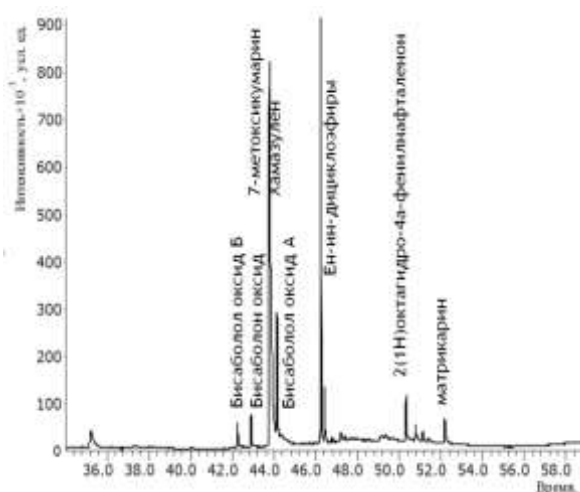


Рисунок 11 – Характерный хроматографический спектр ЭЭ 50% 150°C 5 МПа цветов «ромашки аптечной», полученный методом ГХ-МС.

В соответствии с эффективностью извлечения компонентов для получения общего образа цветов «ромашки аптечной» в виде ГХ-МС-хроматографического спектра жидких экстрактов необходимо использовать ЭЭ 50% 150⁰С 5 МПа (рис. 11). Соотношение доминирующих компонентов приведено в таблице 8.

При ГХ-МС анализе жидких экстрактов цветов «ромашки аптечной» разных производителей, полученных в оптимизированных условиях, установлено, что характерный хроматографический спектр (рис. 11) воспроизводится с ОСКО 0.05. Обработка полученных результатов МГК показала, что данные образуют единую группу, следовательно, хроматографический спектр ЭЭ 50% 150⁰С 5 МПа, полученный методом ГХ-МС, может использоваться в качестве общего образа цветов «ромашки аптечной».

ВЭЖХ анализ полученных экстрактов цветов «ромашки аптечной» показал, что группа пиков в начале хроматограммы до 10 минуты соответствует гликозидным формам флавоноидов (рис.12), группа пиков, содержащая лютеолин и апигенин, содержит агликоновые остатки флавоноидов.

Таблица 9 – Общий выход лютеолина и апигенина, $\bar{X} \pm \Delta$, n=5, P=0.95, мг

Тип экстракта	ЭЭ 70% 150 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 70% 200 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 50% 150 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 50% 200 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 10% 150 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 10% 200 ⁰ С 5МПа	ЭСВ 150 ⁰ С 5МПа	ЭСВ 200 ⁰ С 5МПа	ЭЭ 70% 25 ⁰ С 0.1 МПа	ЭЭ 50% 25 ⁰ С 0.1 МПа	ЭВ 95 ⁰ С 0.1 МПа
Лютеолин	1.82 ±0.91	1.66 ±0.42	2.15 ±0.12	2.01 ±0.14	1.44 ±0.06	2.28 ±0.11	2.03 ±0.09	2.38 ±0.13	0.03 ±0.01	0.02 ±0.005	0.01 ±0.005
Апигенин	0.15 ±0.03	0.35 ±0.02	1.08 ±0.05	0.49 ±0.02	1.37 ±0.06	2.26 ±0.12	0.72 ±0.03	1.06 ±0.05	0.004 ±0.001	0.01 ±0.005	0.01 ±0.005

Количественная оценка полученных экстрактов проводилась по лютеолину ($t_R = 40.7$ мин) и апигенину ($t_R = 44.0$ мин) (табл. 9). Систематическая погрешность определения апигенина составляет 0.01, а лютеолина 0.02. Установлено, что максимальное извлечение лютеолина происходит при экстракции водой при 200⁰С и давлении 5 МПа. В то же время, при определении массы сухого остатка полученных экстрактов установлено, что общее количество нелетучих веществ при ЭСВ 200⁰С 5 МПа превышает общий выход нелетучих веществ при ЭЭ 70% 200⁰С 5 МПа. Эти результаты еще раз свидетельствуют о перспективности использования субкритической воды для экстракции БАС из ЛР. Оптимальное же извлечение лютеолина и апигенина, а также максимальных выход всех нелетучих компонентов наблюдается при экстракции 10% раствором этанола в воде при 200⁰С и давлении 5 МПа, при этом лютеолин извлекается на 95 % от максимального при ЭСВ 200⁰С 5МПа (табл. 9). Данный способ пробоподготовки необходимо использовать для получения общего образа цветов «ромашки аптечной» в виде ВЭЖХ-хроматографического спектра, который имеет вид, представленный на рисунке 12.

При изучении динамики извлечения лютеолина и апигенина установлено, что чем больше этанола содержит экстрагент, тем быстрее происходит извлечение целевых компонентов. При использовании в качестве экстрагента субкритической воды при 200⁰С максимум извлечения лютеолина наблюдается после прохождения 10 см³ экстрагента, для других экстрагентов максимум извлечения соответствует 5 см³ экстракта. При рассмотрении динамики извлечения апигенина, можно отметить, что для ЭСВ 150⁰С 5 МПа и ЭЭ 10% 200⁰С 5 МПа максимум извлечения приходится

на первые 5 см³ экстракта, а для остальных растворителей – на 10 см³ экстракта. Практически полное извлечение апигенина и лютеолина из цветов «ромашки аптечной» происходит после прохождения 20 см³ экстрагента.

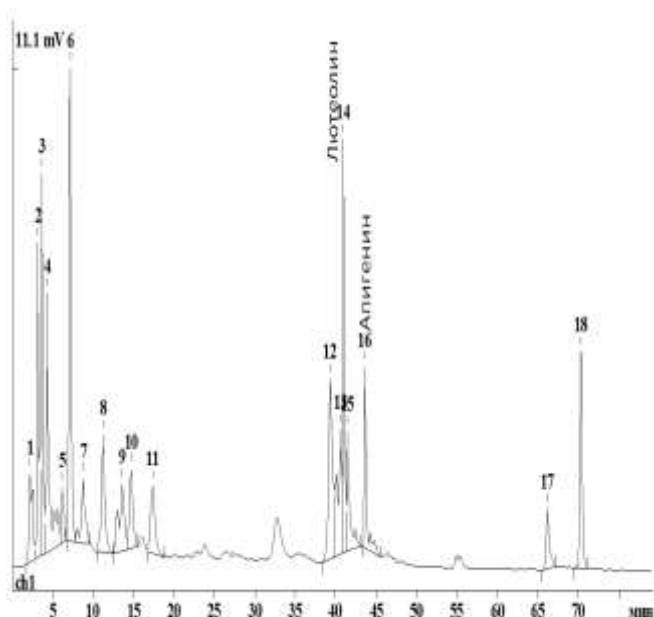


Рисунок 12 – Характерный ВЭЖХ-хроматографический спектр ЭЭ 10% 200°C 5 МПа цветов «ромашки аптечной».

По имеющимся данным оценка лекарственных растений по характерным хроматографическим спектрам является надежным методом видовой идентификации. На основании этого, а также результатов определения основных терпеноидных и ароматических соединений и оценки воспроизводимости хроматографических спектров различных экстрактов «ромашки аптечной» и «эвкалипта прутовидного», был разработан комплексный подход к идентификации ЛР хроматографическими методами (рис. 13), согласно которому, с использованием различных способов пробоподготовки должны быть получены хроматографические спектры летучих и нелетучих органических соединений цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного», а также идентифицированы основные терпеноидные и ароматические соединения изучаемых ЛР. Выше приведены оптимальные условия экстрагирования летучих и нелетучих терпеноидных и ароматических соединений изучаемых ЛР для получения характерных хроматографических спектров.

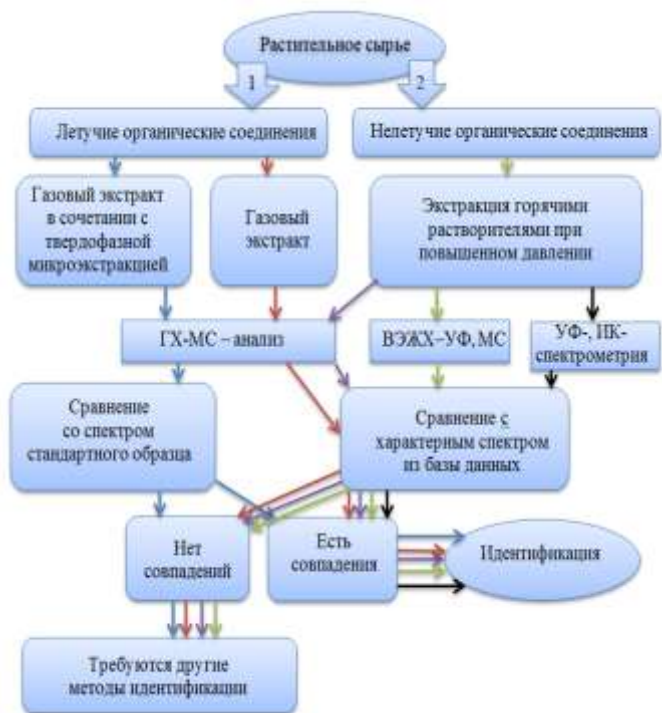


Рисунок 13 – Схема проведения идентификации ЛР по характерным хроматографическим и спектрометрическим профилям.

ВЫВОДЫ:

1. На основании оценки эффективности извлечения компонентов из растительной матрицы установлены оптимальные условия пробоподготовки ЛР для проведения парофазного анализа: масса сухого растительного сырья – 1 г, температура термостатирования пробы – 100°C, время термостатирования – 30 мин.

2. Методом хромато-масс-спектрометрии в газовом экстракте цветов «ромашки аптечной» при прямом ПФА идентифицировано 45 соединений, с применением ТФМЭ – 90 компонентов; в газовом экстракте листьев «эвкалипта прутовидного» при прямом ПФА идентифицировано 76 компонентов, с применением ТФМЭ – 132. Большинство соединений относится к терпеноидам. Установлены терпеноидные и ароматические соединения, определяющие характерный хроматографический спектр исследуемых ЛР.

3. Показано, что характерный хроматографический спектр, полученный при ПФА газового экстракта цветов «ромашки аптечной», является надежной характеристикой партии ЛР, но не может использоваться в качестве общего образа объекта, в то время как в отношении листьев «эвкалипта прутовидного» доказана возможность использования хроматографического спектра ЛОС газового экстракта, в качестве общего образа листьев «эвкалипта прутовидного».

4. Установлено, что сорбционные микротрубки на основе инъекционных игл могут использоваться в качестве образцов состава ЛОС изучаемых ЛР. В качестве сорбентов для концентрирования ЛОС цветов «ромашки аптечной» могут применяться Porapak Q, Carborack B, MN-202, Haye Sep N и Tenax TA, а для ЛОС листьев «эвкалипта прутовидного» – Haye Sep N, MN-202 и Porapak Q. Срок хранения сорбционных микротрубок на основе инъекционных игл с ЛОС составляет на данный момент 12 месяцев.

5. Предложено проводить извлечение терпеноидных и ароматических соединений ЛР водно-этанольными смесями при повышенном давлении и температуре в динамическом режиме. Использование для извлечения субкритической воды при температуре 200°C и давлении 5 МПа оправдано, если целевыми продуктами являются 1,8-цинеол, лютеолин. Установлено, что чем больше этанола содержит экстрагент, тем быстрее происходит извлечение целевых компонентов. Наиболее эффективная экстракция физиологически активных компонентов листьев «эвкалипта прутовидного» осуществляется при ЭЭ 70% 200°C 5 МПа. Максимальное извлечение нелетучих физиологически активных компонентов цветов «ромашки аптечной» наблюдается при экстракции 10% раствором этанола в воде при 200°C и давлении 5 МПа. Оптимальное извлечение летучих физиологически активных компонентов «ромашки аптечной» происходит при ЭЭ 50% 150°C 5 МПа. При сравнении хроматографических спектров, полученных при ГХ-МС анализе ЭЭ 50% 150°C 5 МПа цветов «ромашки аптечной» разных производителей» установлено, что данная характеристика может использоваться в качестве общего образа цветов «ромашки аптечной».

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Газохроматографический анализ ромашки аптечной (*Chamomilla recutita R.*) / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, В.Г. Архипов, В.А. Куркин, Рощупкина И.Ю. // Аналитика и контроль. – 2013. – Т.17, № 1. – С. 66 – 75.

2. Хромато-масс-спектрометрический анализ эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) с использованием различных способов пробоподготовки / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко // Аналитика и контроль. – 2013. – Т.17, № 3. – С. 304 – 313.

3. Извлечение биологически-активных соединений растительного происхождения экстрагентами в субкритическом состоянии / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко, И.Ю. Рощупкина // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2014. – Т.50, №6. – С.633 – 639.

4. Оценка эффективности извлечения летучих органических соединений эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) экстрагентами в субкритическом состоянии / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Н.В. Никитченко, Е.А. Новикова // Сверхкритические флюиды: теория и практика. –2014. – Т.9, №4. – С. 12 – 21.

5. Субкритическая экстракция листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, В.А. Куркин, Н.В. Никитченко, И.И. Демиденко // Новые методы аналитической химии. Первая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием. Сборник тезисов. – СПб.: Соло, 2013. – С.83.

6. Газохроматографический анализ подлинности и качества растительного сырья / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Е.А. Новикова, Н.В. Никитченко // [X Международное Курнаковское совещание по физико-химическому анализу: сборник трудов в 2 томах](#). – Самара: Самар. гос. техн. ун-т. 2013. Т. 2. – С.279 – 283.

7. Извлечение биологически-активных соединений растительного происхождения экстрагентами в субкритическом состоянии / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, И.Ю. Рощупкина // Второй Всероссийский симпозиум с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» Тезисы докладов. 2 – 9 нояб. 2013 г. Краснодарский край, с. Дивноморское, 2013. – С.67.

8. Сочетание парофазного анализа и твердофазной микроэкстракции для определения летучих компонентов лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, Е.А. Новикова // Второй съезд аналитиков России. Тезисы докладов. Москва. 2013. – С.410.

9. Сорбционное микроконцентрирование летучих компонентов лекарственных растений / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, И.С. Долинская, И.Ю. Рощупкина // Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов: сборник материалов XIV Конференции и Третьего Всероссийского симпозиума с международным участием, г. Воронеж, 9-14 окт. 2014 г. – Воронеж: «Научная книга». 2014. – С. 251.

10. Павлова Л.В. Экстракционно-хроматографический анализ лекарственного растительного сырья / Л.В. Павлова, И.А. Платонов, Н.В. Никитченко // Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии». Самара. 2015. – С 68.

11. Хроматографический профиль как идентификационная характеристика лекарственного растительного сырья / И.А. Платонов, Л.В. Павлова, Н.В. Никитченко, А.Ю. Еменева // Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии». Самара. 2015. – С. 72.

Работы № 1-4 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации содержания диссертации.