

УДК 543.544+615:322

## Использование методов хроматографического профилирования для анализа и идентификации низкомолекулярных органических веществ природного и антропогенного происхождения

С. В. МОРОЗОВ, Е. И. ЧЕРНЯК

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: moroz@nioch.nsc.ru

### Аннотация

Предложен подход для определения индивидуального и группового состава низкомолекулярных органических веществ природного и антропогенного происхождения на основе анализа хроматографических профилей (“отпечатков пальцев”, fingerprint) и спектральных характеристик. Приведены данные по использованию подхода для идентификации стойких органических загрязнителей в объектах окружающей среды Сибири и Монголии с целью оценки риска воздействия химических веществ на здоровье населения и состояние экосистем, а также для выявления основных источников загрязнения. Рассмотрены возможности подхода для анализа биологически активных веществ растительного и животного происхождения, разработки низкодозных препаратов для сельского хозяйства из биомассы хвойных Сибири и изучения живых систем. Показано, что хроматографические профили служат высокоинформативными характеристиками, которые могут быть использованы для распознавания “химического образа” сложных систем, идентификации и прогнозирования свойств изучаемых объектов.

**Ключевые слова:** хроматографические профили, спектральные характеристики, хромато-масс-спектрометрия, низкомолекулярные биологически активные вещества, стойкие органические загрязнители, экологическая химия, химия природных соединений, живые системы

### Оглавление

Введение . . . . .	601
Спектрально-аналитические методы в экологических исследованиях . . . . .	602
Применение хроматографических методов для идентификации и индивидуально-группового анализа природных биологически активных соединений . . . . .	606
Использование метода хроматографического профилирования при разработке биологически активных препаратов для сельского хозяйства из возобновляемого сырья Сибири . . . . .	612
Изучение трансформаций и метаболизма химических веществ в живых системах . . . . .	613
Заключение . . . . .	615

### ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных задач различных областей науки – распознавание образа, т. е. идентификация объекта или определение его свойств по каким-либо характеристикам. В разных областях науки существуют свои подходы к выбору диагностических характеристик и методов распознавания. В областях естественных наук, таких как фитохимия,

лесохимия, медицинская химия, экология, химия окружающей среды, биология, биохимия, биотехнология, микробиология, медицина, геохимия, нефтехимия, археология и др., одной из основных диагностических и информативных характеристик изучаемого объекта служит его хроматографический профиль (“отпечатки пальцев”, fingerprint). В настоящее время хроматографическое профилирование (метаболомика) наиболее эффективно

используется в молекулярной биологии при исследовании процессов, протекающих в живых системах, и разработке методов диагностики и лечения различных заболеваний.

Получение и анализ данных по индивидуально-групповому составу низкомолекулярных органических веществ природного и антропогенного происхождения является неотъемлемой частью современных фундаментальных и проблемно-ориентированных исследований.

Все объекты живой природы в процессе своей жизнедеятельности продуцируют огромное количество органических веществ. Информация об их индивидуально-групповом составе может быть использована для исследования молекулярных механизмов морфогенеза растений, установления хемотаксономических признаков растений, поиска перспективных биологически активных соединений, установления биомаркеров и сигнальных веществ, при создании новых медицинских, биорациональных и функциональных продуктов и препаратов, для прогнозирования их биологических, физиологических и потребительских свойств.

Определение состава и профилей органических соединений, особенно стойких органических загрязнителей (СОЗ), в объектах окружающей среды является основой экогеохимических и эколого-гигиенических исследований экосистем различных уровней. Полученные данные могут быть использованы для выявления основных антропогенных источников загрязнения и оценки их относительного вклада в общий уровень загрязнения, для оценки трансграничных переносов загрязняющих веществ, для моделирования и прогнозирования уровней загрязнения и поведения загрязняющих веществ, для оценки воздействия химических факторов риска на здоровье населения и при разработке эффективных технологий защиты окружающей среды.

Для анализа состава сложных смесей и идентификации их компонентов широко используются хроматографические системы с чувствительными, селективными и специфическими детекторами, такими, например, как масс-спектрометрический или диодно-матричный детектор в видимой и УФ-областях спектра.

Одним из наиболее информативных подходов к изучению индивидуально-группового состава низкомолекулярных органических

веществ природного и антропогенного происхождения считается получение и анализ их хроматографических профилей [1–4]. Хроматографический профиль любого объекта служит его индивидуальной характеристикой и поэтому может использоваться в качестве идентификационного или диагностического показателя при определении его подлинности, происхождения, при разработке методик определения качества, идентификации и стандартизации продуктов и препаратов на его основе и прогнозирования их свойств [4–8].

#### **СПЕКТРАЛЬНО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Анализ объектов окружающей среды играет ключевую роль при проведении экологических исследований, экспертиз, оценки состояния экосистем, здоровья и качества жизни населения, уровней воздействия химических факторов риска на население и экосистемы, расследований экологических аварий и катастроф [9–11].

В основе любого заключения об экологическом состоянии экосистем должна лежать достоверная информация о содержании в объектах окружающей среды приоритетных и стойких органических загрязнителей (полихлорированных диоксинов и фуранов, бифенилов, пестицидов, полиароматических углеводородов). В настоящее время данные загрязнители представляют глобальную экологическую угрозу вследствие токсичности, персистентности, повсеместного распространения, загрязнения пищевых продуктов и продуктов природного происхождения.

Идентификация соединений антропогенного и природного происхождения в различных объектах окружающей среды основана на анализе высокоинформативных хроматографических профилей сложных смесей с применением методик хроматографирования в режимах полного ионного тока (обзорный анализ), селективного детектирования индивидуальных ионов (целевой анализ), “ионной экстракции”, с использованием баз данных полных масс-спектров, данных по временам удерживания и соотношениям характеристичных ионов.

В 1994 г. под руководством академика В. А. Коптюга был создан автоматизирован-

ный информационно-аналитический комплекс, в который вошли Испытательный аналитический центр, аккредитованный в системе Ростехрегулирования на техническую компетентность и независимость и обладающий современным аналитическим оборудованием, а также информационный центр, включающий многопрофильную специализированную библиотеку и базы данных по химическим аспектам охраны окружающей среды, экологии, химии природных соединений и возобновляемого сырья. На основе данного комплекса создана информационно-аналитическая технология, которая позволяет: 1) проводить комплексные аналитические исследования по определению низкомолекулярных органических веществ антропогенного, синтетического и природного происхождения в различных объектах; 2) осуществлять оценку риска воздействия химических веществ на экосистемы и здоровье населения с учетом их физико-химических, токсикологических свойств и биологической активности; 3) прогнозировать свойства природных соединений; 4) изучать состояние живых систем; 5) разрабатывать научные основы создания новых веществ и материалов для медицины, сельского хозяйства и других отраслей промышленности [12].

В рамках реализации программы “Оценка масштабов и степени загрязнения территории

Сибири диоксинами и их аналогами” на основе разработанного комплексного подхода целевого и обзорного экологического анализа объектов окружающей среды и территорий для различных регионов Сибири (Новосибирская, Томская, Кемеровская области, Алтайский и Красноярский край, Республика Бурятия, озеро Байкал, нефтегазоносные провинции Ханты-Мансийского АО), Монголии и Казахстана определены следующие показатели [13–17]:

1) уровни содержания полихлорированных диоксинов и фуранов (ПХДД/ПХДФ) в различных объектах окружающей среды (табл. 1, рис. 1);

2) качественные и количественные характеристики уровней содержания основных органических загрязняющих веществ;

3) характерные загрязняющие вещества, определяющие состояние экосистем и оказывающие влияние на здоровье человека, которые можно рассматривать как интегральные индикаторы;

4) характерные соотношения индивидуальных составляющих хлорорганических пестицидов (ХОП), полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), полихлорированных диоксинов и фуранов, полихлорированных бифенилов (ПХБ), нефтяных углеводородов (НУ) и фенолов (Ф), позволяющих оценивать техногенный и природный вклад

ТАБЛИЦА 1

Содержание полихлорированных диоксинов и фуранов (ПХДД/ПХДФ) в различных объектах окружающей среды Сибирского региона

Объекты окружающей среды	Содержание ПХДД/ПХДФ (ДЭ)
Питьевые воды	<0.1 пг/л
Природные поверхностные воды	1–10 пг/л
Сточные воды	5–25 пг/л
Почвы промышленных районов	0.2–90 нг/кг
Почвы урбанизированных районов	0.2–6.0 нг/кг
Почвы “фоновых” сельскохозяйственных районов	0–0.08 нг/кг
Почвы свалок промышленных бытовых отходов	0.1–110 нг/кг
Почвы полигонов захоронения и уничтожения химических отходов	0.03–4.0 мкг/кг
Почвы снегоотвалов	0.07–1.6 нг/кг
Снежный покров снегоотвалов	3.4–6.6 пг/л
Снежный покров под факелами предприятий	2–11 пг/л
Донные осадки рек и озер	0.003–4.0 нг/кг
Отходы (золы, шламы) предприятий	3–200 нг/кг
Атмосферный воздух и газовые выбросы предприятий	0.3–300 пг/м <sup>3</sup>

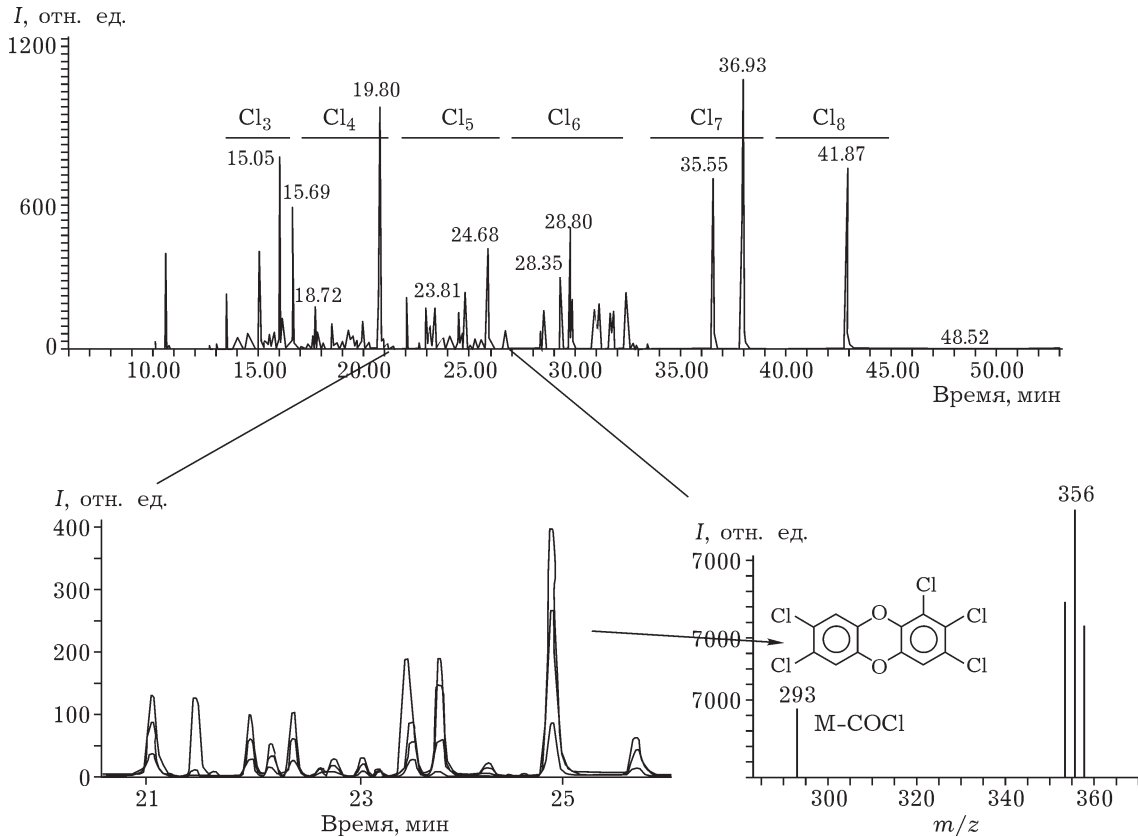


Рис. 1. Хромато-масс-спектрометрический профиль в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов полихлорированных диоксинов (ПХДД), содержащих от 3 до 8 атомов хлора, в почве полигона сжигания отходов в Алтайском крае (содержание ПХДД в диоксиновом эквиваленте 3.8 мкг/кг).

в общий уровень загрязнения, ранжировать регионы по антропогенной нагрузке и выявлять источники загрязнения;

5) типы ассоциаций индивидуальных углеводородов, характеризующие определенный район, тип и мощность антропогенного воздействия, что позволяет идентифицировать источник загрязнения.

С использованием комплекса хроматографических методов по результатам многолетних экспериментальных исследований совместно с Байкальским институтом природопользования (БИП) СО РАН впервые установлен детальный состав и профили стойких органических загрязнителей в различных объектах экосистемы оз. Байкал и определены следующие показатели: 1) характерные загрязняющие вещества для южной, центральной и северной частей озера (рис. 2); 2) коэффициенты биоаккумуляции хлорорганических и полиароматических соединений; 3) распределение легких и тяжелых ПАУ; 4) распре-

ление изомеров полихлорированных бифенилов в воде, донных осадках и жире нерпы; 5) характерные профили алифатических углеводородов (рис. 3), определяющих уровни антропогенного и природного загрязнения [13]. Полученные данные стали основой для оценки и прогнозирования экологического состояния Байкальской природной территории и разработки методов оптимального мониторинга крупных озерных систем.

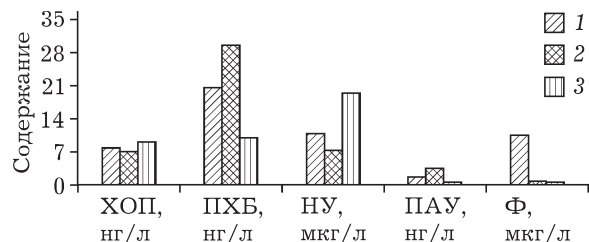


Рис. 2. Содержание органических загрязняющих веществ в южной (1), центральной (2) и северной (3) частях оз. Байкал. ХОП – хлорорганические пестициды, ПХБ – полихлорированные бифенилы, НУ – нефтяные углеводороды, ПАУ – полициклические ароматические углеводороды, Ф – фенолы.

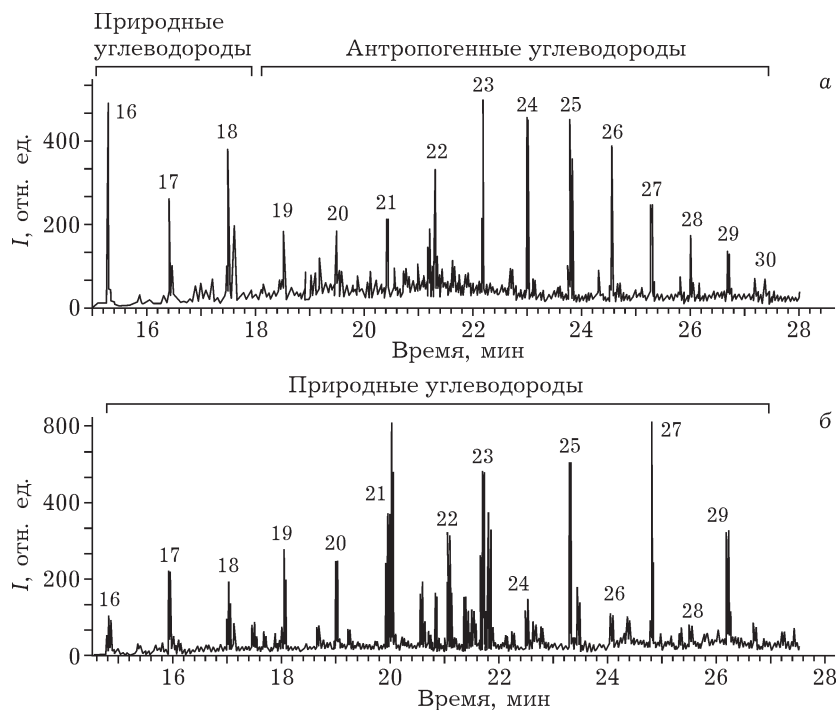


Рис. 3. Хромато-масс-спектрометрические профили алифатических углеводородов по иону с  $m/z$  85 двух образцов донных осадков оз. Байкал (цифры над пиками соответствуют количеству атомов углерода  $n$ -алканов): а – углеводороды природного и антропогенного происхождения (19 мг/кг); б – углеводороды природного происхождения (22 мг/кг).

Совместно с Институтом вычислительной математики и математической геофизики СО РАН и Институтом неорганической химии СО РАН проведено обследование снежного покрова на территориях Приобского месторождения нефти, Новосибирска, Искитима, Берд-ска, Томска, Северска, Кемерово, Новокузнецка, Барнаула, Заринска, Бийска, Белоярска и их окрестностей на содержание органических веществ антропогенного происхождения. Полученные методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) данные по профилям и содержанию полициклических ароматических углеводородов и нефтяных углеводородов использованы для разработки и опробования моделей комплексного мониторинга аэрозольного загрязнения местности в районах факельного сжигания попутного газа при добыче нефти, выбросов ТЭЦ и автотранспорта на основе данных контактных и дистанционных наблюдений, а также для выявления характерных соотношений ПАУ, позволяющих адекватно устанавливать источники загрязнения [18–20].

Путем постановки обратных задач переноса примесей в атмосфере и на основании полу-

ченных результатов экспериментальных исследований выполнена реконструкция полей аэрозольных выпадений, определены суммарные выбросы ПАУ антропогенными источниками. Использование ПАУ в моделях реконструкции в качестве трассеров (маркеров) повышает надежность определения восстанавливаемых характеристик полей загрязнения снежного покрова тяжелыми металлами и другими компонентами.

Выявленные закономерности позволяют оценить степень антропогенной нагрузки как в самих городах, так и на окружающих их территориях, сравнить интенсивность поступления загрязнителей от городских территорий, провести интегральные оценки заболеваемости населения на этих территориях с учетом степени антропогенной нагрузки, а также оценить дополнительные риски здоровью жителей населенных пунктов, попадающих в зоны значительного влияния выбросов городов.

Совместно с сотрудниками ИХХТ СО РАН (Красноярск) проведен комплекс работ по изучению качественного и количественного состава канцерогенных ПАУ, выделяющихся в раз-

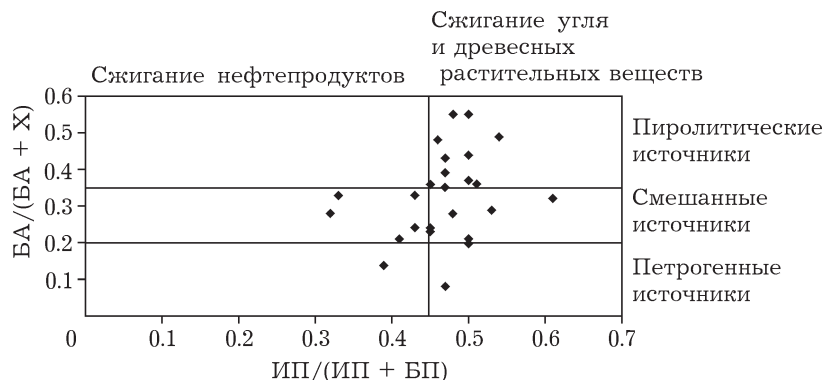


Рис. 4. Зависимость соотношений диагностических ПАУ в донных осадках бассейна р. Селенги на территории Монголии и Бурятии для определения источников загрязнения. БА – бенз(а)антрацен, Х – хризен, ИП – индено(1,2,3-сd)пирен, БП – бенз(ghi)перилен.

личных процессах производства алюминия по технологии Содерберга. На основе детального анализа хроматографических профилей ПАУ и их производных, выделяющихся на различных стадиях процесса производства алюминия, установлены основные источники выброса канцерогенных ПАУ экологически опасной технологии и предложены пути снижения канцерогенного риска на Красноярском алюминиевом заводе. Методом ГХ/МС изучен состав полициклических ароматических углеводородов в угольных пеках и полученных из них углеродных материалах для установления механизмов термохимических процессов [21–24].

В рамках российско-корейско-монгольской экспедиции совместно с сотрудниками БИП СО РАН, Института геоэкологии АН МНР, Университета Мионгджи, Института водных ресурсов и охраны окружающей среды Корейской водной корпорации и Корейского института окружающей среды по проекту “Интегрированная модель управления водными ресурсами в бассейне р. Селенги”, программы UNEP впервые проведено детальное обследование поверхностных вод и донных осадков бассейна р. Селенги на территории Монголии и Бурятии [25, 26]. Целью исследования было выявление уровней, источников и ареалов техногенного загрязнения водосборного бассейна оз. Байкал стойкими органическими загрязнителями.

Анализ полученных хроматографических профилей характерных загрязняющих веществ позволил установить основные источники загрязнения бассейна р. Селенги – сжигание угля

и автотранспорт (рис. 4). Сделано предположение, что дельта р. Селенги служит своеобразным геохимическим барьером-фильтром, который препятствует проникновению в оз. Байкал органических загрязнителей.

Результаты исследований показали высокую эффективность использования данных по качественному и количественному составу ХОП, ПАУ, алифатических углеводородов и фенолов в объектах окружающей среды, для региональных экогеохимических и эколого-гигиенических оценок состояния природной среды и эффективного выявления зон усиления и ослабления антропогенного воздействия на природную среду.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИНДИВИДУАЛЬНО-ГРУППОВОГО АНАЛИЗА ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Комплексы природных биологически активных соединений, проявляя различные виды биологической активности (антиоксидантную, иммуномодулирующую, антибактериальную, противовирусную, антикоагулянтную, противогрибковую, антиаллергическую и др.), широко используются в медицине, косметологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве [27–33]. Природные композиции, как правило, представляют собой многокомпонентные смеси биологически активных соединений, поэтому получение данных об их качественном и количественном составе является актуальной задачей в сфере как фундаментальных,

так и прикладных исследований. К приоритетным направлениям фундаментальных исследований относятся следующие: развитие методологии спектрально-хроматографического анализа сложных смесей природных органических соединений; фитохимическое исследование объектов растительного сырья, изучение их метаболических профилей, выявление хемотаксономических и диагностических признаков; разработка подходов к прогнозированию физиологических свойств природных композиций на основе знаний о составе; разработка научных основ создания новых биологически активных препаратов из возобновляемого сырья для медицины, сельского хозяйства и др. В сфере прикладных задач актуальное значение имеет выявление перспективных источников биологически активных соединений, стандартизация природного сырья, идентификация индикаторных компонентов биологически активных продуктов и препаратов для контроля качества, определение подлинности и фальсификации препаратов и продуктов на основе природного сырья.

В настоящее время стремительно растет количество природных биоактивных соединений, принадлежащих к группам флавоноидов, стеролов, каротиноидов, алкалоидов, витаминов, жирных кислот и др., которые используются при создании новых средств, продуктов и препаратов. В связи с тем, что даже в повседневной жизни все чаще используются такие термины, как фитохимические нутриенты, биоактивные добавки, функционализированные и экологически чис-

тые продукты, особое значение сегодня уделяется природным биологически активным веществам, которые используются при их разработке и создании.

Использование методов газовой (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными видами детектирования (диодно-матричный, масс-селективный) в сочетании с соответствующими базами масс-спектрометрических данных и спектрально-хроматографическими коллекциями позволяет в большинстве случаев получать информацию об индивидуально-групповом составе многокомпонентных природных смесей без выделения индивидуальных соединений и использования большого набора стандартных веществ. В основе методологии индивидуально-группового анализа объектов природного происхождения лежит создание электронных коллекций стандартизованных хроматографических профилей образцов природного происхождения и спектрально-аналитических характеристик важнейших групп биологически активных соединений, полученных с помощью современных методов газовой и жидкостной хроматографии.

Для определения индивидуального и группового состава низкомолекулярных органических веществ природного происхождения предложен подход на основе анализа хроматографических профилей, полученных в стандартизованных условиях, и спектральных характеристик основных компонентов (времена удерживания, УФ- и масс-спектры, УФ-спектральные отношения) [34].

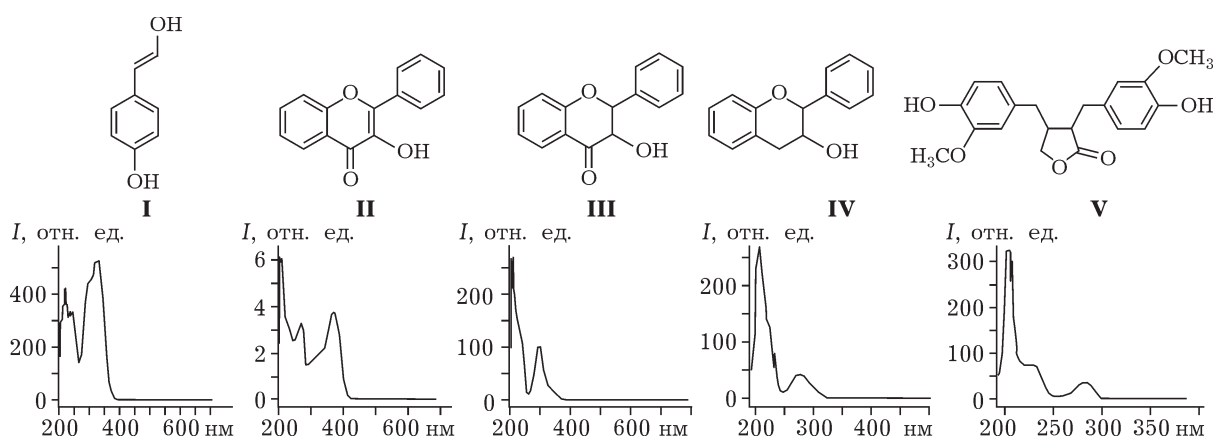


Рис. 5. Основные типы природных фенилпропаноидов I–V и их УФ-спектры.

Один из наиболее распространенных и многочисленных классов вторичных растительных метаболитов – фенольные соединения. Большая группа природных фенольных соединений – фенилпропаноиды **I–V**, содержащие в структуре один или несколько фрагментов  $C_6-C_3$  (гидроксикоричные кислоты, антоцианы, флавоноиды и их производные – лигнаны, флаволигнаны). Эти соединения в последнее время стали предметом пристального внимания исследователей при поиске перспективных биологически активных соединений и создании на их основе биологически активных препаратов [29].

УФ-спектры фенольных соединений (рис. 5), как правило, имеют нескольких полос поглощения, поэтому детектирование при ВЭЖХ-анализе проводится по наиболее характерным для этих соединений значениям длин волн (280 нм – катехины, флаванолы, лигнаны, флаволигнаны, 320 нм – гидроксикоричные кислоты, кумарины, 360 нм – флаванолы, 520 нм – антоцианы).

Для всех основных структурных типов фенилпропаноидов нами получены и исследованы хроматографические профили в стандартизованных условиях, типичные УФ- и масс-спектральные характеристики [34].

Простейшая группа фенилпропаноидов – гидроксикоричные кислоты – содержится в разных сочетаниях в свободном виде или в виде гликозидов практически во всех высших растениях. Хроматографический профиль и спектральные характеристики гидроксикоричных кислот получены нами при анализе экстрактов, выделенных из лиственницы *Larix Sibirica*.

К основным флавоноидам типа **II**, выделяемым из ряда растений, относятся такие известные соединения, как кверцетин, кемпферол, изорамнетин, мирицетин, апигенин. Методом ВЭЖХ нами получен хроматографический профиль флавоноидов типа **II** лекарственного растения боровая матка *Orthilia secunda*. Для получения хроматографического профиля и УФ-спектральных характеристик флавоноидов типа **III** нами проанализирован этилацетатный экстракт из древесины лиственницы. Основные пики на хроматограмме соответствуют дигидрокверцетину и дигидроккемпферолу.

Хроматографический профиль катехинов, принадлежащих к группе флавоноидов типа **IV**, получен при использовании образца экстракта зеленого чая *Camellia sinensis*. Пики на хроматограмме имеют характерные для катехинов УФ-спектры. Основные компоненты экстракта – эпигаллокатехин галлат, галлокатехин галлат и эпикатехин галлат. Для катехинов зеленого чая проведена оценка интервала значений характерных спектральных отношений.

Важную группу природных фенольных соединений составляют лигнаны – соединения, в структуру которых входят два фенилпропановых фрагмента с общей формулой  $(C_6-C_3)_2$ , в большинстве случаев связанных между собой  $\beta, \beta'$ -углеродными атомами боковых цепей. Лигнаны широко распространены в растительном мире и существуют как в свободном виде, так и в виде гликозидов. Они обладают широким спектром биологического действия, специфичны для определенных групп растений и могут быть использованы в качестве хемотаксономического признака. Для получения хроматографических профилей лигнанов  $(C_6-C_3)_2$  с гваяцильным типом замещения арильного фрагмента проанализированы различные полярные экстракты хвойных пород деревьев и идентифицированы их основные компоненты.

Основные фенольные соединения семян лимонника китайского *Schisandra chinensis* – лигнаны другого структурного типа, относятся к производным дибензо-[а,с]-циклооктадиена. С помощью методов ГХ/МС и ВЭЖХ получены профили лигнанов лимонника, определены их основные УФ-спектральные характеристики.

Флаволигнаны – это флавоноиды, имеющие в своем составе дополнительный фенилпропаноидный фрагмент. В качестве примера суммы природных флаволигнанов использован экстракт семян расторопши пятнистой *Silybum marianum*. При изучении экстракта расторопши пятнистой методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного и масс-селективного детекторов получен его хроматографический профиль и УФ-спектральные характеристики компонентов экстракта. Идентифицированы изосилихристин, силихристин, силидианин, силибин А, силибин В, изосилибины (ср. [35]),



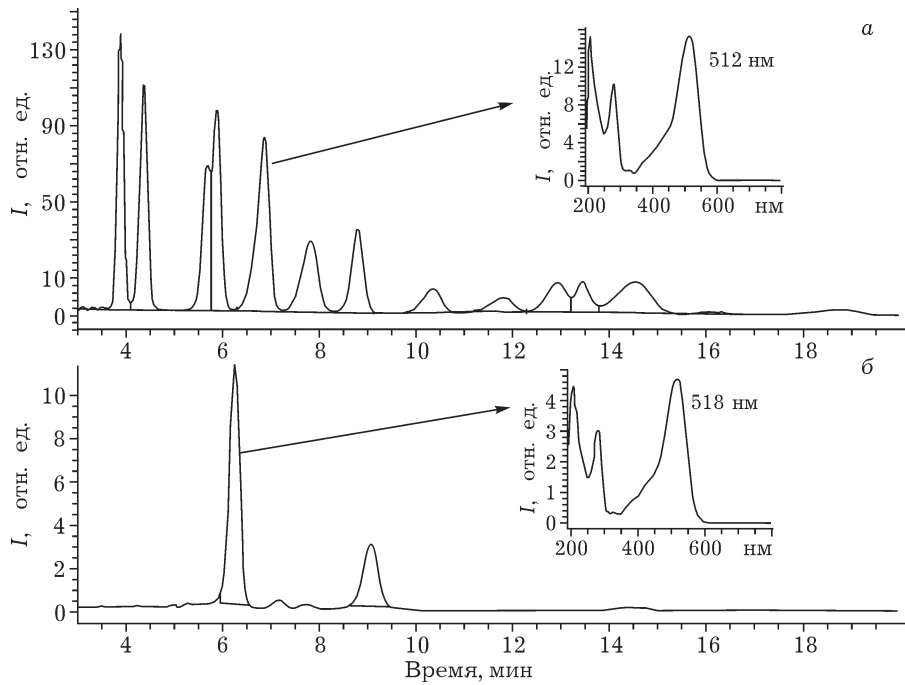


Рис. 6. Хроматографические профили антоцианов черники (а) и рябины черноплодной (б).

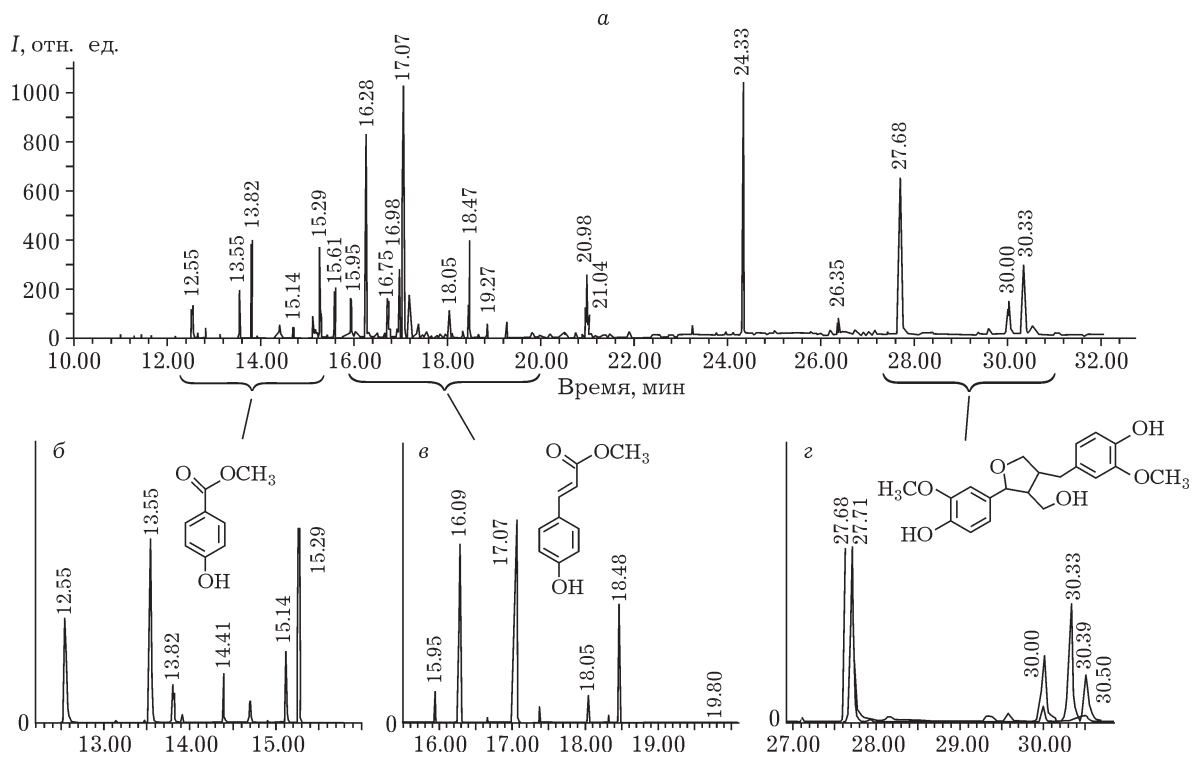


Рис. 7. Хромато-масс-спектрометрические профили фенольного комплекса (а), гидроксibenзойных кислот (б), гидроксикочных кислот (в), лигнанов (г) пихты сибирской.

для которых рассчитаны интервалы характерных спектральных соотношений.

Высокую биологическую активность демонстрируют антоцианы – группа природных фенольных соединений, интенсивное изучение которых проводится во всем мире. Характерное поглощение для антоцианов наблюдается при  $\lambda = (520 \pm 10)$  нм, где отсутствует заметное поглощение для большинства природных соединений, в связи с чем эта длина волны используется в качестве аналитической при анализе антоцианов методом ВЭЖХ.

Нами получены хроматографические профили и УФ-спектральные характеристики антоцианов жимолости синей *Lonicera caerulea*, смородины *Ribes nigrum*, черники *Vaccinium myrtellus*, рябины черноплодной *Aronia melanocarpa*, калины *Viburnum*, голубики *Vaccinium uliginosum*, ежевики сизой *Rubus caesius* в условиях изократического элюирования. Показано, что УФ-спектры на основных пиках практически одинаковы и соответствуют антоцианам (характерный пик при ~520 нм), хроматографические профили существенно отличаются друг от друга и характерны для каждого растения (рис. 6).

Полученные спектрально-хроматографические характеристики основных фенолпропаноидов использованы нами в качестве диагностических и идентификационных параметров при фитохимических исследованиях [34].

Возможности использования разработанного подхода по изучению индивидуально-группового состава различных объектов показаны на примере собственных исследований и работ, проводимых совместно с лабораториями института, научными и учебными организациями Сибирского региона [13].

С помощью методик “ионной экстракции” по молекулярным и характеристичным фрагментарным ионам и данных по диагностическим УФ-спектральным отношениям получены хроматографические профили основных групп фенольных соединений древесной зелени пихты сибирской *Abies Sibirica*: гидроксibenзойных и гидроксикоричных кислот, флавоноидов, лигнанов. Идентифицированы кверцетин, кемпферол и изорамнетин (флавоноиды); 3,4-диванилилтетрагидрофуран, ларицирезинол, изоларицирезинол, матаирезинол, пинорезинол, гидроксиматаирезинол (лигнаны); 4-гидрокси-, 4-метокси-, 4-гидрокси-3-метокси-, 3,4-диметокси-, 3,4,5-триметоксикоричные кислоты; 4-гидрокси-, 4-метокси-, 4-гидрокси-3-метокси- и 3,4,5-триметоксibenзойные кислоты (рис. 7).

В результате исследований, проведенных совместно с ЦСБС СО РАН, впервые установлен индивидуально-групповой состав фенолпропаноидного комплекса плодов жимолости синей различного эколого-географического происхождения, интродуцированных

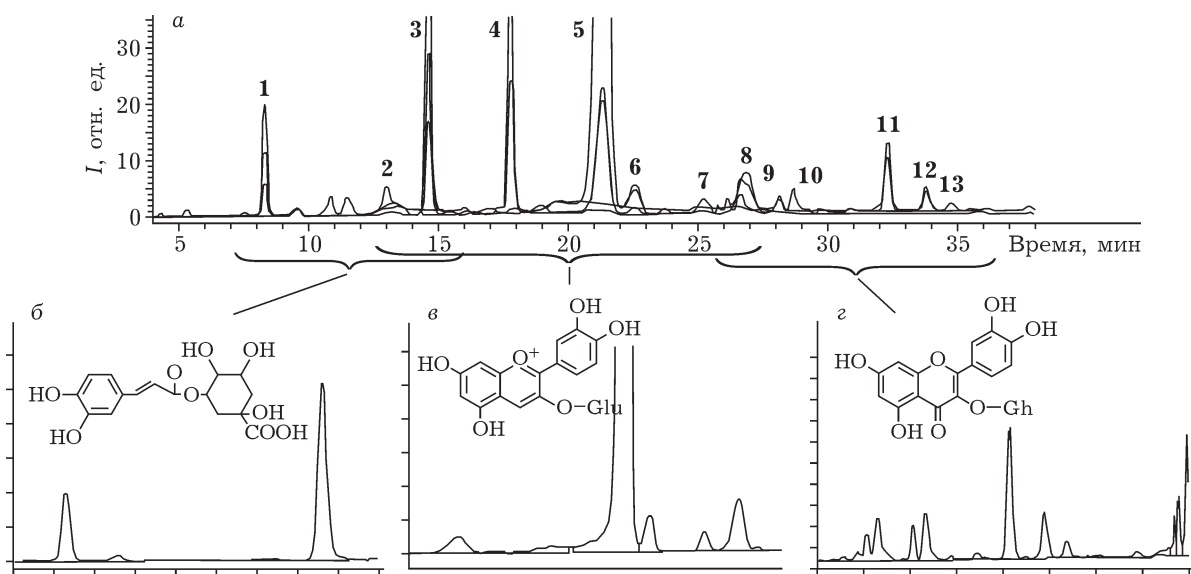


Рис. 8. Хроматографические профили фенолпропаноидного комплекса (а), гидроксикоричных кислот (б,  $\lambda = 320$  нм), антоцианов (в,  $\lambda = 520$  нм) и флавонолов и флавонов (г,  $\lambda = 360$  нм) экстракта плодов жимолости синей.

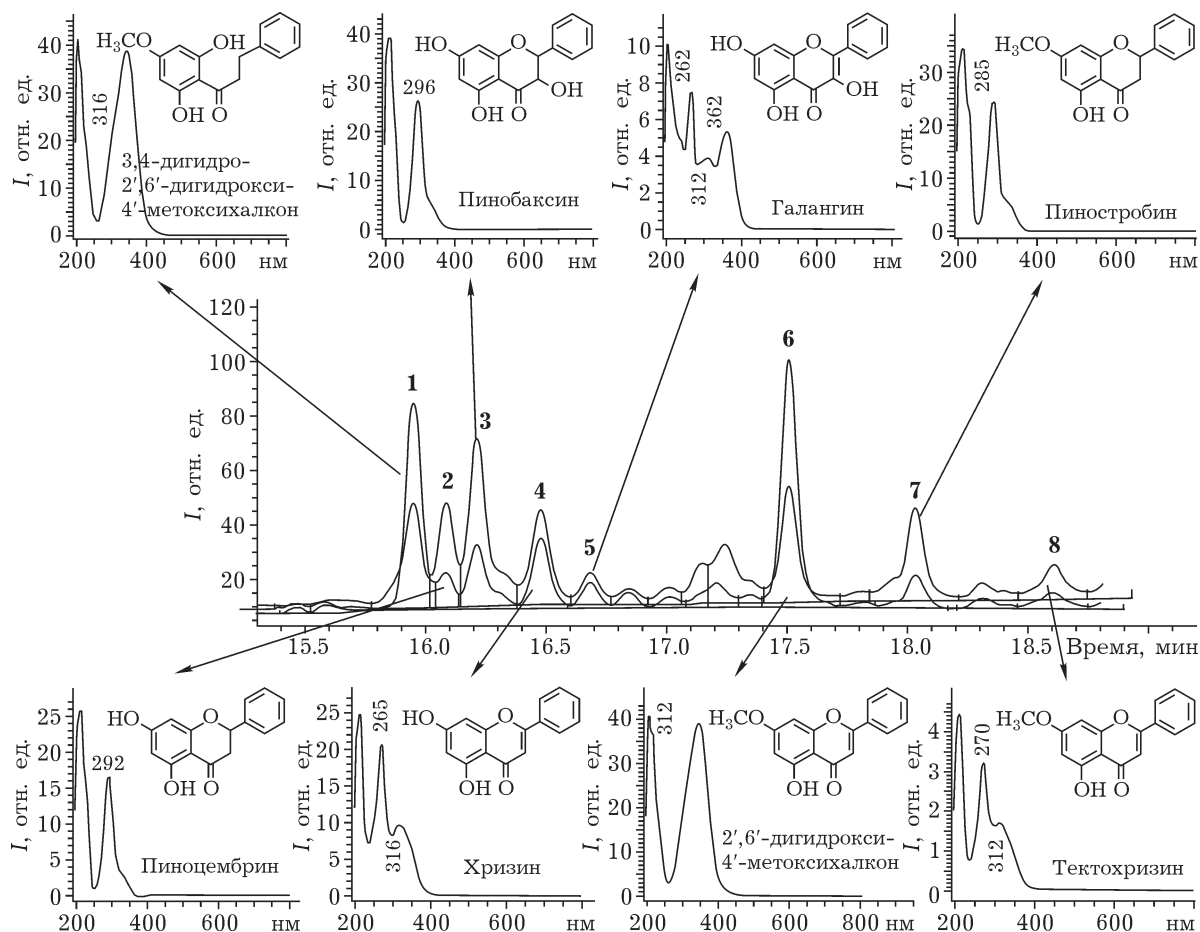


Рис. 9. Хроматографический профиль (ВЭЖХ) флавоноидов спиртового экстракта почек тополя бальзамического ( $\lambda = 290, 326 \text{ нм}$ ) и УФ-спектры основных пиков.

в ЦСБС СО РАН. Показано, что его основными компонентами являются антоцианы, флавонолы и флавоны, гидроксикоричные кислоты (рис. 8). В группе антоцианов идентифицированы следующие соединения: цианидин-3,5-диглюкозид, цианид-3-глюкозид, цианидин-3-рутинозид, пеларгонидин-3-глюкозид, пеонидин-3-глюкозид; в группе флаванолов и флавонов – рутин, кверцетин-3-глюкозид, лютеолин-3-глюкозид и лютеолин-3-рутинозид, диосмин и различные гликозиды кверцетина; в группе гидроксикоричных кислот – хлорогеновая, неохлорогеновая и дикофеoilхинная кислоты.

Анализ изменчивости содержания суммы флавонов и флавонолов, антоцианов и гидроксикоричных кислот по группам и отдельным компонентам в зависимости от генетического происхождения представителей *Lonicera caerulea* L. показал, что изученные подвиды *L. caerulea* различаются по количественному

содержанию фенольных соединений, а компонентный состав остается постоянным. Установлено, что при скрещивании географически удаленных по месту происхождения образцов жимолости у гибридов первого поколения отмечается значительное увеличение содержания комплекса биофлавоноидов в плодах [36].

Совместно с сотрудниками кафедры химической технологии древесины и биотехнологии СГТУ Красноярска методом ВЭЖХ проведено исследование индивидуально-группового состава фенольных соединений спиртового экстракта почек тополя бальзамического *Populus balsamifera* (рис. 9). Показано, что основными флавоноидами экстракта являются пинобаксин, пиностробин, пиноцебрин, хризин, галангин, 3,4-дигидро-2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон, 2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон, также идентифицированы гидроксикоричные кислоты [37].

Методами ВЭЖХ и ГХ/МС получены хроматографические профили жирных и смоляных кислот, стеринов, токоферолов, ди- и тритерпеноидов, липидных фракций продуктов растительного и животного происхождения. Следует отметить, что использование современных хроматографических методов позволяет надежно идентифицировать минорные компоненты растительных масел и животных жиров (токоферолы, каротиноиды, стерины, сквален), качественный и количественный состав которых индивидуален для масложировых продуктов и определяет их биологические свойства. Результаты исследований профилей жирных кислот, каротиноидов, токоферолов и фитостеринов позволяют прогнозировать основные свойства масложировых продуктов, в частности биологические свойства, стойкость к окислению, и разрабатывать критерии их идентификации [13].

Таким образом, в результате проведения фитохимических исследований разработан подход для определения группового и индивидуального состава многокомпонентных смесей природных биологически активных соединений на основе анализа хроматографических профилей, времен удерживания и спектральных характеристик (спектральных отношений, УФ- и масс-спектров). Для большой группы природных биологически активных соединений, принадлежащих к группам флавоноидов, антоцианов, лигнанов, гидроксикоричных кислот, катехинов, стеринов, флаволигнанов, капсаициноидов, жирных кислот, терпеноидов, моносахаридов, витаминов современными методами ГХ/МС и ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-селективным детектированием в стандартизованных условиях получены следующие идентификационные параметры: хроматографические профили (“отпечатки пальцев”), времена удерживания, УФ- и масс-спектры, характерные спектральные отношения. Показано, что для гидроксикоричных кислот характерны спектральные отношения  $A(320/280)$ ,  $A(320/220)$  и  $A(220/280)$ , для флавоноидов –  $A(254/220)$ ,  $A(280/254)$ ,  $A(280/220)$ ,  $A(360/254)$  и  $A(360/220)$ , для лигнанов и флаволигнанов –  $A(254/220)$ ,  $A(280/254)$  и  $A(280/220)$ , для антоцианов –  $A(520/280)$  и  $A(280/254)$ .

Разработанный подход может быть эффективно использован для исследований в об-

ласти фитохимии, развития методологии спектрально-хроматографического анализа многокомпонентных композиций низкомолекулярных органических веществ природного происхождения, разработки научных основ создания новых биологически активных препаратов из возобновляемого сырья для медицины, сельского хозяйства, пищевой и косметической промышленности.

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО СЫРЬЯ СИБИРИ**

Создание современных физиологически активных препаратов для медицины и сельского хозяйства на основе возобновляемого растительного сырья – одно из приоритетных направлений химии природных соединений. Хвойные растения Сибири выступают в качестве продуцентов биологически активных веществ широкого спектра действия. Разработка новых химических средств защиты растений на основе современных биологически активных веществ природного происхождения – “биорациональных пестицидов” – и создание на их основе биологических технологий защиты растений относится к одной из актуальных задач фундаментальных и прикладных исследований [38].

Методами газовой и жидкостной хроматографии получены хроматографические профили липидных, фенольных и углеводных биологически активных комплексов, выделенных путем последовательной экстракции растворителями возрастающей полярности из биомассы древесной зелени пихты и древесины лиственницы. Изучен их индивидуально-групповой состав и идентифицированы основные компоненты.

Исследован состав фенольного комплекса древесины лиственницы, полученного с использованием ультразвукового и микроволнового воздействия. Методами ВЭЖХ и ГХ/МС показано, что основные группы фенольных соединений представлены флавоноидами (дигидрокверцетином, дигидрокемпферолом, кверцетином), лигнанами (ларицирезинолом, секоизоларицирезинолом, матаирезинолом, пинорезинолом, конидендрином, 3,4-диваниллиттетрагидрофураном), гидроксикоричными

кислотами (*n*-кумаровой, кофейной, феруловой, 3,4-диметоксикоричной) и полимерными фенольными соединениями.

Определены основные компоненты фенольного комплекса, выделенного из древесной зелени пихты – отхода препарата “Новосил”: гликозиды гидроксикоричных и *n*-гидроксibenзойной кислот, флавоноидов и лигнанов. На основе этого комплекса разработан низкодозный препарат “Абистим” [39]. Из древесины лиственницы с использованием CO<sub>2</sub>-экстракции получен биологически активный липидно-фенольный комплекс, на основе которого создан препарат “Биофунгистим” [40] и идентифицированы его основные компоненты: жирные и дитерпеновые кислоты, терпеновые углеводороды, спирты, альдегиды, сквален и стерины (кампестерин, ситостерин, стигмастерин), фенолокислоты, ацетофеноны, фенолы, лигнаны (матаирезинол, конидендрин, секоизоларицирезинол, пинорезинол, ларицирезинол).

Для всех выделенных композиций проведены многолетние полевые и лабораторные испытания на физиологическую активность на широком круге зерновых, зернобобовых, луковичных и овощных культур разных сортов. Новые низкодозные препараты для растениеводства, такие как “Биофунгистим” из древесины лиственницы, “Абистим” и “Пихторос” [41] из древесной зелени пихты сибирской, обладают ростостимулирующими, фунгицидными и антистрессовыми свойствами (биологическая эффективность – от 40 до 100 %), позволяют бороться с грибными, бактериальными и вирусными болезнями, способствуют повышению урожайности и качества овощных и зерновых культур.

#### ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСФОРМАЦИЙ И МЕТАБОЛИЗМА ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Кинуренин и его производные, будучи метаболитами ферментативных превращений

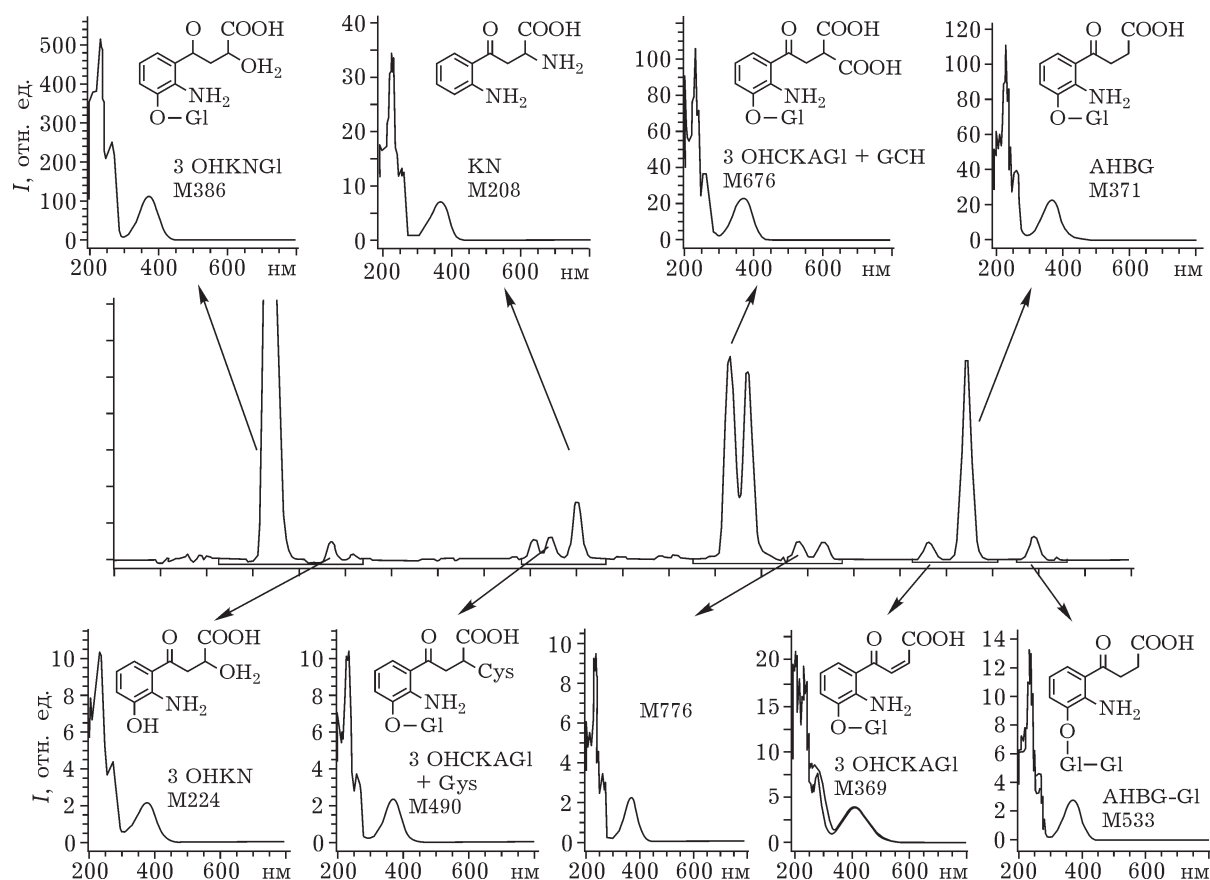


Рис. 10. Хроматографический профиль, УФ-спектры и молекулярные массы основных низкомолекулярных соединений катарактального хрусталика глаза человека.

триптофана, входят в состав хрусталика глаза человека и выполняют функцию УФ-фильтров, защищая сетчатку от облучения. Предполагается, что термические и фотохимические реакции с участием кинуренинов могут приводить к необратимой модификации белков хрусталика, а впоследствии, – к развитию катаракты. Механизмы этих реакций изучены слабо, поэтому исследование химических свойств кинуренинов имеет большое значение для фотохимии, биологии и медицины. Исследования трансформаций и метаболизма кинурениновых УФ-фильтров проводились совместно с МТЦ СО РАН, ИЦиГ СО РАН, НГУ и Областной больницей Новосибирска с использованием методов ВЭЖХ и привлечением собственной коллекции спектрально-хроматографических характеристик.

При использовании комплекса спектральных и хроматографических методов исследован состав продуктов фотохимических и термохимических превращений кинуренина, получены данные о кинетических параметрах процессов в интервале 50–90 °С [42, 43]. На основании этих результатов предложена схе-

ма термохимического превращения кинуренина, включающая процессы деаминарования, декарбоксилирования и циклизацию. Впервые обнаружено образование гидроксикинулина.

Проведено исследование 48 образцов катарактальных хрусталиков глаз человека и получены их метаболические профили (рис. 10) [44, 45].

На основании предполагаемой схемы превращений УФ-кинурениновых светофильтров в хрусталике глаза человека (схема 1) установлен качественный и количественный состав производных кинуренина в водно-спиртовых экстрактах катарактозных хрусталиков и их суммарное содержание. Установлено, что концентрации отдельных компонентов могут различаться в 50 раз. Так, например концентрация гликозида 3-ОН-кинуренина (3 ОНКГ) варьирует в диапазоне от 6 до 320 нмоль/г.

Проведена идентификация основных компонентов экстрактов катарактальных хрусталиков глаза человека. Впервые обнаружено, что в состав хрусталика входит деаминированный гликозид 3-ОН-кинуренин (3-ОНСКАГ), дополнительным доказательством

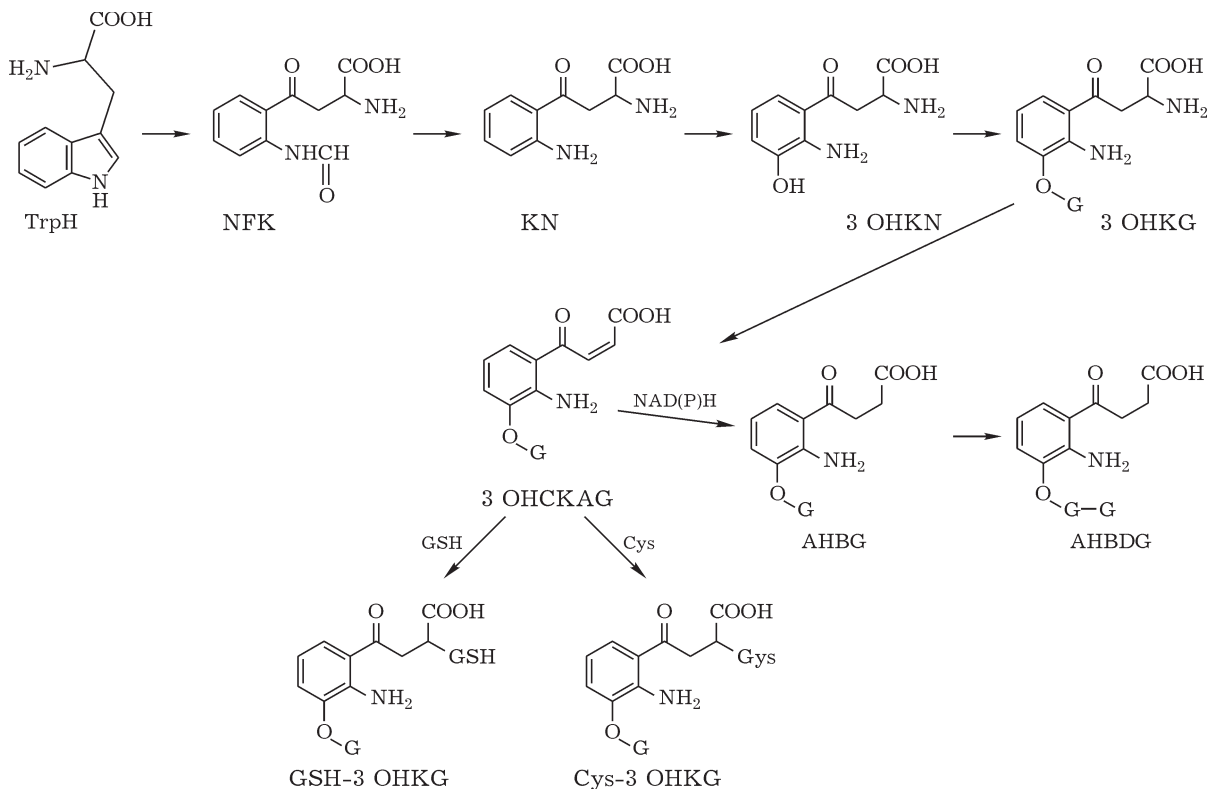


Схема 1.

этому служит регистрация аддукта 3-ОНСКАГ с глутатионом.

Получены и исследованы хроматографические профили УФ-фильтров в хрусталиках глаз крыс двух линий (Wistar и Oxis) в зависимости от возраста (от 1 дня до 2 лет). Линия Wistar считается нормой, а вторая линия преждевременно стареющих крыс – первая отечественная модель сенильной катаракты, созданной в ИЦИГ СО РАН. Установлено, что, вопреки распространенному мнению, хрусталики глаз крыс содержат кинуренины. Показано, что максимальная концентрация кинуренина соответствует возрасту примерно в 0.5 мес., а к 2 годам она уменьшается практически до нуля. Изменение концентрации триптофана симбатно изменению кинуренина до одного года, а к двум годам концентрация триптофана несколько увеличивается [46].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены состав и строение кинурениновых УФ-фильтров катарактально-го хрусталика глаза человека и получены их метаболические профили. Впервые в хрусталике глаза человека обнаружен деаминированный гликозид гидроксикинуренина – ключевое промежуточное соединение, приводящее к необратимой модификации белков хрусталика глаза человека. Экспериментально подтверждена одна из схем необратимой модификации белков хрусталика с участием кинурениновых УФ-фильтров, приводящая к развитию катаракты. Показана возможность использования крыс линий Wistar и Oxis в качестве моделей для изучения развития катаракты. Полученные данные о молекулярных процессах катарактогенеза открывают возможности для разработки медицинских средств диагностики, профилактики и лечения катаракты.

Совместно с ИЭВСиДВ СО РАСХН методом ВЭЖХ проведены фармакокинетические исследования накопления и выведения из организма препарата с мощной антипаразитарной активностью аверсектина – природной смеси восьми 16-членных макроциклических лактолов, получаемых путем микробиологического синтеза с использованием культуры *Streptomyces avermitilis*. Разработаны методики для определения содержания аверсектина в плазме, жировой, мышечной и печеночной тканях сельскохозяйственных животных мето-

дом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Получены фармакокинетические зависимости для аверсектинового комплекса при испытаниях на сельскохозяйственных животных Горного Алтая (овцы, маралы, коровы) при пероральном введении, которые использованы для разработки новых эффективных антипаразитарных препаратов для сельского хозяйства и современных технологий их применения [47, 48].

Совместно с сотрудниками ИКиЭЛ СО РАМН методом ГХ и ГХ/МС получены метаболические профили и исследованы закономерности накопления и распределения свободных жирных кислот (как маркеров патогенной активации пероксидного окисления липидов), токоферолов (как маркеров антиоксидантной активности) в лимфатической и периферической кровеносной системах организма в нормальных условиях, при моделировании хронического гепатита и ишемии и их коррекции путем добавления в рацион питания животных биологически активных добавок, при воздействии на организм низкоэнергетического лазерного излучения. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли лимфатической системы в механизме окислительно-гомеостаза организма [49–51].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одно из важнейших направлений современного химического анализа – развитие методологии спектрально-хроматографического исследования сложных композиций низкомолекулярных органических веществ природного и антропогенного происхождения с идентификацией компонентов, определением их происхождения и возможностью прогнозирования свойств природных биологически активных веществ и новых материалов, полученных из этих веществ.

Проблема анализа сложных смесей органических веществ не имеет универсального решения, и одним из перспективных подходов к решению этой задачи является получение хроматографических профилей (“отпечатков пальцев”, fingerprint) изучаемых объектов.

Исследование хроматографических профилей антропогенных химических соединений, особенно стойких органических загрязните-

лей, позволяет идентифицировать источники загрязнения, разрабатывать научные основы анализа состояния экосистем, оценки риска воздействия химических веществ на здоровье населения, а также разрабатывать эффективные технологии защиты окружающей среды.

Получение и анализ хроматографических профилей (метаболических профилей) живых систем имеют большое значение для хемосистематики, биохимии, медицины, биологии, сельского хозяйства. Кроме того, они открывают широкие возможности для эффективного использования возобновляемого растительного и животного сырья с целью получения биологически активных веществ широкого спектра действия, для разработки новых средств и методов диагностики, профилактики и лечения ряда заболеваний. Хроматографические профили также позволяют решать множество прикладных проблем, связанных с определением источника исходного сырья, подлинности и качества продуктов природного происхождения.

Для получения высокоинформативных хроматографических профилей и решения задач распознавания “химического образа” сложных объектов и систем наиболее перспективно использование методов высокоэффективной газовой и жидкостной хроматографии с масс-селективными и диодно-матричными детекторами в сочетании с базами данных по физико-химическим свойствам, биологической активности, происхождению, поведению в окружающей среде, по методам анализа и идентификации органических веществ природного и антропогенного происхождения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам БИП СО РАН доктору хим. наук, проф. Д. М. Могнонову, чл.-кор. РАН А. К. Тулохонову и канд. техн. наук В. Е. Рогову за организацию и проведение совместных исследований оз. Байкал и бассейна р. Селенги на территории Бурятии и Монголии. Авторы признательны сотрудникам МТЦ СО РАН доктору хим. наук Ю. П. Центаловичу и канд. хим. наук О. А. Снытниковой за организацию и проведение совместных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Villas-Boas S.G., Mas S., Akesson M., Smedsgaard J., Nielsen // *J. Mass Spectrom. Rev.* 2005. Vol. 24. P. 613–646.
- Castaneda-Ovado A., Pacheco-Hernandez M. d. L., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A. // *Food Chem.* 2009. Vol. 113. P. 859–871.
- Robards K. // *J. Chromatogr.* 2003. Vol. 1000. P. 657–691.
- Summer L. W., Hubman D. V., Urbanczyk-Wochniak E., Lei Z. // *Plant Systems Biology.* / S. Baglansky, A. Femie (Eds). Basel: Birkhauser, 2007. P. 197
- Halket J. M., Waterman D., Przyborowska A. M., Patel R. K., Fraser P. D., Bramley P. M. // *J. Exp. Botany.* 2005. Vol. 56. P. 219–243.
- Лохов П. Г., Арчаков А. И. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. С. 497–511.
- Зенкевич И. Г., Пименов А. И., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. // *Растит. ресурсы.* 2003. Т. 39, № 3. С. 143–152.
- Zeng Z.-D., Liang Yi.-Z., Chau F.-T., Chen S., Daniel M. K.-W., Chan C.-O. // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 604 P. 89–98.
- Persistent Organic Pollutants in Asia. Sources, Distributions, Transport and Fate. / N. Li, S. Tanabe, G. Jiang, J. P. Giesy, P. K. S. Lam (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 2007.
- Boer J., Law R. J. // *J. Chromatogr.* 2003. Vol. 1000. P. 223–251.
- Santos F. J., Galseran M. T. // *J. Chromatogr. A.* 2003. Vol. 1000. P. 125–151.
- Ткачева Н. И., Русакова Е. В., Морозов С. В. // *Науч. и техн. библиотеки.* 2008. № 5. С. 56–61.
- Морозов С. В., Черняк Е. И., Вялков А. И., Ткачева Н. И. // *Химия ароматических, гетероциклических и природных соединений (НИОХ СО РАН 1958–2008 гг.)* / Отв. ред. В. Н. Пармон. Новосибирск, 2009. С. 737–778.
- Винокуров Ю. И., Каплинский А. Е., Мальгин М. А., Павлов В. Е., Пузанов А. В., Суторихин И. А., Федулкина М. А., Зуева О. А., Вялков А. И., Морозов С. В., Стариченко В. Ф. // *Химия уст. разв.* 1999. Т. 7, № 6. С. 651–658.
- Коптюг В. А., Шойхет Я. Н., Киселев В. И., Стариченко В. Ф., Морозов С. В., Черняк Е. И., Стехова С. А., Зайцев Е. В. // *Вестн. науч. программы “Семипалатинский полигон – Алтай”.* 1997. № 1. С. 10.
- Коптюг В. А., Стариченко В. Ф., Морозов С. В., Асташова Т. А., Вялков А. И., Киселев В. И., Зайцев Е. В. // *Вестн. науч. программы “Семипалатинский полигон – Алтай”.* 1997. № 1. С. 20.
- Александров В. Ю., Морозов С. В., Олькин С. Е., Сеелегов В. В. // *Состояние окружающей природной среды Новосибирской области в 1997 году.* Новосибирск, 1998. С. 110.
- Рапута В. Ф., Коковкин В. В., Садовский А. П., Олькин С. Е., Резникова И. К., Морозов С. В., Кузнецова И. И., Чирков В. А. // *Оптика атм. и океана.* 2003. Т. 6. № 5–6. С. 546–551.
- Куценогий К. Л., Ковальская Г. А., Смирнова А. И., Макаров А. И., Морозов С. В., Осипова А. И., Посух О. Л., Смоляков Б. С., Павлюк Л. А., Вялков А. И. // *Оптика атм. и океана.* 1998. № 16. С. 1.
- Коковкин В. В., Морозов С. В., Рапута В. Ф., Шуваева О. В. // *Оптика атм. и океана.* 2000. № 13. С. 788.
- Kurteeva L. I., Morozov S. V., Anshits A. G. // *Adv. in the Geological Storage of Carbon Dioxide. (NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Science. Vol. 65).* / S. Lombardi, L. K. Altunina, S. E. Beaubien (Eds.). Dordrecht: Springer, 2006.
- Куртеева Л. И., Морозов С. В., Цыганова С. И., Аншиц А. Г. // *Хим. технология.* 2004. № 5. С. 30–35.



- 23 Коптюг В. А., Аншиц А. Г., Савинов В. И., Суздорф А. Р., Морозов С. В., Куртеева Л. И., Верещагин С. Н., Фризоргер В. К., Аншиц Н. Н., Крак М. И. // *Химия уст. разв.* 1997. № 5. С. 553–556.
- 24 Куртеева Л. И., Цыганова С. И., Морозов С. В., Аншиц Н. Н., Суздорф А. Р., Плеханов В. П., Аншиц А. Г. // *Химия уст. разв.* 2002. № 10. С. 431–441.
- 25 Integrated Water Management Model on the Selenge River Basin: Status Survey and Investigation (Phase 1). / Y. Mun, I.H. Ko, L. Janchivdorj, B. Gomboev., S. Kang, Ch-H Lee (Eds.). Korea Environment Inst. Seoul, 2008. 423 p.; Integrated Water Management Model on the Selenge River Basin: Basin Assessment and Integrated Analysis (Phase 2). / J. M. Chu, I. H. Ko, L. Janchivdorj, B. Gomboev., Ch-H Lee, S. I. Kang (Eds.). Korea Environment Inst. Seoul, 2009. 356 p.; Integrated Water Management Model on the Selenge River Basin: Development and Evaluation of The IWMM on the SRB (Phase 3). / J. M. Chu, Ch-H. Lee, L. Jan Janchivdorj, B. O. Gomboev, S.Y. Park, H. J. Mun. (Eds.). Korea Environment Inst. Seoul, 2010. 304 p.
- 26 Тулохонов А. К., Гомбоев Б. О., Могнонов Д. М., Зоимонова Э. М., Хахинов В. В., Жемьянов Д. Ц.-Д., Санг Ин Канг, Джанг Мин Чу, Юрии Мун, Чанг Хи Ли, Цогтбаатар Ж., Жанчивдорж Л., Одонцэцэг Д., Молотов В. С., Коломеец О. П., Гомбоева Р. И., Морозов С. В., Рабина О. А. // *Байкальская Азия: экономика, экология, устойчивое развитие (результаты международного сотрудничества)*. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2009. С. 52.
- 27 Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, Characterisation and Biological Properties. // C. Tringali (Ed.). London–NY: Taylor&Francis, 2001.
- 28 Natural Products. Drug Discovery and Therapeutic Medicine. / L. Zhang, A. L. Demain (Eds.). Totowa: Humana Press, 2005.
- 29 Liangli Yu. Wheat antioxidants. / Liangli Yu. (Ed.) Hoboken: Wiley, 2008.
- 30 Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products. / Fereidoon Shahidi, Chi-Tang Ho. (Eds.). Washington: Am. Chem. Soc., 2005. 308 p.
- 31 Grotewold E. The Science of Flavonoids. Birkhauser: Springer, 2006.
- 32 Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Second ed. / S. M. Colegate, R. J. Molyneux (Eds.). Boca Raton: CRC Press, 2008.
- 33 Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. / N. G. Bisset, M. Wichtl (Eds.). Stuttgart: Medpharm, 2004.
- 34 Черняк Е. И., Вялков А. И., Царалунга Я. С., Морозов С. В. // *Химия уст. разв.* 2007. Т. 15, № 5. С. 609–624.
- 35 Минахметов Р. А., Онучак Р. А., Куркин В. А., Авдеева Е. В., Волоцьева А. В. // *Химия природ. соед.* 2001. Т. 37, № 4. С. 318–321.
- 36 Боярских И. Г., Юшкова Ю. В., Черняк Е. И., Морозов С. В. // *Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та.* 2011. Т. 77, № 3. С. 39–45.
- 37 Исаева Е. В., Ложкина Г. А., Рязанова Т. В., Морозов С. В., Черняк Е. И. // *Химия раст. сырья.* 2008. № 2. С. 47–53.
- 38 Морозов С. В., Черняк Е. И., Вялков А. И., Кошелева Н. В., Митасов М. М., Коломникова В. И. // *Сб. статей по материалам Всерос. науч.-практ. конф. “Лесной и химический комплексы – проблемы и решения”*. Т. 1. Красноярск, 2009. С. 43–47.
- 39 Пат. 2355170 РФ, 2008.
- 40 Пат. 2324352 РФ, 2006.
- 41 Пат. 2432744 РФ, 2011.
- 42 Tsentlovich Yu. P., Snytnikova O. A., Forbes M. D. E., Chernyak E. I., Morozov S. V. // *Exp. Eye Res.* 2006. Vol. 83. P. 1439–1435.
- 43 Kopylova L. V., Snytnikova O. A., Chernyak E. I., Morozov S. V., Tsentlovich Yu. P. // *Exp. Eye Res.* 2007. Vol. 85. P. 242–249.
- 44 Snytnikova O. A., Fursova A. Zh., Chernyak E. I., Vasiliev V. G., Morozov S. V., Kolosova N. G., Tsentlovich Yu. P. // *Exp. Eye Res.* 2008. Vol. 86. P. 951–956.
- 45 Kopylova L. V., Snytnikova O. A., Chernyak E. I., Morozov S. V., Forbes M. D. E., Tsentlovich Yu. P. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. Vol. 7. P. 2958–2966.
- 46 Snytnikova O. A., Kopylova L. V., Chernyak E. I., Morozov S. V., Kolosova N. G., Tsentlovich Yu. P. // *Mol. Vis.* 2009. Vol. 15. P. 2780–2788.
- 47 Ефремова Е. А., Марченко В. А., Морозов С. В., Черняк Е. И. // *Сиб. вестн. с.-х. науки.* 2008. № 1(189). С. 90–94.
- 48 Ефремова Е. А., Марченко В. А., Черняк Е. И., Морозов С. В. // *Рос. паразитол. журн.* 2010. № 2. С. 107–111.
- 49 Асташова Т. А., Бергман Ю. Э., Морозов С. В., Асташов В. В. // *Вестн. лимфол.* 2008. № 2. С. 34–35.
- 50 Асташова Т. А., Асташов В. В., Чикова Е. Д., Савицкая И. В., Морозов С. В. // *Эфферентная терапия.* 1999. № 5. С. 29–34.
- 51 Асташова Т. А., Васильева М. Б., Асташов В. В., Морозов С. В. // *Эфферентная терапия.* 2007. № 3. С. 64–69.