

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Ставрианиди Андрей Николаевич

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

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., с.н.с. Родин И.А.

Москва 2014

СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений	4
Введение.....	5
Глава 1. Литературный Обзор.....	10
1.1 Виды женьшеней.....	13
1.2 Химический состав женьшеня	14
1.3 Извлечение гинсенозидов из растительного сырья	17
1.4 Выделение биоактивных компонентов женьшеня	20
1.4.1 Препаративная хроматография	21
1.4.2 Имунноаффинная хроматография	22
1.5 Определение целевых аналитов.....	23
1.5.1 Определение гинсенозидов методом ТСХ.....	23
1.5.2 Определение компонентов женьшеня методом ГХ	24
1.5.2 Определение состава женьшеня методом мицеллярной электрокинетической хроматографии	25
1.5.3 Определение состава женьшеня методом ВЭЖХ в сочетании с различными способами детектирования	26
1.5.4 Определение состава женьшеня методом ИФА	32
1.5.5 Определение состава женьшеня методом многомерной хроматографии	33
1.6 Групповая идентификация и определение метаболических профилей	34
1.7 Альтернативные способы определения состава женьшеня	43
1.8 Исследования метаболизма гинсенозидов.....	45
1.9 Актуальные задачи исследования женьшеня	50
1.9.1 Идентификации видов женьшеня.....	50
1.9.2 Оценка качества женьшеневой продукции.....	52
1.9.3 Получение информации о структуре метаболитов гинсенозидов в режиме on-line.....	54
1.9.4 Изучение динамики химической трансформации женьшеневых сапонинов.....	55
1.9.5 Фармакокинетические исследования женьшеневых сапонинов.....	58
Глава 2. Оборудование, материалы, техника эксперимента	63
2.1 Оборудование и материалы.....	63
2.2 Техника эксперимента	65
2.2.1 Схема эксперимента по оптимизации ВЭЖХ-МС детектирования гинсенозидов.	65
2.2.2 Схема эксперимента по разработке способа ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного материала и продуктов на основе женьшеня.	67
2.2.3 Схема эксперимента по получению гинсенозидных профилей растительного материала и продуктов на основе женьшеня.....	67

2.2.4	Схема эксперимента по препаративному ВЭЖХ выделению фракции неизвестного сапонина из чая на основе женьшеня.....	68
Глава 3. Разработка способов обнаружения и определения гинсенозидов		70
3.1	Разработка способов определения гинсенозидов методом ВЭЖХ-МС/МС.....	70
3.1.1	Разработка способов детектирования гинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов.....	70
3.1.2	Разработка способов определения псевдогинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов.....	79
3.1.3	Выбор условий ВЭЖХ-МС детектирования гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.....	85
3.2	Разработка способов количественной оценки содержаний гинсенозидов	91
3.3	Разработка способов ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа.....	94
3.3.1	Проверка применимости экстракции гинсенозидов способом «введено – найдено».....	94
3.3.2	Сравнение хроматографических параметров разделения при использовании различных органических растворителей.....	96
3.3.3	Изучение эффективности извлечения гинсенозидов	97
Глава 4. Интерпретация масс-спектров гинсенозидов. Разработка способа групповой идентификации.....		102
4.1	Основные принципы интерпретации масс-спектров на примере стандартных гинсенозидов.....	102
4.1.1	Отличительные черты масс-спектров гинсенозидов	102
4.1.2	Примеры гинсенозидов, имеющих неотличимые масс-спектры	111
4.2	Алгоритм получения структурной информации из данных МС анализа образцов, содержащих женьшеневые сапонины	113
Глава 5 Апробация разработанного подхода обнаружения и определения гинсенозидов		124
5.1	Анализ объектов с использованием разработанного способа ВЭЖХ-МС/МС детектирования в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.....	124
5.1.1	Анализ корней женьшеня.....	124
5.1.2	Анализ коммерческих продуктов на основе женьшеня.....	130
5.1.3	Классификация обнаруженных гинсенозидов по типу сапогенина	134
5.3	Определение псевдогинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов...	137
5.4	Исследование состава женьшеневого улуна.....	140
5.4.1	МС анализ женьшеневого улуна.....	140
5.4.2	Разработка способа полупрепаративного ВЭЖХ выделения компонентов женьшеневого чая	144
5.4.3	ЯМР анализ фракций, содержащих биоактивные компоненты женьшеневого улуна	150
Литературный обзор		155

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА	альбумин из бычьей сыворотки
ВП	входной потенциал
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТСХ	высокоэффективная тонкослойная хроматография
ГХ	газовая хроматография
ДАС	диссоциация, активированная соударением
ДМД	диодноматричное детектирование
ЖХ	жидкостная хроматография
ЗЧАД	детектирование заряженных частиц в аэрозоле
ИДСР	испарительное детектирование по светорассеянию
ИФА	иммуноферментный анализ
КЗЭ	капиллярный зонный электрофорез
КЭ	капиллярный электрофорез
ЛИЛ	линейная ионная ловушка
МКАТ	моноклональное антитело
МНК	метод наименьших квадратов
МС	масс-спектрометрия
МЭКХ	мицеллярная электрокинетическая хроматография
МЭЭКХ	микроэмульсионная электрокинетическая хроматография
ОАК	олеаноловая кислота
ОТ	октиллол
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ПД	потенциал декластеризации
ПМР	протонный магнитный резонанс
ППД	протопанаксадиол
ППТ	протопанаксатриол
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СССХ	хроматография в сверхсжатом слое
СФЭ	сверхкритическая флюидная экстракция
ТСХ	тонкослойная хроматография
УФ	ультрафиолетовый
ХИАД	химическая ионизация
ЭС	энергия соударений
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

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

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

Женьшеневые сапонины (гинсенозиды) являются основными действующими веществами растений рода *Panax*. Эти растения активно используют в

производстве средств традиционной медицины в Китае, Корее, Японии, США и на Дальнем Востоке. На протяжении последних 50 лет многие исследователи разрабатывали методы идентификации и определения гинсенозидов в растительных материалах, экстрактах и коммерческих продуктах. Для выделения гинсенозидов из растительного сырья использовали различные виды экстракции, и разделение гинсенозидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ. Установлено, что во время традиционных процедур обработки корня женьшеня, например обработки паром, а также на некоторых стадиях пробоподготовки происходит частичное или полное разложение гинсенозидов. Это приводит к увеличению числа компонентов из той же группы гинсенозидов. Молекула любого гинсенозида состоит из сапогенина и сахаридных боковых цепей, которые, в свою очередь, могут иметь заместители, например малонил и ацетил. Во многих образцах женьшеня присутствует большое число разнообразных гинсенозидов, отличающихся составом заместителей, а также сапогенином, от сапонинов, обнаруженных ранее методами планарной хроматографии. Общее число известных гинсенозидов превышает 600, и стандартные образцы большинства из них труднодоступны, поэтому развитие методов групповой ВЭЖХ-МС/МС идентификации и определения этих веществ для получения информации о составе женьшеневого растительного сырья, продуктов на его основе и их влиянии на организм человека представляется перспективным.

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

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Изучение процессов ионизации, характера фрагментации исследуемой группы веществ в условиях ВЭЖХ-МС/МС. Оптимизация условий получения масс-спектров, содержащих информацию о структуре соединений, и выявление особенностей формирования масс-спектров на примере различных гинсенозидов.

2. Создание алгоритмов идентификации структурных фрагментов, а также выявление значимых признаков, которые могут быть использованы для классификации неизвестных компонентов на основе совпадения паттернов фрагментации с установленными для нескольких подгрупп в рамках исследования женьшеневых сапонинов с различным типом сапогенина.

3. Выбор и оптимизация условий пробоподготовки, обеспечивающих эффективное и неразрушающее извлечение определяемых соединений из растительных материалов и продуктов на их основе.

4. Изучение хроматографического поведения исследуемой группы веществ в условиях обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ и разработка способов оценки их содержаний по площадям пиков в варианте сканирования и регистрации выделенных ионов с использованием ЛИЛ.

Выбор условий ВЭЖХ выделения фракций, содержащих неизвестные компоненты, для их последующего анализа методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и сопоставления полученных данных с результатами интерпретации масс-спектров этих веществ.

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

Выбраны условия разделения 17 стандартных гинсенозидов в варианте ОФ ВЭЖХ, которые легли в основу разработанного способа обнаружения гинсенозидов в реальных объектах. Преимуществами данного способа, по сравнению с описанными в литературе, являются высокая селективность и чувствительность, высокая информативность регистрируемых с использованием ЛИЛ масс-спектров и возможность автоматизации. Проведена проверка

разработанного способа на образцах сухого и свежего корня женьшеня, а также экстрактах и продуктах на его основе.

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

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

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

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

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

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

На защиту выносятся следующие положения:

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

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

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

4. Условия хроматографического разделения и детектирования женьшеневых сапонинов в варианте ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Результаты обнаружения женьшеневых сапонинов в реальных объектах.

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

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

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

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

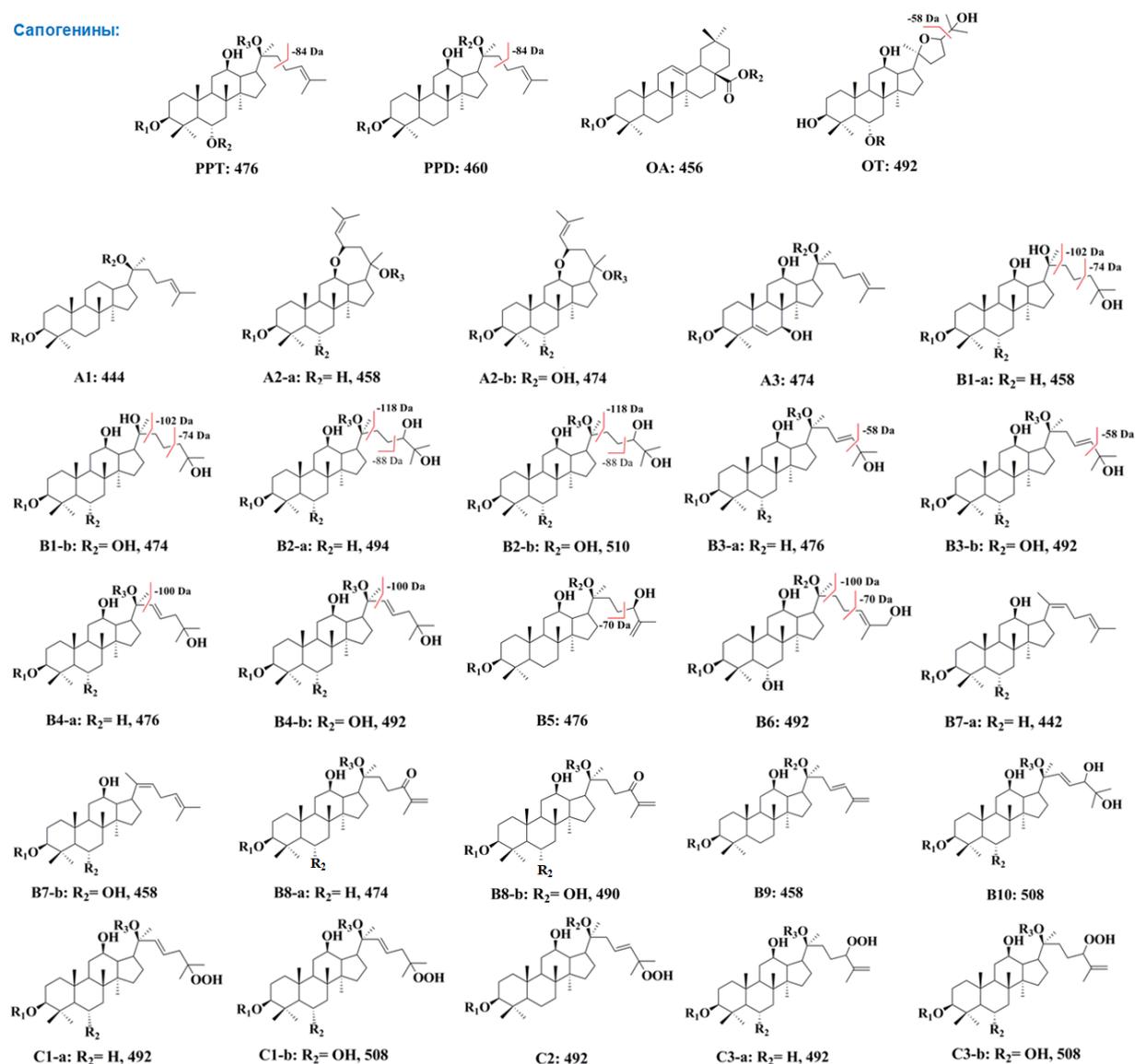
Структура и объем работы Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 179 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 82 рисунков и 23 таблицы, в списке цитируемой литературы 230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

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

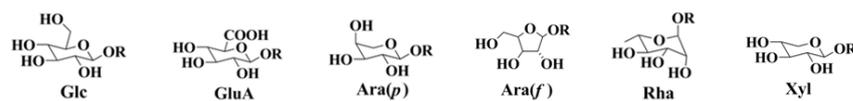
Гинсенозиды относятся к классу тритерпеновых сапонинов и являются основными биоактивными компонентами наиболее распространенного растения, используемого в восточной традиционной медицины, женьшеня (род *Panax*). Наиболее часто такие лекарственные средства изготавливают на основе *P. ginseng*, (в Корее и Азии), *P. quinquefolius* (в США), *P. notoginseng* (в Китае и Японии), *P. vietnamensis* (во Вьетнаме) и *P. japonicas* (в Японии). На сегодняшний день наиболее изучен Корейский женьшень (*P. ginseng*), который использовали в Азии на протяжении 5000 лет в качестве тоника и панацеи, способной продлить жизнь [1]. В настоящее время женьшень применяют в основном как общеукрепляющее средство и для увеличения сопротивляемости организма к физическому, химическому и биологическому стрессу [2, 3]. Это свойство Женьшеня, называемое «адаптогенностью», часто упоминают в литературе, посвященной альтернативной медицине [4, 5]. Обнаруженные в клинических и лабораторных испытаниях модуляция иммунной системы, антистрессовая и антигипергликемическая активности – наиболее существенные черты препаратов на основе женьшеня. Более того, многие современные доклинические и клинические исследования указывают на существование противораковых свойств таких препаратов [6, 7].

Основными компонентами женьшеня, отвечающими за все его лечебные свойства, являются гинсенозиды. На данный момент более 620 гинсенозидов было выделено из растений рода *Panax* [8]. Молекула любого гинсенозида состоит из основания (сапогенина) и сахаридных боковых цепей, которые, в свою очередь, также могут иметь заместители более простой структуры, например малонил [9] (рис. 1). Наиболее распространены гинсенозиды с протопанаксатриольными (ППТ), протопанаксадиоольными (ППД) и октиллольными (ОТ) сапогенинами [10]. Чуть меньше известно на данный момент гинсенозидов с олеаноловым кислотным (ОАК) сапогенином или с сапогенинами с вариациями в боковой цепи в положении С17 (рис. 2) и другими неизвестными сапогенинами [8].

Сапогенины:



Сахаридные остатки:



Заместители:

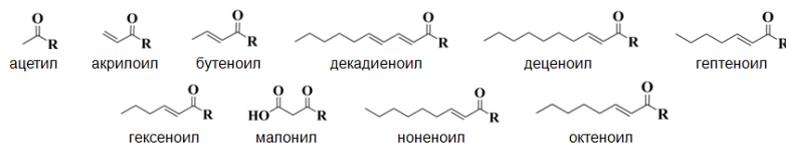


Рис. 1. Структурные фрагменты молекул гинсенозидов.

Поскольку женьшень – одно из самых популярных растений, используемых в фитомедицине во всем мире, огромное число работ было выполнено в последние 40 лет с целью разработки аналитических методов идентификации, количественной оценки содержаний и контроля качества гинсенозидов в растительном сырье, экстрактах и коммерческих продуктах. Одной из основных задач таких

исследований была дифференциация гинсенозидных паттернов для различных представителей рода *Panax*, чтобы избежать фальсификации и неверной идентификации. Кроме того, изучено влияние традиционных способов переработки корней *P. ginseng* на гинсенозидный состав получаемого продукта (красный и белый женьшень). В последние 30 лет наиболее популярным методом определения гинсенозидов стала ВЭЖХ. Вне зависимости от метода детектирования, безэталонный анализ гинсенозидов – трудновыполнимая задача из-за обширных возможностей их изомерии. Помимо изомерии сапогенина и заместителей в молекулах большинства гинсенозидов присутствует хиральный атом углерода C20 (рис. 2), что также влияет на фармакологические свойства лекарственных препаратов на их основе [11]. Изучая механизмы биологической активности гинсенозидов и развивая методы их определения, исследователи сталкиваются с проблемой трудной доступности стандартных образцов этих веществ в достаточных количествах [12]. Таким образом, дальнейшее изучение влияния гинсенозидов на живые организмы напрямую зависит от развития методов выделения, разделения, идентификации и определения гинсенозидов в различных объектах.

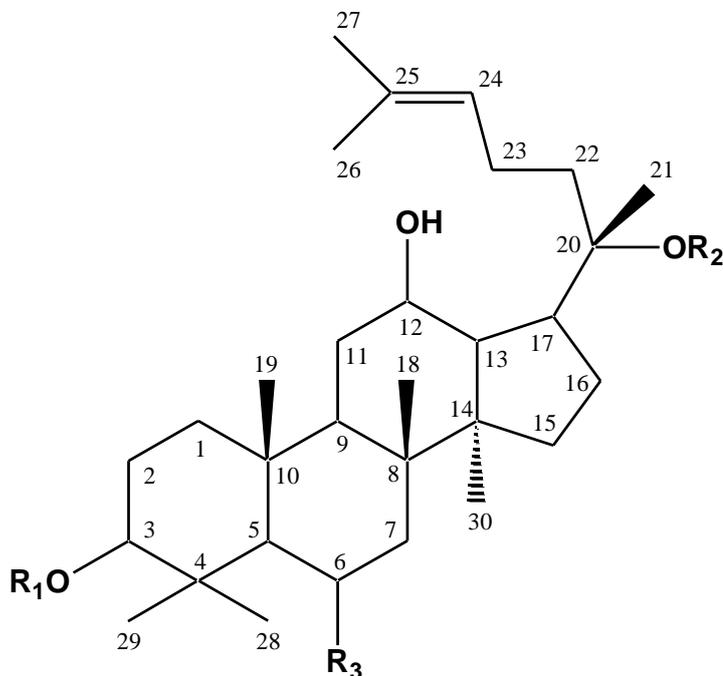


Рис. 2. Структура ППТ ($R_1 = H$) и ППД ($R_3 = H$) гинсенозидов. R_2 – боковая сахаридная цепь в положении C20; $OR_1(R_3)$ – боковая сахаридная цепь в положении C3(6).

1.1 Виды женьшеней

Panax ginseng (азиатский женьшень, также известный как китайский или корейский женьшень; семейства *Araliaceae*) представляет собой оригинальный, наиболее распространенный женьшень с самым большим лечебным потенциалом. Этот вид произрастает на высокогорьях Маньчжурии – области между Китаем и Кореей. Этот куст достигает порядка 50 см в высоту с кроной из темно-зеленых вертикальных листьев и небольшими зелеными цветами, развивающимися в яркие красные ягоды [13]. Большинство сырого растительного материала получают в южной Корее, где это растение выращивают под соломенными тентами. Когда растению становится 4–6 лет, разросшийся до 8–20 см корень, толщиной 2 см, выкапывают. Тонкие части стержневого корня и ответвления отрезают, затем корень промывают и снимают верхний слой. При высушивании под солнцем получается белый женьшень, а при обработке паром, с последующей сушкой и дополнительным выдерживанием на солнце получается красный женьшень с гладкой поверхностью.

P. quinquefolius (американский женьшень) менее крупный в сравнении с азиатским женьшенем, всегда использовался коренными жителями Америки для лечения различных заболеваний. В данный момент его производство в США, Канаде и северо-восточном Китае составляет более 1000 тон сухого корня в год.

P. japonicus (японский женьшень) часто используют японские врачи в качестве замены *P. ginseng*, но *P. japonicas* содержит меньше активных ингредиентов (гинсенозидов), чем *P. ginseng*.

P. notoginseng (нотоженьшень), также называемый *san qi*, так же хорошо известен китайской традиционной медицины. Он эффективен при ухудшении гомеостаза и лечении коронарного тромбоза [13, 14]. Одним из подвидов *P. pseudoginseng* является *Himalaicus* (гималайский женьшень), который жители Гималаев используют для стимуляции аппетита и лучшего пищеварения. Лечебный потенциал этого растения значительно ниже, чем *P. ginseng*.

P. trifolius (карликовый женьшень) – редкий подвид американского женьшеня, обычно встречается в северной Америке. Коренные американцы использовали *P. trifolius* для лечения головных болей, кашля, несварения и других заболеваний.

Eleutherococcus senticosus (сибирский женьшень) не принадлежит к роду *Panax*, из-за этого, его даже не считают настоящим женьшенем, несмотря на то, что он принадлежит к семейству *Araliaceae*. Сибирский женьшень чаще всего продают как более дешевый и оказывающий ослабленное действие аналог *P. ginseng*.

В силу широкого применения женьшеня в средствах традиционной медицины и других лекарствах, аутентификация видов женьшеня является современной необходимостью. Гинсенозид Rf и 24(R)-псевдогинсенозид F11 были выбраны для идентификации азиатского и американского женьшеня, соответственно [15, 16]. Генетические подходы к аутентификации видов женьшеня описаны в работе [17], и включали в себя такие способы, как метод анализа случайно амплифицированной полиморфной ДНК, ДНК-дактилоскопии с использованием зондов мульти-локусов, полиморфизма длины фрагментов-рестрикторов, эффекта усиления длины фрагмента полиморфизма и микроспутниковой технологии. Более того, авторам удалось разработать в рамках выбранной технологии набор микроспутниковых маркеров, позволяющих отличать азиатский и американский женьшени.

1.2 Химический состав женьшеня

Из корня женьшеня выделено несколько классов соединений. Они включают: тритерпеновые сапонины, основные полиацетилены и сесквитерпены, полисахариды, пептидогликан и его аналоги, азотсодержащие органические соединения и другие, широко распространенные соединения, например, жирные кислоты, углеводороды и фенолы [4]. Как было отмечено выше, соединениями, которые отвечают за фармакологические свойства женьшеня, являются тритерпеновые сапонины. На данный момент после открытия более 400 новых структур гинсенозидов [8] появилась необходимость не только в выделении достаточных количеств этих веществ из растительных материалов для подтверждения их структуры такими методами, как спектроскопия ЯМР, но и в создании подробной классификации данной группы соединений и их аналогов, а также методов быстрой идентификации и определения гинсенозидов в лекарственных средствах и других продуктах на основе женьшеня. Также необходимо изучить влияние, которое могут оказывать на организм гинсенозиды,

присутствующие в растительном сырье в относительно малом количестве. Вначале используемая номенклатура гинсенозидов основывалась на их подвижности на подложках для ТСХ, а индекс давался в соответствии с уменьшением полярности от «а» до «h». Это свойство коррелировало с числом моносахаридных остатков в боковых сахаридных цепях. В приложении к работе [8] использована система сокращенных обозначений молекул гинсенозидов вида: S-20-R₁-6(3)-R₂, где S – сапогенин, а R₁ и R₂ – заместители в виде последовательности сокращенных названий сахаридных остатков и радикалов (рис. 1). Такая запись, безусловно, отражает больше информации о строении гинсенозида, чем тривиальное название (Rb1, Rg1 и др.), кроме того, известно, что биологическая активность этих соединений зависит от длины и положения сахаридных заместителей и строения боковой цепи при атоме C17 (разного у различных сапогенинов). В табл. 1 представлены сокращенные обозначения самых распространенных гинсенозидов.

Таблица 1. Сокращенные обозначения и формулы основных гинсенозидов

Гинсенозид (тривиальное название)	Обозначение	Формула
Ra1	ППД-20-Glc-Ara(p)-Xyl-3-Glc-Glc	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₅
Ra2	ППД-20-Glc-Ara(f)-Xyl-3-Glc-Glc	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₅
Ra3	ППД-20-Glc-Glc-Xyl-3-Glc-Glc	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇
Rb1	ППД-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃
Rb2	ППД-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂
Rb3	ППД-20-Glc-Xyl-3-Glc-Glc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂
Rc	ППД-20-Glc-Ara(f)-3-Glc-Glc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂
Rd	ППД-20-Glc-3-Glc-Glc	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈
Rg3	ППД-20-H-3-Glc-Glc	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃
Rh2	ППД-20-H-3-Glc	C ₃₄ H ₆₂ O ₈
Rs3	ППД-20-H-3-Glc-Glc-Ac	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₄
Mal-Rb1	ППД-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc-Mal	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆
Mal-Rb2	ППД-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc-Mal	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅
Mal-Rc	ППД-20-Glc-Ara(f)-3-Glc-Glc-Mal	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅
Mal-Rd	ППД-20-Glc-3-Glc-Glc-Mal	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁
F2	ППД-20-Glc-3-Glc	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃

Таблица 1. Сокращенные обозначения и формулы основных гинсенозидов (продолжение)

Гинсенозид (тривиальное название)	Обозначение	Формула
Rs1	ППД-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc-Ac	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃
Псевдо-RC1	ППД-20-Glc-3-Glc-Glc-Ac	C ₅₀ H ₈₄ O ₁₉
Rb1	ППТ-20-H-6-Glc-3-H	C ₃₆ H ₆₂ O ₉
Rg1	ППТ-20-Glc-6-Glc-3-H	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
Rf	ППТ-20-H-6-Glc-Glc-3-H	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
Rg2	ППТ-20-H-6-Glc-Rha-3-H	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃
Re	ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha-3-H	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈
F1	ППТ-20-Glc-6-H-3-H	C ₃₆ H ₆₂ O ₉
F3	ППТ-20-Glc-Ara(p)-6-H-3-H	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₃
Псевдо-F11	OT-6-Glc-Rha	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
Псевдо-RT5	OT-6-Glc	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀
Ro	OAK-3-GluA-Glc	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉
F4(Rg4)	B7-b-6-Glc-Rha-3-H	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
Rg5	B7-a-3-Glc-Glc	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
Rh3	B7-a-3-Glc	C ₃₆ H ₆₀ O ₇
Rh4	B7-b-6-Glc-3-H	C ₃₆ H ₆₀ O ₈
Rs4	B7-a-3-Glc-Glc-Ac	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₃
Rg6	isoB7-6-Glc-Rha-3-H	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
Rk2	isoB7-a-3-Glc	C ₃₆ H ₆₀ O ₇
Rk1	isoB7-a-3-Glc-Glc	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
Rk3	isoB7-b-6-Glc-3-H	C ₃₆ H ₆₀ O ₈
Rs7	isoB7-b-6-H-3-Glc-Ac	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₃
Rs5	isoB7-a-3-Glc-Glc-Ac	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₃

*Ac = ацетил, Mal = малонил.

В продаже доступны стандартизованные экстракты из женьшеня [12], например, двумя общедоступными стандартизованными экстрактами являются G115 из *P. ginseng* (содержание гинсенозидов около 4%) (*Pharmaton SA*, Швейцария) и NAGE из *P. quinquefolius* (содержание гинсенозидов около 10%) (*Canadian Phytopharmaceuticals Corporation*, Канада). ВЭЖХ исследование этих двух экстрактов показало, что гинсенозиды Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re и Rg1 присутствуют и в G115, и в NAGE, а гинсенозид Rg2 содержится только в G115. В

G115 содержание Rg1 выше, но в NAGE больше гинсенозидов Rb1 и Re [18-20]. В больших количествах данные вещества можно производить с использованием клеточных структур. Эти подходы хорошо описаны [21].

1.3 Извлечение гинсенозидов из растительного сырья

Предложено много методов экстракции гинсенозидов из растительного сырья. В большинстве подходов использовали метанол и этанол, а также их водные смеси. Использование смесей метанол:вода вместо чистого метанола оказалось более эффективным для выделения и очистки гинсенозидов [22]. Исследовано влияние температуры [23-26], ультразвука [27-30] и высокого давления [31] на процесс экстракции гинсенозидов. Доказано, что нагревание во время экстракции приводит к разрушению нестабильных малонил-гинсенозидов и превращению их в соответствующие незамещенные гинсенозиды. Показано [27], что частичное разложение (50%) гинсенозидов происходило уже через 5 ч экстракции метанолом в аппарате Сокслета, а для полного превращения необходимо порядка 20 ч. Для одновременного выделения и определения ацилзамещенных и незамещенных гинсенозидов в корнях растения *P. ginseng* предложен метод последовательной 15 мин ультразвуковой экстракции смесью (40:60) этанол:вода и 4-х ч перемешиванием с последующим определением методом ВЭЖХ с испарительным детектированием по светорассеянию (ИДСР) [28]. *n*-Бутанол вместо метанола можно использовать в исследовательских целях для экстракции гинсенозидов [32]. Сравнены степени извлечения четырех методов экстракции для 6 наиболее распространенных гинсенозидов (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re и Rg1) из корней *P. quinquefolius* [33]. Этими методами были: метод А, ультразвуковая экстракция метанолом при комнатной температуре; метод Б, экстракция 70%-ым метанолом при комнатной температуре; метод В, экстракция водой при 90°C без перемешивания; и метод Г, перемешивание при 60°C в метаноле. Далее образцы отфильтровывали и анализировали методом ВЭЖХ с детектированием в ультрафиолетовой (УФ) области поглощения. Метод Г позволил добиться наибольших коэффициентов извлечения всех гинсенозидов, кроме Rg1. Метод В оказался на втором месте по эффективности. Ультразвуковую экстракцию (3 × 30 мин) метанолом применяют для контроля качества коммерчески доступных

препаратов на основе американского и азиатского женьшеней на содержание гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Re, Rg1 и Rd [29, 30]. Экстракция смесью (30:70) метанол:вода при 50°C в течение 30 мин оказалась менее эффективной, чем ультразвуковая экстракция [30]. Теми же авторами разработаны специальные методы экстракции аналитов из гелей, жидких экстрактов, таблеток и каплет (овальных таблеток, покрытых оболочкой). Показано [34], что ультразвуковая экстракция сапонинов из корней женьшеня эффективнее экстракции в аппарате Сокслета. Одновременно с определением валового содержания гинсенозидов были отдельно определены количества извлеченных гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd и Rf, при использовании, как ультразвуковой бани, так и ультразвукового экстрактора. Были проанализированы образцы американского, китайского и корейского красного женьшеней, а также суспензии гинсенозидов в клеточных культурах. В большинстве случаев ультразвуковую экстракцию проводили при меньших температурах, что позволяет избежать разложения термически нестойких ингредиентов растительного сырья. То, что температура является действительно важным фактором, может быть проиллюстрировано на примере формирования гинсенозидов Rg3 и Rh2. Они ценятся за свои биологические свойства и в основном содержатся в образцах корней красного корейского женьшеня. Доказано, что данные гинсенозиды не входят в состав натурального продукта – североамериканского женьшеня, они образуются в результате термообработки при экстракции из гинсенозидов Rb1 и Rc, присутствующих в больших количествах [35]. В этом исследовании также приводятся детально разобранные масс-спектральные данные компонентов экстрактов из корней и листьев, полученные с применением ИЭР в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Также не следует забывать об артефактах, таких как формирование производных, например, сапогенинов ППД и ППТ при кислотном гидролизе [4].

Микроволновая экстракция гинсенозидов Rg1 и Rb1 в течение 15 мин, оказалась более эффективной, чем 10 ч последовательная экстракция тем же объемом растворителя [36]. Оптимизирован состав экстрагента (смеси вода:метанол), время экстракции (1–15 мин) и мощность микроволнового излучения (30–150 Вт). Содержание гинсенозидов рассчитывали с помощью ВЭЖХ. Микроволновую экстракцию гинсенозидов оптимизировали в работе [37].

Специальный микроволновой экстрактор (300 Вт) с частотой излучения 2450 МГц использовали для экстракции при 72°C в течение 4 повторений по 30 с. Эффективность извлечения Rb1, Rb2, Rc, Rd и Rg1 были сравнимы с выходами 12 ч экстракции растворителем того же состава (80% метанол) и при той же температуре.

Теоретически сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) может сэкономить время экстракции и расход органического растворителя [38]. Проведено сравнение эффективностей суб- и сверхкритической экстракции гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re и Rg1 и природных масел диоксидом углерода в аппарате Сокслета и ультразвуковой бане из корней женьшеня [39]. Доказано, что СФЭ диоксидом углерода с добавкой 6 мол.% этанола дает значительно более высокие результаты, чем СФЭ чистым диоксидом углерода. Необходимо заметить, что чистый диоксид углерода имеет небольшой дипольный момент и поэтому плохо подходит для извлечения полярных метаболитов. Экстракция диоксидом углерода с добавкой 6 мол.% этанола при 31.2 МПа и 333 К оказалась равноэффективна экстракции горячей водой, и менее эффективна по сравнению с экстракцией этанолом в аппарате Сокслета. Метанол и диметилсульфоксид использовали в качестве добавок для изучения эффективности экстракции [40]. Несмотря на то, что относительно большие концентрации добавок (27–30 ммол.%) и, соответственно, большие значения параметров (например, температура и давление) позволили добиться извлечения гинсенозидов до 90%, что сравнимо с результатами последовательной экстракции метанолом в аппарате Сокслета. СФЭ может быть сопряжена с последовательной жидкостной экстракцией для получения масел из отростков корня женьшеня.

Неионные поверхностно-активные вещества (ПАВ) также использовали в различных способах экстракции гинсенозидов. ПАВ Triton X-100 с концентрацией, большей критической концентрации мицеллообразования продемонстрировал способность более эффективно извлекать гинсенозиды Rg1, Re, Rb1, Rc и Rd под давлением в сравнении с ультразвуковой экстракцией метанолом или чистой водой [41]. При превышении критической температуры растворы неионных ПАВ также продемонстрировали уникальную способность к расслаиванию на фазу ПАВ и маточную водную фазу. Этот принцип в комбинации с ультразвуковой экстракцией

применили в работе [42] для экстракции гинсенозидов. Кроме того, все экспериментальные факторы процесса мицеллярной экстракции были оптимизированы для данных веществ. Аналогичный способ расслаивания в комбинации с жидкостной экстракцией под давлением применили для предварительного концентрирования образцов [41]. При добавлении сульфата аммония разделение между фазами было более эффективным, чем при нагревании (1 ч при 78°C). Недостатком такого подхода в целом является относительно высокая концентрация ПАВ при дальнейшем попадании раствора в ВЭЖХ систему, что приводит к увеличению времени регенерации хроматографической колонки. Кроме того, для извлечения гинсенозидов используют экстракцию с применением ионных жидкостей. Разработан способ ультразвуковой экстракции с применением ионных жидкостей на основе 1-алкил-3-метилимидазола с различным катионным и анионным составом для выделения восьми гинсенозидов (Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rb3 и Rd) из корня женьшеня [43]. Используя оптимальный состав ионной жидкости, удалось после 20 мин экстракции добиться в 3.2 раза лучшей эффективности по сравнению с обычной ультразвуковой экстракцией. Для разделения гинсенозидов применяли также противоточную хроматографию. Применение данного метода для выделения этих веществ редко встречается в литературе, однако в некоторых случаях оно дает положительные результаты. Так, например, в работе [44] 13 гинсенозидов, включая Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rk1, Rg5, Rg6 и F4, выделено из красного женьшеня с использованием разработанной методики с применением смесей хлористый метилен:метанол:изопропанол в различных соотношениях. Из образцов белого женьшеня было выделено 8 гинсенозидов, включая Rg1, Re, Rf, Rh1, Rb1, Rb2, Rc и Rd.

1.4 Выделение биоактивных компонентов женьшеня

Компоненты женьшеня и их функции изучают с помощью выделения по принципу биоактивности [45]. Для того чтобы доказать, является ли компонент биоактивным веществом или нет, готовят экстракт, в котором данный компонент (или ряд компонентов) устранен [46]. Такой препарат называют «нокаут» экстрактом. «Нокаут» подход широко распространен в генной инженерии и

фармакологических исследованиях с 1989 года [47]. Если при сравнении биоактивности выясняют, что «нокаут» экстракт оказывает меньшее действие, чем оригинальный экстракт, то удаленные из него компоненты могут быть расценены, как физиологически активные [46]. Таким образом, одной из задач было создание и проверка способов приготовления «нокаут» экстрактов. Для этих целей используют различные варианты хроматографии.

1.4.1 Препаративная хроматография

Некоторые виды «нокаут» экстрактов готовят с помощью колоночной хроматографии. Например, так было доказано, что гинсенозид Re, который содержится в экстрактах из ягод *P. quinquefolius*, обладает антигипергликемической активностью [48]. Чтобы приготовить свободный от гинсенозида Rb1 «нокаут» экстракт, оригинальный экстракт из ягод женьшеня был помещен в HP-20 хроматографическую колонку. Элюирование проводили с помощью воды и водного раствора этанола. Фракция, полученная после элюирования водным раствором этанола, была разделена с помощью высокоэффективной обращенно-фазовой препаративной хроматографии на три фракции: водную фракцию, Rb1 фракцию и фракцию, содержащую остальные сапонины. Далее фракцию, содержащую Rb1, отбрасывали, а водную и третью фракцию объединяли в итоговый «нокаут» экстракт. Для увеличения эффективности [45, 46] разработали автоматическую хроматографическую систему для приготовления «нокаут» экстрактов. В ней с помощью ВЭЖХ достигали разделения до базовой линии для пиков целевых компонентов растительного экстракта со смежными пиками. Затем, с помощью 6-ти канального крана происходило «вырезание» нужной области на хроматограмме в соответствии с временами удерживания. Ингредиенты экстракта, таким образом, были разделены на две части: целевые аналиты и все остальные компоненты. С помощью таких кранов-переключателей можно выделять основные биоактивные и характерные компоненты (а также их комбинации) для различных экстрактов. Так, достигнув разделения до базовой линии основных компонентов женьшеня с помощью ВЭЖХ [49], и применив описанную выше технику переключения крана, были получены оригинальный экстракт женьшеня, «нокаут» экстракты, свободные от Re, Rb1 и от обоих указанных гинсенозидов. Сравнение биологической активности всех

образцов, позволяет сделать заключение о действии каждого из целевых аналитов и их комбинаций.

1.4.2 Иммуноаффинная хроматография

Иммуноаффинную хроматографию применяют для выделения и концентрирования небольших количеств исследуемых веществ из проб со сложной матрицей [50, 51]. Ее селективность обусловлена использованием иммобилизованного белка на подходящем твердом носителе. После продолжительных исследований в области создания моноклональных антител (МКАТ) для биоактивных компонентов растений разработали анти-гинсенозиды Rb1 [52], Rg1 [53], Rd [54], и Re МКАТ [55]. Специфичность антител была протестирована при сопоставлении реакционной способности МКАТ со структурными аналогами выбранных гинсенозидов с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [56-58]. Способ получения «нокаут» экстракта, свободного от гинсенозида Rb1 подробно описан в работах [58-60]. Первым шагом является получение анти-гинсенозида Rb1 МКАТ из организма мыши, синтезировав сопряженный антиген, путем получения иммунного отклика, и проведя гибридизацию и очистку. Поскольку молекула анти-гинсенозида Rb1 МКАТ содержит сахаридную цепочку, вторым шагом является образование альдегидных групп с помощью окисления периодидом натрия (NaIO_4) [60, 61]. Окисленный продукт обрабатывают агарозовым гелем с присоединенными гидрозиновыми группами для образования гидразоновых групп. Иммуноаффинную колонку получают, соединяя аффинный гель с МКАТ [55, 59]. После проверки разработанного способа, экстракт женьшеня вводят в колонку, промываемую фосфатным буфером, после чего, элюируют смесью ацетатного буфера с 20 об.% метанола для получения чистого гинсенозида Rb1. Все полученные элюаты собирают и деионируют. Водный раствор концентрируют и используют для ТСХ или ВЭЖХ анализа. Данный иммуноаффинный хроматографический метод позволяет проводить одностадийное получение «нокаут» экстракта, свободного от гинсенозида Rb1. Если сравнивать с препаративным хроматографическим получением «нокаут» экстрактов, иммуноаффинная хроматография позволяет добиться большей аналитической чувствительности процедуры, уменьшает число трудоемких стадий пробоподготовки и позволяет увеличить объем вводимого

образца экстракта. Кроме того, суммарное время хроматографического разделения в оптимальных условиях значительно меньше. Однако иммуноаффинная хроматография также имеет ряд недостатков, например, сложность приготовления хроматографической колонки и соответствующих МКАТ (и их отсутствия в продаже) и неудовлетворительная стабильность неподвижной фазы иммуноаффинных колонок.

1.5 Определение целевых аналитов

1.5.1 Определение гинсенозидов методом ТСХ

Основными преимуществами ТСХ являются ее гибкость, быстрота, стабильность и низкая стоимость анализа. В фармацевтической индустрии ТСХ применяют для быстрой оценки чистоты образца, качественного анализа или идентификации различных объектов из фармакопеи. Отдельные гинсенозиды могут быть идентифицированы методом ТСХ, например, с использованием смеси (4:1:5) *n*-бутанол:этилацетат:вода в качестве элюента. Гинсенозиды образуют коричневые пятна, при обработке смесью (1:1) серной кислоты и воды и нагревании в печи до 105°C [34]. Изучено разделение гинсенозидов методами ТСХ, высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) и хроматографии в сверхсжатом слое (СССХ) [45]. Наилучшие результаты получены при использовании СССРХ на силикагеле 60 со смесью (20:22:60:8:4) хлороформ:метанол:этилацетат:вода:гексан в качестве подвижной фазы. Результаты анализов методами ТСХ, ВЭТСХ и СССРХ показали, что главное отличие заключалось в разделении определяемых соединений. Проточный вариант СССРХ оказался наиболее чувствительным методом для определения гинсенозидов. В варианте ВЭТСХ пластинки предварительно покрывают неподвижной фазой со средним значением размера частиц 5 мкм для лучшего разделения и воспроизводимости. Были разработаны методы ВЭТСХ для дифференциации различных видов растения женьшень. Характерные паттерны («отпечатки пальцев») позволяли идентифицировать красный и белый *P. ginseng*, *P. quinquefolius* и *P. notoginseng* [63, 64]. Для того чтобы не использовать вредные органические растворители разработали [65] подход для обращенно-фазового ТСХ разделения гинсенозидов с использованием смеси сульфата натрия – ацетонитрил – метанол вместо смеси

хлороформ – метанол – вода. В качестве вещества-маркера использовали гинсенозид Rg1. Детектирование в ТСХ обычно осуществляется с помощью серной кислоты или ее смесей с ароматическими альдегидами, например, ванилином или анисовым альдегидом. С применением оптического измерения плотности ТСХ также может быть использована для количественного анализа сапонинов в женьшене. Таким примером может служить работа [66]. Им удалось одновременно определять содержания 6 самых распространенных гинсенозидов с помощью ВЭТСХ в образцах *P. ginseng*. Автоматизированные ВЭТСХ системы для разделения, сканирования и определения гинсенозидов, а также идентификации видов их источников были созданы и введены в повседневную практику анализа [67]. Главными недостатками использования ТСХ и ВЭТСХ являются их низкая точность и воспроизводимость.

1.5.2 Определение компонентов женьшеня методом ГХ

ГХ применяют для разделения летучих веществ или нелетучих соединений, предварительно дериватизированных [45]. Чаще всего в ГХ используют капиллярные колонки из кварцевого стекла. Наиболее популярным видом детектирования является пламенно-ионизационное. Более эффективной является комбинация ГХ и МС для получения лучшей селективности и структурной информации. Стратегия ГХ анализа женьшеневых сапонинов заключается в гидролизе этих соединений перед триметилсилилированием их сапогенинов, чтобы упростить и улучшить чувствительность процедуры [68]. Таким образом, пробоподготовка является важнейшей частью ГХ анализа летучих компонентов женьшеня. Были предложены современные методы выделения летучих компонентов из матрицы, включая микроэкстракцию из твердого образца нагретым паром [69] и ввод без растворителя твердого образца с помощью термической десорбции [70]. Другим значимым применением ГХ стал анализ многоосновных пестицидов и их метаболитов в образцах женьшеня. Предложены способы скрининга пестицидов в порошках женьшеня, экстрактах и препаратах на их основе [71, 72, 73]. Для того чтобы сделать метод ГХ более эффективным, следует использовать автоматизацию и комбинировать его с времяпролетной МС высокого разрешения [73]. С помощью ГХ также возможно определять и другие активные компоненты, например, сесквитерпены и полиацетилены [74, 75] и рассчитывать

содержание фенольных соединений в форме триметилсилильных производных [76]. Кроме того, ГХ используют для обнаружения эндогенных метаболитов в биопробах при терапевтическом воздействии женьшеня [77]. В последние годы наблюдается спад популярности ГХ методов анализа, что отражается в уменьшении числа публикации новых подходов. Поскольку сложные паттерны женьшеневых сапонинов не удается определить с помощью ГХ, данный метод редко применяется в исследованиях женьшеня.

1.5.2 Определение состава женьшеня методом мицеллярной электрокинетической хроматографии

Гинсенозиды присутствуют в растворе в виде незаряженных молекул, поэтому капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) не применим для их определения. Таким образом, мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) и микроэмульсионная ЭКХ (МЭЭКХ) применяются для разделения нейтральных женьшеневых сапонинов. В МЭКХ состав подвижной фазы (буфера) может быть обращен или изменен для более быстрого и эффективного разделения [78]. В сравнении с МЭКХ присутствие несмешивающейся с водой масляной фазы в каплях микроэмульсии в МЭЭКХ дает возможность проявления специальных свойств подвижной фазы, например, улучшенной емкости растворения и расширенному миграционному окну [79]. Анализ сапонинов женьшеня методом капиллярного электрофореза (КЭ) может быть осуществлен путем концентрирования аналитов из образцов женьшеня, изменения состава буфера, модифицирования поверхности капилляра и применения различных детекторов [80]. В методах МЭКХ и МЭЭКХ концентрационные пределы обнаружения весьма высоки из-за небольшой длины миграции аналитов и маленьких объемов вводимой пробы. Для того чтобы улучшить чувствительность МЭКХ были разработаны способы on-line концентрирования образца. Так разработан способ усиленного полем on-line введения образца с обратными мигрирующими мицеллами для разделения 10 гинсенозидов из *P. notoginseng* [81]. Разделение сапонинов женьшеня проходило за 35 мин, что быстрее 65 мин в методе ВЭЖХ. Чувствительность была на порядок выше, достигнутой методом [82], что позволило детектировать два менее распространенных гинсенозида Rh1 и Rg2. Разработан on-line способ [83] двойного элюирования, основанный на использовании боратных

комплексов и улучшенном составе органического растворителя с усиленным полевым эффектом, предварительным концентрированием гинсенозидов Rf, Rg1, и Re, их МЭКХ в составе неионных мицелл на основе эфира полиоксиэтилена и додециловой кислоты. Таким образом, была показана возможность комплексообразования и элюирования ацетонитрилом в неионной МЭЭКХ для гинсенозидов Rf, Rb2 и Re с использованием микроэмульсий [71]. Ввод с помощью давления и электрокинетический ввод образцов из длинных цилиндров также применяли для одновременного концентрирования нотогинсенозида R1 и гинсенозидов Rg1, Rf, Rh1, Rd, Rg3 в МЭЭКХ [84]. Наблюдалось 50-200 кратное увеличение чувствительности. Несмотря на создание новых методик, метод КЭ находит ограниченное применение в анализе женьшеня. Одним из примеров может служить применение КЭ микрочипа в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для анализа коротких tandemных повторяющихся участков при быстрой аутентификации видов женьшеня [80]. Большинство таких приложений белкового анализа создается для объяснения механизмов биологического действия женьшеня.

1.5.3 Определение состава женьшеня методом ВЭЖХ в сочетании с различными способами детектирования

В комбинации с ВЭЖХ при определении гинсенозидов используют УФ и диодноматричное детектирование (ДМД). УФ детектирование также применяют в сочетании с КЭ. УФ детектирование, благодаря своей простоте и низкой стоимости анализа, используется во многих фармацевтических лабораториях. Из-за слабого УФ поглощения гинсенозидов их детектирование обычно осуществляют на длинах волн в диапазоне 198–205 нм [85, 86]. Слабое поглощение также является причиной низкой чувствительности из-за большого перекрытия спектра с другими соединениями, которые имеют сильное поглощение в коротковолновой области. Выбор подвижных фаз и модификаторов также ограничен. В отличие от УФ, ДМД более распространено в современных лабораториях, поскольку позволяет проводить одновременное детектирование на разных длинах волн, одновременно фиксируя спектры для отдельных хроматографических пиков, что помогает проверить чистоту любого пика [88]. УФ и ДМД применяют для количественной оценки содержания женьшеневых сапонинов в экстракте и биопробах, так как эти способы детектирования отличаются высокой точностью и

воспроизводимостью. В последнее время, часто УФ (ДМД) детектирование применяется последовательно с МС. Такие подходы используются для быстрого получения о качественном и количественном составе образцов женьшеня.

Основным недостатком проведения анализа женьшеня с помощью УФ детектирования является относительно высокий уровень фона и шума [89,90]. ИДСР является универсальным методом детектирования, при котором наблюдается стабильная базовая линия даже с использованием градиентного элюирования [89]. Более того, с применением летучих веществ, например HCOOH и CH₃COOH, в качестве модификаторов подвижной фазы можно добиться лучшей селективности [90]. С помощью ИДСР можно определять такие соединения, как 24(R)-псевдогинсенозид F11, в структуре которого нет хромофорных групп [89]. При использовании ИДСР следует оптимизировать такие параметры, как скорость подачи газа-распылителя и температуру трубки дрейфа детектора [91,92]. Обычно чувствительность ИДСР детектирования оказывается в 5 раз ниже, чем УФ детектирования, минимальные определяемые концентрации находятся в диапазоне 100–200 нг гинсенозидов на колонку [93, 89]. С помощью ВЭЖХ-ИДСР проводили мониторинг на содержание 12 гинсенозидов в *P. quinquefolius* [93]. Также 14 гинсенозидов в красном *P. ginseng* [94] и 19 гинсенозидов в черном женьшене [95]. Химический состав трех лекарственных растений из рода *Panax* был установлен с помощью ВЭЖХ-ИДСР [90]. Качественный анализ *P. quinquefolius* двумя методами (УФ и ИДСР) показал аналогичные результаты, однако УФ детектирование было неприменимо для определения псевдогинсенозида F11 [89,29]. Учитывая вышеизложенное, следует отметить, что из-за лучшей чувствительности, простоты и доступности УФ по-прежнему рекомендуется использовать в рутинном анализе образцов, содержащих женьшень.

ВЭЖХ определение гинсенозидов также можно проводить с флуоресцентным детектированием. Так, флуоресцирующие аналиты получены в работе [96] после предколоночной дериватизации двойной связи C24–C25 в молекулах гинсенозидов путем озонлиза с последующей реакцией с 9-фторметоксикарбонилем гидразина. При использовании ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием пределы обнаружения для Rg1 и Rb1 были определены, как 2.5 и 0.9 пмоль/л соответственно. После добавки в сыворотку этих соединений проведен

количественный анализ; степени извлечения после сорбционного концентрирования составляли 72–80%. Также альтернативой УФ, ИДСР и МС служит импульсное амперометрическое детектирование, которое успешно сочетается с ВЭЖХ [97]. Пределы обнаружения для данного подхода могут быть на уровне 0.02–0.10 нг/г. Кроме того, этим способом возможно легко определить суммарное содержание гинсенозидов. Полярные и неполярные гинсенозиды разделяли на сорбенте с привитыми группами C18.

Детектирование заряженных частиц в аэрозоле (ЗЧАД) используют в качестве альтернативы ИДСР для детектирования веществ со слабым УФ поглощением или при отсутствии стандартов для определяемых компонентов. И ЗЧАД и ИДСР дают отклик в зависимости от массы вещества, который не меняется из-за спектральных или физико-химических свойств аналита. Таким образом, становится возможным введение универсального калибровочного стандарта, поскольку данная технология позволяет получать постоянные факторы отклика для любого определяемого вещества или примеси [98]. Основным преимуществом ЗЧАД по сравнению с ИДСР является большая чувствительность, ширина динамического интервала измерений, простота использования и постоянство факторов отклика детектора. Разработанный метод ВЭЖХ-ЗЧАД [99] определения нотогинсенозида R1, гинсенозидов Rg1, Re, Rb1, Rg2, Rh1 и Rd был опробован на 30 последовательностях образцов *P. notoginseng*. Чувствительность ЗЧАД была выше по сравнению с ИДСР и УФ детектированием. В работе [100] было проведено сравнение ЖХ-ЗЧАД, ЖХ-ИДСР и ЖХ-УФ методов определения гинсенозидов Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rb3 и Rd в *P. ginseng*. Ограничениями ЗЧАД являются необходимость применения летучих буферных растворов, низкая летучесть определяемых компонентов и наличие зависимости между откликом детектора и составом элюента.

Наибольшее распространение при решении задачи определения выбранного набора гинсенозидов получил метод ВЭЖХ с МС детектированием. Так, например, для определения гинсенозидов Rg1 и Rb1 в плазме крови человека разработан способ, основанный на ВЭЖХ-ИЭР-МС [101]. Разделение гинсенозидов проводили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (колонка с сорбентом C18; 100 × 2.1 мм), а МС детектирование в режиме регистрации отрицательно

заряженных ионов. Режим регистрации выбранных ионов использован для количественной оценки содержаний этих гинсенозидов, используя ионы с m/z 1107.6 для гинсенозида Rb1, с m/z 799.4 для гинсенозида Rg1 и с m/z 385.2 для внутреннего стандарта – 3',4',5'-триметокси-7-карбометокси флавона. Диапазон линейности для данных соединений составил 2 порядка от 10 до 1000 нг/мл, и соответствующая минимальная определяемая концентрация – 10 нг/мл плазмы. Для отчистки образцов от белковой фазы использовались сульфат цинка и ацетонитрил. Данный подход успешно применили в фармакокинетическом исследовании гинсенозидов Rb1 и Rg1 после орального приема испытуемыми людьми коммерческих препаратов на основе женьшеня. Другим примером применения этого метода является одновременное определение гинсенозида Rg3 и его метаболитов: гинсенозидов Rg1, Rg2, F1, Rh1 и ППТ в моче испытуемых [102]. Пробоподготовка образцов мочи включала сорбционное концентрирование, а разделение проводили в градиентном режиме с использованием смеси метанола и ацетонитрила с добавкой 0.05% муравьиной кислоты. Диапазон линейности от 0.05 до 20 нг/мл. Не удалось обнаружить только гинсенозид Rg2, остальные метаболиты в образцах мочи присутствовали. В искусственных условиях доказано [103], что гинсенозид Rh2 и ППД являются продуктами гидролиза гинсенозида Rg3. Для этого использовали МС детектирование на приборе с квадруполь-времяпролетной системой с ИЭР, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. На полученных масс-спектрах наибольшей интенсивностью обладали ионы, соответствующие потере одного и двух сахаридных остатков соответственно. Однозарядный ион депротонированной молекулы глюкозы с m/z 161 присутствовал в масс-спектрах как гинсенозида Rg3, так и Rh2. Другой подход на основе метода ВЭЖХ-МС предложен для одновременного определения гинсенозида Rg1, его вторичного производного гинсенозида Rh1 и их сапогенина – ППД в плазме крови крыс, для изучения фармакокинетического поведения Rg1 после его введения в кишечник и внутривенного введения [104]. После сорбционного концентрирования и ВЭЖХ разделения в масс-спектрах образцов присутствовал ион молекулярного аддукта гинсенозидов Rg1, Rh1 и ППТ с хлором $[M+Cl]^-$, они использованы в дальнейшем при регистрации выбранных ионов. Пределы обнаружения были на уровне 20 пг/г для Rg1, 100 пг/г для Rh1 и 10 пг/г для ППД. Хроматографическое

разделение достигалось менее чем за 8 мин. Аналогичный подход на основе метода ВЭЖХ-МС/МС с сорбционным концентрированием был создан для определения гинсенозидов Rh4 и Rk3 в плазме крови крыс [105]. После аттестации методики авторам удалось установить, что при оральном введении дозы 20 мг/кг определяемых веществ не удавалось их обнаружить в плазме, однако при внутривенном введении уже 5 мг/кг наблюдалось значительное присутствие их в плазме крови. ПО на уровне 10 нг/мл. Метод ВЭЖХ-МС/МС использовали для определения гинсенозида Re и его метаболитов в экскрементах крыс [106]. Для детектирования выбраны следующие ионные переходы m/z 945→475 для гинсенозида Re, 799→637 для гинсенозида Rg1, 783→475 для гинсенозида Rg2, 637→475 для гинсенозида Rh1 и F1, 475→391 для ППТ, и 779→641 для внутреннего стандарта (дигоксина). Суммарное содержание гинсенозидов в экскрементах в течение 24 ч с момента орального введения дозы в 200 мг/кг составило порядка 50% от введенного. Основным продуктом метаболизма гинсенозида Re был гинсенозид Rg1. Таким образом, масс-спектрометрическое детектирование в комбинации с ВЭЖХ представляется наиболее удобным и универсальным методом определения гинсенозидов как в экстрактах из растительного сырья и продуктах на их основе, так и в биологических образцах при исследовании метаболизма и фармакокинетики.

Идентификация или подтверждение идентичности аналита – первый и важнейший шаг для создания метода количественного анализа. Такую информацию можно получить на ионной ловушке или гибридном масс-спектрометре. Кроме того, масс-спектрометрия высокого разрешения дает детализированную и точную информацию о структуре вещества, в основном о составе неизвестных продуктов разложения или метаболитов гинсенозидов, поэтому может служить референтным методом определения этих веществ [107]. Предложенный авторами паттерн фрагментации молекул гинсенозидов часто используется другими исследователями в этой области (рис. 3).

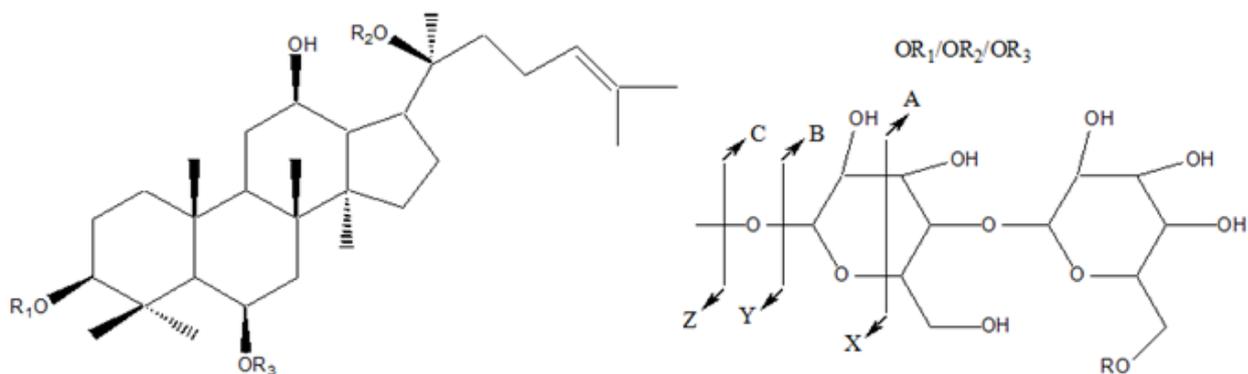


Рис. 3. Номенклатура фрагментов молекул гинсенозидов.

В ячейке соударений первое расщепление связей наблюдается при атоме С20 (рис. 2), если там находится сахаридный заместитель, который и обозначают α -цепью. Позиции С3 и С6 оказались, соответственно, местом присоединения β -цепей. Буквами Y и Z были обозначены ионы, с зарядом непосредственно на основной структуре гинсенозида, а буквами B и C ионы дополнительные к Y и Z, соответственно. Ион Y получается в результате потери гексозы или дезоксигексозы, а ион Z – при полной потере сахараида. Кроме того, фрагментные ионы A- и X-типа получают при расщеплении сахаридного остатка, напрямую присоединенного к сапогенину. Изучение структур гинсенозидов Rb1 и Rb2 с помощью ИЭР-МСⁿ (на ионной ловушке) также успешно проведено с учетом этой схемы фрагментации [108]. В положительном режиме регистрации ионов наиболее интенсивными оказались аддукты сапонинов $[M+Na]^+$, образующие фрагментные ионы (Y-, Z-, B- и C-типа), что давало информацию об основной последовательности и ответвлениях в случае заместителей-моносахаридов, объединенных в олигосахаридные цепочки. Ионы A- и X-типа давали информацию о связях внутри сахаридных остатков. В отрицательном режиме регистрации ионов наиболее интенсивными были молекулярные ионы $[M-H]^-$, которые давали только небольшое число ионов Y- или B-типа и не давали ионов A- и X-типа из-за внутренней энергии ионов предшественников $[M-H]^-$. Этот подход может быть использован для определения структуры недериватизированных гинсенозидов в растительных экстрактах из лечебных трав, что позволяет не проводить трудоемкой дериватизации сапонинов для их полного разделения [109]. Используя ИЭР-МС/МС, удалось различить и идентифицировать три пары изомерных

гинсенозидов (Rg2 и Rg3, Rg1 и F11, Rd и Re) благодаря точному измерению масс в МС и МС/МС режимах. Оказалось, что для фрагментации в ячейке соударений лучше использовать аддукты гинсенозидов с литием $[M+Li]^+$, чем $[M+H]^+$ или $[M+Na]^+$. В спектре фрагментов ионов $[M+Li]^+$ наиболее интенсивными оказались ионы Z (отвечающие потере сахаридов) и соответствующие ионы C (ионы сахаридных заместителей). Детектирование и интерпретация Z и C ионов позволяла провести идентификацию в парах изомерных гинсенозидов, т.е. Rg2 и Rg3, Rg1 и F11, Rd и Re. Ионы [сахарид+Li]⁺ наблюдались для Rg2 и Rg3 с m/z 333 и 349, соответственно, что свидетельствовало о присутствии двух видов дисахаридных заместителей (т.е. глюкозо-рамнозного и глюкозо-глюкозного). Исследование метаболизма гинсенозидов также проводят с помощью квадруполь-времяпролетных систем. Так, основные метаболиты нотогинсенозида R1, гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rd выделены из желчи крыс с помощью процедуры микродиализа [110]. Эти метаболиты, гинсенозиды Rg2, Rh2 и компонент K, детектировали на квадруполь-времяпролетном масс-анализаторе с помощью динамического варьирования энергии фрагментации.

1.5.4 Определение состава женьшеня методом ИФА

ИФА представляет собой биохимический тест для измерения концентрации аналита, основанный на реакции антитела и антигена. Обычно используют МКАТ. Основными преимуществами ИФА являются простота осуществления ферментативного исследования, а также высокая селективность и чувствительность. Способ количественной оценки содержания гинсенозидов создан на основе метода ИФА [54]. Гинсенозиды, разделенные с помощью смеси ацетонитрил:вода:уксусная кислота на пластине ТСХ, переносили на полиэтилсульфоновую мембрану, обрабатывали раствором иодида натрия и, затем, альбумином из бычьей сыворотки (БСА), таким образом образовывался конъюгат гинсенозид-БСА на полиэтилсульфоновой мембране. Сахаридные заместители гинсенозидов при этом окислялись $NaIO_4$ до соответствующих диальдегидов, которые, затем, вступали в реакцию с аминогруппами лизина или аргинина в БСА, создавая прочную связь с мембраной. После этого мембрану обрабатывали анти-G-Rb1 антителом и еще одним антителом, меченым пероксидазой, направленным на противодействие первому антителу. Наконец, связанный фермент вступал в

реакцию с пероксидазным субстратом, что приводило к окрашиванию мембраны, что, в свою очередь, позволяло провести количественный анализ по степени окрашенности областей мембраны. Предел одновременного индивидуального обнаружения гинсенозидов Rb1, Rc, Re, Rg1 и Rd на уровне 60 нг/г. Диапазон определяемых содержаний для этих трех соединений от 0.125 до 2.0 мкг/г. Кроме того, этим методом удалось идентифицировать чикасетсапонины III и IV в *P. Japonicas* [59]. Чувствительный и селективный метод с использованием связанного фермента на иммуносорбенте разработан для определения 20(S)-ППТ, одного из основных сапогенинов гинсенозидов [111]. Антитела (действующие против конъюгата гинсенозид F1-альбумин) продемонстрировали практически полное отсутствие реакции на другие гинсенозиды и ППД. Рабочий интервал концентраций от 50 пг/мл до 20 нг/мл, и количественная оценка совпала со сделанной методом ВЭЖХ. Основными недостатками ИФА являются сложность приготовления МКАТ, высокая кросс-реактивность близких структурных аналогов, небольшие динамические диапазоны определяемых содержаний.

1.5.5 Определение состава женьшеня методом многомерной хроматографии

Эффективность и разрешение пиков в традиционной одномерной хроматографии в некоторых случаях оказывается недостаточной. Для проведения таких анализов используют 2-D хроматографию. В этом методе образец пропускают через первую разделяющую колонку, а затем разделенные вещества подвергают второму независимому разделению другим методом. Для сложных смесей, например экстрактов из женьшеня многомерная хроматография позволяет получить лучшее разделение, большую емкость и чувствительность в сравнении с одномерной хроматографией. В многомерной хроматографии, кроме того, могут быть соединены методы ТСХ и ГХ. В случае ЖХ создание многомерных способов разделения осложнено из-за проблем с переключением потока и состава подвижной фазы из одной системы в другую [112]. Разработан метод 2-D газохроматографического определения качественных различий между экстрактами из растительного материала нескольких видами из рода *Panax* [75]. С помощью данного метода удалось обнаружить множество общих компонентов и соединений, специфичных для разных видов. В работе [113] описана 2-D ГХ

методика для определения химического состава летучих масел в растении *P. ginseng* на разных стадиях роста. В двумерной хроматографии могут появляться артефакты, кроме того, полярные и нелетучие растворители не следует использовать в составе подвижной фазы, и времена анализа оказываются достаточно велики.

1.6 Групповая идентификация и определение метаболических профилей

Концепция групповой идентификации гинсенозидов изложена в европейской фармакопее [114] и использована с незначительными изменениями во многих исследованиях [39, 41, 115]. Этот метод основан на ВЭЖХ: колонка C18, подвижная фаза вода:ацетонитрил, в режиме градиентного элюирования, с УФ детектированием при 203 нм. Данный метод позволял разделить гинсенозиды Rg1, Rf, Re, Rd, Rc, Rb2 и Rb1 (по порядку элюирования). Также описан улучшенный метод анализа для определения 12 гинсенозидов [86], основанный на сорбционном концентрировании с последующим ВЭЖХ-УФ детектированием. В этом варианте метода программа градиентного элюирования позволяла разделить гинсенозиды Rg2, 20(R)-Rg2 и Rh1 на колонке C18 (150 × 4.6 мм). Хорошее разделение получено для всех исследуемых гинсенозидов: Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg2, 20(R)-Rg2, Rg3, Rh1 и Rh2. Тот же метод использовали для анализа листьев и ягод американского женьшеня, а также для измерения различия содержаний сапонинов в ягодах женьшеня до и после термообработки [88]. После паровой обработки (100–120°C в течение 1 ч, и 120°C от 0.5 до 4 ч), содержание семи гинсенозидов (Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rb3 и Rd) уменьшилось, а содержание пяти остальных (Rh1, Rg2, 20(R)-Rg2, Rg3 и Rh2) увеличилось. Согласно экспериментам с использованием клеточных культур, обработка ягод женьшеня паром приводила к увеличению содержания гинсенозида Rg3, который оказывает эффективное влияние на рост колоректальных раковых клеток. ВЭЖХ-ДМД использовали для одновременного определения гинсенозидов и полиацетиленов в корнях американского женьшеня [116]. Гинсенозиды Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Ro, малонил-Rb1, малонил-Rc и малонил-Rd, и полиацетилены фалкаринол и панаксадиол были разделены. Используя этот метод, содержания полиацетиленов и гинсенозидов определяли в корневых отростках, боковых и основных корнях 6-ти

летнего растения женьшеня. Общие средние содержания гинсенозидов и полиацетиленов в корневых отростках оказались значительно выше, чем в основном корне. Применяя градиентное элюирование смесью ацетонитрил:вода:изопропанол на обращенно-фазовой аналитической колонке с аминными связями, удалось разделить гинсенозиды Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3 и Rh1 [23]. Детектирование в элюате осуществлялось с помощью ИДСР и пределы обнаружения оказались на уровне 35–155 нг/г.

Более типичным является применение ВЭЖХ-МС для групповой идентификации гинсенозидов. Так, 25 гинсенозидов разделены с помощью градиентного элюирования на колонке C18 [117]. В качестве подвижной фазы выступала смесь 8 мМ ацетата аммония (рН 7) и ацетонитрила. Детектирование в элюате проводили с помощью ИДСР и ионной ловушки (МС-детектирование). В масс-спектрах простых сапонинов присутствовал сигнал депротонированной молекулы $[M-H]^-$, и ее аддуктов $[M+AcO]^-$ и $[M-CH_2O+AcO]^-$, и сильные сигналы двухзарядных аддуктов, например $[M-H+AcO]^{2-}$ и $[M+2AcO]^{2-}$. А спектры малонил-замещенных гинсенозидов из-за термической нестабильности содержали помимо ионов $[M-H]^-$, ионы $[M-CO_2-H]^-$, $[M-CO_2+AcO]^-$, $[M-CO_2-H+AcO]^{2-}$ и $[M-CO_2+2AcO]^{2-}$. МС/МС спектры для простых сапонинов соответствовали обычным паттернам фрагментации подобных соединений с последовательной потерей сахаридных остатков, в то время как спектры малонил-замещенных гинсенозидов содержали интенсивные сигналы, соответствующие потере малонил радикала. В работе [118] даны относительные интенсивности ионов $[M-H]^-/ [M+OAc]^-$, $[M-2H]^{2-}/ [M-H+2OAc]^{2-}$ и $[M-H+OAc]^{2-}/ [M+OAc]^{2-}$, и показано, как различия в этих интенсивностях связаны со структурой гинсенозидов, что может быть использовано для идентификации изомеров, а именно Rf, F-11 и Rg1, Rd и Re, Rb2 и Rc. Метод ВЭЖХ с ДМД и ИЭР-МС детектированием применяли для анализа экстрактов из азиатского и американского женьшеней [119]. Разработанный способ подходил для разделения и одновременного определения основных найденных гинсенозидов в охлажденных льдом спиртовых экстрактах. Этот способ также подходит для обнаружения других соединений, которые часто встречаются в таких экстрактах из корня женьшеня. Более того, данный метод может быть применен для разделения и определения

продуктов гидролиза гинсенозидов, например, тех, которые получаются в условиях, имитирующих переваривание в желудке, включая те, которые используются для исследований процесса пищеварения (т.е. 0.1 М соляная кислота при 37°C).

Для проведения контроля качества обычно используется метод ВЭЖХ-МС/МС. Например, для анализа препарата Shenmai [120]. Shenmai – популярное медицинское средство в традиционной медицине, используемое для лечения кардиомиопатии, инфаркта миокарда и гипертензии, и изготавливаемое из красного женьшеня и офиопогона. С помощью ВЭЖХ-МС обнаружено 39 гинсенозидов, содержащихся в этом лекарственном средстве. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов большинство найденных гинсенозидов, кроме малонил-гинсенозидов, давали масс-спектр, содержащий молекулярные ионы $[M-H]^-$ и ионы аддуктов $[M+Cl]^-$ и $[M+AcO]^-$. Иногда появлялись сигналы $[2M-H]^-$ ионов. Термически нестабильные малонил-гинсенозиды давали $[M-CO_2-H]^-$ и $[M-CO_2+Cl]^-$ ионы (несмотря на то, что авторы не использовали хлоридсодержащих растворителей). Некоторые соединения с одинаковой молекулярной массой удалось идентифицировать, основываясь на характеристичных сигналах, соответствующих потере глюкозы и рамнозы, в МС/МС спектрах. Другой препарат, отвар Sijunzi, изготавливают из корней *P. ginseng*, *Poria cocos*, *Atractylodes macrocephala* и *Glycyrrhiza uralensis*. Метод ВЭЖХ-МС использовали для идентификации трех классов активных компонентов, входящих в состав этого лекарственного средства, а именно, гинсенозидов (из женьшеня), флавоноидов и тритерпеноидов (из *G. Uralensis*) [121]. Гинсенозиды давали аддукт с натрием в масс-спектрах. А потеря нейтральных масс 194 и 176 оказалась характеристичной особенностью тритерпеноидных МС/МС спектров. Соотношения концентраций основных активных компонентов растительного сырья (отдельно *P. ginseng* и *G. uralensis*) были отличны от тех, которые определены в отваре Sijunzi, что свидетельствовало о том, что процесс варки влиял на состав конечного продукта.

Кроме ИЭР некоторые исследователи использовали также и химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД), которая считается подходящим методом ионизации для слабо полярных и стабильных веществ. Кроме того, ХИАД

предполагает использование больших скоростей потоков подвижной фазы, что делает ее лучше совместимой с жидкостной обращенно-фазовой хроматографией, чем ИЭР. В дополнение к этому, ХИАД предполагает использование испарения при высокой температуре, что способствует лучшему МС детектированию лабильных гинсенозидов. Удалось успешно идентифицировать 35 гинсенозидов в *P. ginseng* методом ВЭЖХ-ХИАД [122]. Кроме того, ВЭЖХ-ХИАД позволял одновременно определять 10 основных биологически активных компонентов *Naodesheng*, включая саффлоровый желтый А, пауэрарин, дайдзеин, гинсенозиды (Rg1, Rg2, Rb1, Rd, Re, Rh1) и ногогинсенозид R-1. Разделение проводили на колонке C18 с многоступенчатым градиентным элюированием смесью 0.1% муравьиной кислоты и метанола. Наименьшие определяемые концентрации лежали в диапазоне от 0.02 до 0.2 нг/г [123].

Новая стратегия групповой идентификации гинсенозидов в растительном сырье предложена в работе [8]. Из растений *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* и *Panax notoginseng* выделено более 620 гинсенозидов, из которых более 400 ранее не были описаны в литературе, для их выделения и очистки использовали экстракцию этанолом, гексаном и метанолом, а разделение проводили методом последовательной двумерной хроматографии на колонках с неподвижными фазами на гелевой основе и силикагелевой матрице. Детектирование проводили методом МСⁿ на ионной ловушке. Подтверждение предложенных структур гинсенозидов проводили методами МС-высокого разрешения и ЯМР. Таким образом, растительные материалы, лекарственные средства, чай и другие продукты на основе женьшеня могут содержать большое число близких по структуре активных компонентов (гинсенозидов). Фрагментация этих веществ как в положительном, так и в отрицательном режиме регистрации сигналов достаточно хорошо изучена, и, применяя методы масс-спектрометрии высокого разрешения и информационно-зависимого сканирования на ионной ловушке, можно дифференцировать некоторые изомерные гинсенозиды.

Получение метаболических профилей является одним из краеугольных камней в системе биологического анализа, и множество исследований проводится с целью развития методологии сбора информации, интерпретируемой с точки зрения биологии. На настоящий момент ЯМР и ВЭЖХ-МС наиболее часто используются

для получения характеристических метаболомных профилей. ЯМР используют особенно часто для идентификации метаболитов в клинических образцах [124], так как данный метод позволяет одновременно определять все протонсодержащие соединения в образце. В этот перечень попадает большинство органических соединений, например углеводороды, аминокислоты, органические и жирные кислоты, амины, эфиры и жиры. ЯМР спектры неотчищенных экстрактов из растительного сырья теоретически могут быть достаточно характеристичными, даже не смотря на перекрывание большинства сигналов метаболитов, присутствующих в растворе. Этот метод не требует сложной пробоподготовки, прост в исполнении, отличается хорошей воспроизводимостью и высокой степенью достоверности интерпретации результатов. Прямой ЯМР анализ способом «отпечатков пальцев» позволяет обеспечивать контроль качества и аутентификацию материалов на основе различных видов женьшеня, разного возраста и места произрастания. Используя, значения химических сдвигов и сравнивая константы в спектре протонного магнитного резонанса (ПМР), можно идентифицировать различные компоненты женьшеня. Концентрации каждого из компонентов образца можно определить, путем интегрирования сигналов из спектра без построения градуировочных зависимостей [125]. С помощью многомерного ЯМР анализа можно различить сигналы даже в сложных спектрах [126]. Сигналы, соответствующих протонов из сахаридных и метил заместителей в женьшеневых сапонидах, полученные из ПМР спектра с применением метода главных компонент и кластерного анализа, позволяли определять географический регион и возраст образцов корней *P. ginseng* [127, 128]. Для того чтобы отличать друг от друга образцы экстрактов из *P. ginseng* и *P. quinquefolius*, белого и красного женьшеня проводили двумерный ЯМР анализ с применением метода главных компонент для обнаружения важных маркеров: гинсенозидов, сахаров, аминокислот, фумаровой кислоты и инозитола [129]. Прямой ЯМР анализ также применяют для мониторинга изменений химического состава женьшеня содержащих смесей. Наиболее значимым недостатком этого метода является его низкая чувствительность – он не подходит для выявления небольших изменений состава образца и следового анализа.

Хотя ЯМР и другие спектроскопические методы позволяют получать информацию о большом числе метаболитов, для более детального анализа метаболома лучше использовать хроматографические процедуры. Разработки в этой области позволили расширить спектр соединений метаболома и, что особенно важно, дают возможность идентифицировать эти новые метаболиты. Например, в работе [64] использовался метод ВЭТСХ для получения характеристических профилей для подтверждения подлинности образцов различных видов женьшеней, в рамках контроля качества препаратов на основе женьшеня. Однако в сфере изучения метаболомики наибольшее значение имеют способы ВЭЖХ-МС анализа. Это обусловлено лучшей эффективностью хроматографических систем (например, нано-ВЭЖХ, ультра-ВЭЖХ) и их сочетанием с масс-спектрометрией (высокого разрешения, высокой скорости сканирования и т.д.). Разработки в этой области позволили расширить спектр соединений метаболома и, что особенно важно, дают возможность идентифицировать эти новые метаболиты. Для идентификации первостепенную важность имеет определение элементного состава метаболита. Такое определение можно сделать, только основываясь на данных высокой точности о массе метаболита, масса должна быть определена с точностью до 5 миллионных долей. Масс-спектрометры ион-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием, принадлежащие к последнему поколению, дают возможность измерить массу с точностью намного лучше 5 миллионных долей (обычно с точностью до 1 миллионной доли), что дает возможность инвариантного определения элементного состава. С точки зрения практичности метода, необходимо отметить, что столь точное определение массы можно производить с привязкой к хроматографической шкале времени и без внутренней калибровки [130]. Сравнение результатов анализа женьшеня методом масс-спектрометрии на приборах с ЛИЛ высокого разрешения, орбитальной ионной ловушкой (*Thermo Fisher*) и ион-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием приведено в работе [131]. Экстракт из женьшеня (экстракт из красного корейского женьшеня, разбавленный в 50% ацетонитриле с добавкой 1% уксусной кислоты до уровня концентрации 0.1 мг/мл; *Korea ginseng Corp.*, Тэджон, Корея) был введен напрямую в тандемный ЛИЛ масс-спектрометр ион-циклотронного резонанса. На усредненных спектрах были видны многозарядные ионы. Идентификацию

некоторых гинсенозидов проводили по заранее выбранным сигналам, соответствующих их аддуктам с натрием, по их точному значению массы (табл. 2), кроме того были видны сигналы с m/z 337.1720 и 499.2247, которые соответствовали двум соединениям из списка вторичных метаболитов женьшеня, аргинин-*N*-гликозиду и аргининдигликозиду, имеющим молекулярные формулы $C_{12}H_{24}N_4O_7$ и $C_{18}H_{34}N_4O_{12}$, соответственно [132], и их измеренные протонированные массы отличались на 0.80 и 0.23 миллионных долей от теоретических. Присутствие атомов азота в этих молекулах способствует процессу ионизации в наноспрее, что дает возможность получить интенсивные сигналы. Аргинин считается одним из основных азотсодержащих компонентов женьшеня, на него приходится около 60% всего аминокислотного азота и 13% от суммарного азота для корней трехлетнего женьшеня [133, 134]. Гинсенозиды, напротив, давали интенсивные сигналы в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. На спектрах присутствовало множество сигналов с точными массами, соответствующими различным гинсенозидам. Соответствующие сапонины, основанные на одинаковом сапогенине, но имеющие различный паттерн сигналов, связанных с наличием разных сахаридных заместителей, также было легко идентифицировать по спектрам.

Таблица 2. Точные молекулярные массы гинсенозидов и их основных ионов в положительном режиме регистрации масс-спектров высокого разрешения

Гинсенозид	Молекулярная масса	Молекулярная масса аддуктов с натрием $[M+Na]^+$	Молекулярная масса ионов $[M-H]^-$
Ra1	1210.6346	1233.6244	1209.6268
Ra2	1210.6346	1233.6244	1209.6268
Ra3	1240.6452	1263.6350	1239.6374
Rb1	1108.6029	1131.5927	1107.5951
Rb2	1078.5924	1101.5822	1077.5846
Rb3	1078.5924	1101.5822	1077.5846
Rc	1078.5924	1101.5822	1077.5846

Таблица 2. Точные молекулярные массы гинсенозидов и их основных ионов в положительном режиме регистрации масс-спектров высокого разрешения (продолжение)

Гинсенозид	Молекулярная масса	Молекулярная масса аддуктов с натрием $[M+Na]^+$	Молекулярная масса ионов $[M-H]^-$
Rd	946.5501	969.5399	945.5423
Rg3	784.4973	807.4871	783.4895
Rh2	622.4445	645.4343	621.4367
Rs3	826.5079	849.4977	825.5001
Rh1	638.4394	661.4292	637.4316
Rg1	800.4922	823.4820	799.4844
Rf	800.4922	823.4820	799.4844
Rg2	784.4973	807.4871	783.4895
Re	946.5501	969.5399	945.5423
F1	638.4394	661.4292	637.4316
Ro	956.4981	979.4879	955.4903
F4(Rg4)	766.4867	789.4765	765.4789
Rg5	766.4867	789.4765	765.4789
Rh3	604.4339	627.4237	603.4261
Rh4	620.4288	643.4186	619.4210
Rs4	808.4973	831.4871	807.4895
Rg6	766.4867	789.4765	765.4789
Rk2	604.4339	627.4237	603.4261
Rk1	766.4867	789.4765	765.4789
Rk3	620.4288	643.4186	619.4210
Rs7	662.4394	685.4292	661.4316
Rs5	808.4973	831.4871	807.4895

Например, гинсенозид Rh2 образован ППТ, с сахаридным заместителем в позиции 3. Обнулив базовую линию по основному m/z 641.433, удалось наблюдать сигналы производных Rh2 с дополнительной гексозой (+162.052 Да), двумя гексозами (+324.103 Да), двумя гексозами и пентозой (+456.144 Да), тремя гексозами (+486.155 Да), 2 гексозами и 2 пентозами (+588.183 Да) и тремя гексозами и одной пентозой (+618.194 Да). Авторы работы [132] сообщают о 136 различных гинсенозидах имеющих всего 62 уникальные комбинации элементов в своем составе. Дополнительная структурная информация может быть получена из экспериментов с применением тандемной масс-спектрометрии. Обычно предлагается использовать информационно зависимые режимы работы масс-спектрометров, например, когда выполняется первичное полное МС сканирование по временам пролета, чтобы получить точные массы первичных ионов, затем проводится вторичное сканирование по выбранным ионам, фрагментация которых проходит в режиме МС/МС в ЛИЛ. Обычно в таких спектрах наблюдаются сигналы, соответствующие характерной потере сахаридных остатков, что обеспечивает идентификацию сапонинов. Весь процесс получения таких спектров в приборе занимает около 6 секунд. Выбирая узкие интервалы масс, можно получить больше МС/МС спектров, однако, скорость сканирования позволяет пройти полный интервал сканирования (m/z 200–2000) в течение 1 минуты. Анализ того же экстракта на орбитальной ионной ловушке, которая считается новшеством в масс-спектрометрии, выглядел перспективным, с точки зрения того, что данная технология находит широкое применение в области анализа растительного сырья и продуктов на его основе. Этот метод сочетает высокое разрешение с хорошей чувствительностью, что позволяет получать спектры МСⁿ фрагментации («древа фрагментации») с высокой точностью определения масс. Данная технология исключительно полезна для выяснения структуры отдельных гинсенозидов. Для анализа соединений с одинаковой молекулярной массой необходимо сначала проводить процедуру разделения. Таким образом, обычно используется комбинация высокоэффективного разделения и МС детектирования высокого разрешения, при сочетании времяпролетных масс-спектрометров с нано-ВЭЖХ системами. Так в работе [132] в режиме регистрации положительно заряженных ионов был проведен анализ экстрактов из женьшеня описанным выше способом.

Ширина некоторых пиков составляла менее 10 секунд, а в масс-спектрах встречались как молекулярные и фрагментные ионы для гинсенозидов, так и многозарядные ионы, особенно характерные для спектров наиболее интенсивных пиков, соответствующих веществам, имеющим белковую природу. Однако идентификация всех пиков на хроматограмме оказалась затруднительной. Было обнаружено 9 различных изомерных гинсенозидов с элементным составом $C_{42}H_{72}O_{14}$ (точная масса 800.4922). Успешно разделить удалось лишь 5 из них, каждый из изомеров давал в спектре характерное изотопное расщепление молекулярного иона. В сравнении со способом прямого введения пробы, в спектрах пиков на хроматограмме ниже была интенсивность натриевых аддуктов, порядка нескольких процентов от интенсивности протонированного молекулярного иона. Сделав поправку на образование аддуктов, авторы работы оценили общее количество обнаруженных метаболитов в несколько сотен, построив соответствующую карту интенсивностей. Использование двумерной технологии высокого разрешения позволило получить очень малые и хорошо различимые точки на этой карте, плотность расположения этих точек была велика, что дает возможность в будущем расширить список до более полного метаболома. В этой связи необходимо предварительно разделять и концентрировать следовые количества редких метаболитов с помощью ВЭЖХ.

1.7 Альтернативные способы определения состава женьшеня

Анализ в фитохимии обычно проводят с помощью полярных фаз в ТСХ, ГХ и ВЭЖХ. Однако до сих пор наблюдается недостаток необходимых методик и технологий для оценки состава растительных экстрактов. Наиболее успешные из недавно предложенных альтернативных способов определения состава женьшеня приведены ниже. Спектроскопию отражения в ближней инфракрасной области в качестве такой альтернативы применяли для определения индивидуальных гинсенозидов и определения суммарного содержания этих веществ в *P. quinquefolius* [135]. Теоретически этот вариант спектроскопии имеет преимущества по сравнению с ВЭЖХ, например, в пробоподготовке и времени анализа. Выделение и разделение гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Ro, малонил-Rb1, малонил-Rb2, малонил-Rc и малонил-Rd из отростков и основных корней

проводили с помощью ВЭЖХ на колонке RP-18 с эндкеппингом, элюируемой смесью фосфатного буфера (pH 5.8) и ацетонитрила в градиентном режиме с промежуточным УФ детектированием при 203 нм. Спектры отражения записывали в интервале длин волн 400-2500 нм, и был сделан вывод о том, что данный вид спектроскопии можно применять как для определения основных гинсенозидов, Rb1, Re и малонил-Rb1, так и для оценки суммарного содержания гинсенозидов в американском женьшене. Кроме того спектроскопию отражения в ближней инфракрасной области с успехом применяли для оценки суммарного содержания сахара в китайском женьшене [136]. Использование метода калибровочного графика, основанного на применении метода наименьших квадратов (МНК) для количественной обработки результатов описанных выше экспериментов позволило добиться одинаковой точности с наиболее часто используемыми методами для анализа растительных материалов. Следовательно, предлагаемый способ применим для определения суммарного содержания сахара в китайском женьшене.

Рамановскую спектроскопию также использовали для оценки содержания полиацетиленов в корнях американского женьшеня [137]. Рамановский спектр свежего корня женьшеня содержал сигнал, характерный для полиацетиленовой группы (2237 см^{-1}), в то время как в спектре высушенного корня этот сигнал был сдвинут до, примерно, 2258 см^{-1} . Полученные данные хорошо коррелировали с информацией из спектров изолированных стандартов фалкаринола (2258 см^{-1}) и панаксадиола (2260 см^{-1}). Химический сдвиг полиацетиленовой группировки свидетельствует об изменении в молекуле, произошедшем из-за потери воды. Применение технологии рамановской спектральной картографии в анализе корней женьшеня позволило выяснить, что содержание этих двух основных полиацетиленов уменьшается с увеличением размера корня. Этот факт подтвердили и эксперименты с применением ВЭЖХ.

Использование биосенсоров, состоящих из биологического распознающего элемента, который находится в прямом контакте с преобразователем, также применимо в анализе биологически активных соединений. Биологические компоненты иммобилизуются на поверхности распознающего элемента, где они вступают в реакцию с определяемыми соединениями. Преобразователи регистрируют изменение какого-либо биологического параметра, например,

изменения массы, оптических свойств, температуры или протекания электрохимической реакции и преобразуют это изменение в электрический сигнал. Антиоксидантная способность женьшеневого чая оценена с помощью биосенсора, разработанного на основе супероксиддисмутазы [138]. Оптический биосенсор, основанный на лазерной технологии и оптически селективных волокнах, разработан для дифференциации женьшеня из опилок, который является фальсификатом, морфологически близким к диетическим продуктам на основе женьшеня, и американского с азиатским женьшенем [139]. Спектроскопический анализ проводили напрямую с использованием порошка высушенного корня, и в результате был получен характеристический интервал между 2000 и 600 см^{-1} , что и предлагалось использовать для различия между женьшенем и опилками, а также между американским и азиатским женьшенем.

1.8 Исследования метаболизма гинсенозидов

Лекарственные средства традиционной медицины представляют собой комплексные смеси, состоящие из первичных и вторичных производных компонентов различного растительного сырья. Обычно в состав таких лекарственных средств входят несколько биологически активных компонентов, которые отвечают за эффект препарата при лечении различных заболеваний. Для контроля качества препарата не достаточно простого группового анализа компонентов, и необходим более обширный подход, позволяющий составить полный метаболический профиль исследуемого образца. Несмотря на то, что такая задача полностью не решена, на данный момент, в аналитической химии, множество предложенных подходов представляют интерес, с точки зрения методологии, например: в последние годы значительного прогресса добились исследователи, использующие методы ЯМР и МС с повышенной разрешающей способностью и методы разделения, такие как ВЭЖХ и КЭ, из-за расширения доступности этих технологий для широкого круга пользователей. Кроме того, развиваются методы, основанные на биологической статистике, а именно на распознавании метаболических паттернов, так как метаболические профили различных групп образцов могут быть очень быстро идентифицированы, что облегчает определение и проверку подлинности присутствия определенных

метаболитов в и вне профиля образца, наконец, использование смежных приложений медицины и биологии, то есть, взаимоинтегрированных технологий генетики, протеомики, метаболомики, анализа клеточных матриц и путей трансформаций химических веществ как совместно, так и порознь [140]. Такой фундаментальный подход требует новой методологии, отличной от традиционного биоанализа, так как необходимо сконцентрировать внимание не на выбранных веществах, а на определении огромного профиля соединений (мРНК, протеинов и метаболитов) в исследуемом образце, основываясь на аналитическом принципе сбора и обработки информации. Далее полученные профили могут быть оценены путем многомерного анализа данных, они различаются по уровню мРНК, протеинов и метаболитов («фенотипу»), так можно провести их идентификацию. В фармакологическом исследовании такой подход нацелен на идентификацию новых биомаркеров и мишеней действия препаратов. Получение метаболических профилей является одним из краеугольных камней в системе биологического исследования, и множество исследований проводится с целью развития методологии сбора информации, интерпретируемой с точки зрения биологии. Подробно вопросы изучения метаболома растений рассмотрены в работах [141] и [142].

Метаболические пути гинсенозидов ППД и ППТ типов различны и, обычно, приводят к образованию гинсенозидов более простой структуры с отщеплением части сахаридных заместителей [143]. Идентификацию метаболитов гинсенозидов осуществляют методами тандемной масс-спектрометрии, как правило, на первой стадии эксперименты проводят на приборах с тандемным соединением жидкостного хроматографа с квадруполем и ионной ловушкой, а для подтверждения, на второй стадии эксперимента используют тандемные времяпролетные масс-спектрометры. Сравнение фрагментных ионов в режиме MS^n для исходных гинсенозидов и их метаболитов позволяет понять, какая часть молекулы подверглась химическому превращению, а какая часть осталась неизменной. В некоторых случаях проводят дериватизацию функциональных групп или выделение метаболитов из биопроб для последующего ЯМР исследования. Превращения гинсенозидов в процессе прохождения пищеварительного тракта также исследовали с использованием *in vitro* моделей,

например, создания кислотной среды, прибавления ферментов, кишечных бактерий и микроорганизмов [144, 145]. Из-за использования относительно высоких концентраций гинсенозидов, результаты этих исследований могут значительно отличаться от *in vivo* экспериментов [146]. Основные метаболические пути *in vivo* включают последовательное отщепление сахаридных цепей гинсенозидов кишечными бактериями [147, 148, 149]. Окисление кишечными и печеночными СУР450 ферментами – другой возможный путь метаболизма [150, 151, 152]. Окисление, обычно, происходит в боковой алифатической цепи при атоме углерода С17 [153]. Первичные метаболиты могут образовывать эфиры с жирными кислотами в печени и тканях, которые затем долго сохраняются в организме [154]. После орального применения экстрактов *P. notoginseng* на крысах, наиболее распространенными метаболитами в фекалиях крыс оказались ИН-901, Rg1 и F1 [147]. Сапогенины ППД и ППТ удалось обнаружить на низких уровнях концентраций в фекалиях и не удалось детектировать в плазме крови, желчи и моче [147]. После проверки капсул Ginsana G115 (содержащих 4% женьшеневых сапонинов) на добровольцах, ИН-901, Rh1 и F1 оказались наиболее распространенными метаболитами в системе кровообращения и выделяемыми с мочой [149]. В некоторых публикациях 20(S)- и 20(R)- гинсенозиды не разделяли [155-157, 151]. В немногих исследованиях сравнивали метаболизм и проводили фармакокинетические испытания 20(S)- и 20(R)-гинсенозидов [158]. Из-за отсутствия избирательности поглощения и метаболизма между различными компонентами, разные процессы проходят при употреблении одного гинсенозида и экстракта из женьшеня. Кроме того, метаболизм гинсенозидов может отличаться в зависимости от способа применения. Например, гинсенозид Rb1 оказывается наиболее распространенным метаболитом при внутривенном введении гинсенозидов Rd, а концентрация Rg3 оказывается наибольшей при его оральном применении [159].

Метаболомика служит инструментом для оценки лечебного потенциала и безопасности лекарственных растений, включая женьшень [77, 160-162]. С помощью метаболомики определяют биомаркеры и устанавливают диапазоны метаболического отклика на лекарственные растения. С использованием этой информации углубляют понимание болезней, их начало может быть предсказано, и

объяснена клиническая эффективность, безопасность и механизмы действия лекарственных трав. Основными аналитическими методами на службе у метаболомики являются ЯМР и МС. В результате метаболомных исследований получают многомерные объемы данных, которые необходимо визуализировать с помощью компьютерных программ, и применяют хемометрические и биоинформатические методы интерпретации этих данных. В случаях возникновения острого простудного состояния крыс прослеживали изменения в сети метаболического регулирования до и после введения гинсенозидов [77]. Полученные с помощью ГХ-МС метаболические профили мочи с применением многомерного статистического анализа данных продемонстрировали значимые отличия и подтвердили защитный механизм суммарного действия гинсенозидов. Во время метаболического регулирования и компенсации гомеостаза были выявлены несколько метаболических путей. Эффект гинсенозида Rg3 на метаболизм крыс, страдающих от опухолей печени, был изучен в работе [163]. Использовали ортогональное хроматографическое разделение на обращено-фазовых и гидрофильных сорбентах. Однократное применение высокой дозы Rg3 изменяло метаболический паттерн у больных раком крыс наблюдаемый в течение трех дней, было выявлено 17 кандидатов-биомаркеров этого процесса. В таких исследованиях необходимо интерпретировать сложный массив данных, полученный посредством аналитических методов. Одной из проблем является невозможность предсказать число метаболитов в исследуемой системе. Подробности механизмов действия, эффективность и безопасность компонентов женьшеня, на сегодняшний день, изучены не до конца.

Одним из направлений исследования метаболизма сапонинов женьшеня является изучения механизмов взаимодействия небольших молекул (гинсенозидов) и биомакромолекул (например, белков и ДНК) [164]. Чтобы отыскать среди гинсенозидов самые выгодные кандидаты для новых лекарственных средств, следует изучать механизмы и параметры (например, константы диссоциации) их связывания с биомакромолекулами. Предложены различные стратегии быстрого и систематизированного изучения взаимодействий небольших молекул с биомакромолекулами [164]. В большинстве исследований система состоит из одного гинсенозида связывающегося с одной макромолекулой. Используют

ВЭЖХ-МС с двумерной системой переключаемых в турбулентном режиме колонок [165]. Экстракт из женьшеня или отдельный гинсенозид помещают в раствор, содержащий целевую макромолекулу. На первой стадии хроматографирования с турбулентным потоком свободные соединения отделяют от аддукта белка и гинсенозида. Далее образовавшийся комплекс разрушают в реакционном капилляре с помощью диссоциации в растворе. Освобожденные в ходе реакции компоненты отделяют от биомолекул во время второго хроматографирования. В режиме *on-line* ВЭЖХ-МС используют для получения параметров сродства и структурной информации о биомолекулярном рецепторе [166]. Для этих целей проводят скрининговый поиск по библиотекам (например, в случае женьшеневых экстрактов) или классифицируют реагирующие части веществ на известные и неизвестные по библиотеке [164, 165]. Метод биологических «отпечатков пальцев» [167, 168] применяли для исследования связывания компонентов растительного сырья и целевых биомолекул, находящихся в связанной или в свободной формах, с помощью аффинной хроматографии. Биоактивные компоненты, вступающие в специфические взаимодействия с целевыми макромолекулами можно выделить из сложных смесей, приготовленных лекарственных растений. Разработаны [45] методы, содержащие комплексные модели для оценки связывания компонентов с биомолекулами в женьшеневых препаратах. Экстракты из растительного сырья разделяли на две основные фракции, а именно, фракции не связанные с проявлением биоактивных свойств и фракции, содержащие биоактивные компоненты. Далее последнюю фракцию исследуют методом ВЭЖХ-МС. После чего, можно извлечь структурную информацию и параметры связывания, каждого из обнаруженных соединений. Неплохой альтернативой могут служить недавно предложенные двумерные хроматографические системы с турбулентным потоком, соединенные *on-line* с ЖХ-МС для скрининга лигандов, связываемых различными белками [165]. Этот подход эффективен для хорошо изученных лигандов как с низкими, так и высокими значениями сродства к белковой фазе и для установления зависимостей между структурой лигандов и их активностью. Методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС/МС проводили поиск компонентов *P. notoginseng*, противодействующих агрегации тромбоцитов в крови человека [169]. Было

обнаружено 5 веществ, способных связываться с тромбоцитами человека, четыре из них были идентифицированы, как аденозин, гуанозин и гинсенозиды Rh1, F1. В работе [170] исследовали взаимодействие всех сапонинов из *P. notoginseng* с БСА с помощью ИК спектроскопии с преобразованием Фурье спектроскопии. Показано, что гинсенозиды реагировали с БСА посредством C=O и C=N групп полипептидной цепи. Образование связей гинсенозидов с белком приводило к сильному искажению спиральной структуры и изменению тирозиновых остатков в белке. Сравнение эффекта 5 различных видов женьшеня на содержание дигоксина в сыворотке крови, измеренное методом ИФА показало [171], что антитела дигоксина могут связываться аналогами, содержащимися в женьшене. Таким образом, взаимодействие гинсенозидов с биомакромолекулами помогает установить сложную систему биологически значимых зависимостей, что приводит к открытию новых целевых белковых биомаркеров и новых соединений-кандидатов для создания лекарств.

1.9 Актуальные задачи исследования женьшеня

В последние годы было предложено много новаторских идей и способов, применяемых в анализе женьшеня. Удалось достичь лучшего разделения определяемых компонентов, сократить время анализа и упростить разработку новых подходов исследования женьшеневого растительного сырья, продуктов на его основе и метаболизма его биоактивных соединений. Актуальные проблемы исследования связаны с основными задачами, которыми, на сегодняшний день, являются: контроль качества таких продуктов и сырья, идентификация видов женьшеня и изучение взаимодействия его компонентов с биологическими системами.

1.9.1 Идентификации видов женьшеня

Женьшень произрастает и выращивается людьми в различных географических регионах. Все виды женьшеня из рода *Panax* содержат сходные по структуре компоненты, но отличаются по своей способности влиять на проявление разных симптомов у людей. На рынке растительных лекарственных препаратов встречается большое количество фальсифицированной продукции [172, 173]. Поскольку корни женьшеней не сильно отличаются по внешнему виду, и большинство

коммерческих продуктов на основе женьшеня продается в виде порошков и тонких высушенных нарезанных кусков корня, определение происхождения образца является сложной задачей и требует применения химического анализа. Предложено несколько методов решения этой задачи, обычно основанных на получении химических профилей, или с использованием веществ-маркеров. У женьшеней из различных регионов, растений разного возраста и вида будет характеристичный химический профиль компонентов. Многомерный анализ данных в определении «отпечатка пальцев» помогает осуществлять более достоверную идентификацию компонентов и аутентификацию образцов. Для этой цели используют ВЭТСХ [64, 174], МС профилирование [175, 176] или ЯМР [127-129, 177] применительно к анализу гинсенозидов [175, 176], аминокислот [177, 113] и полиацетиленов [74]. Суммарное содержание гинсенозидов в *P. notoginseng* больше, чем в *P. quinquefolius*, и намного больше, чем в *P. ginseng*. Одним из отличий между этими тремя видами является присутствие гинсенозида Rf в *P. ginseng* [16]. Гинсенозид Rb2 присутствует на уровнях с большей массовой концентрацией в *P. ginseng*, а в остальных двух видах его удается обнаружить лишь в следовых количествах [90]. Нотогинсенозид R1 является характеристическим компонентом для *P. notoginseng*, в тоже время, псевдогинсенозид F11 считается соединением-маркером *P. quinquefolius*. F11 имеет одинаковую молекулярную массу и близкие времена удерживания с гинсенозидом Rf [15]. F11 не содержит хромофорных групп, а следовательно не может быть зарегистрирован с помощью УФ детектирования, ВЭЖХ-ИДСР [89] и ВЭЖХ-МС [178] применяют для одновременного определения как F11, так и Rf. УВЭЖХ в сочетании с тандемный квадруполь-времяпролетным МС детектированием в течение двух минут позволяет провести анализ на содержание Rf и F11 и, таким образом, отличить фальсификат, содержащий *P. ginseng*, от выдаваемого за чистый *P. quinquefolius* [178]. Устанавливая соотношения гинсенозидов Rg1/Re, Rg1/Rb1 и Rb2/Rb1 также можно достичь решения вышеупомянутой задачи. Соотношения менее 0.4 присущи для *P. quinquefolius*; более высокие значения характерны для of *P. ginseng* [89, 178]. Исключением является высокое соотношение гинсенозидов Rg1/Rb1 в произрастающем в дикой природе *P. quinquefolius* [179]. Кроме того, для успешной дифференциации различных видов и образцов женьшеня можно использовать

такие спектральные методы, как двумерная ИК спектроскопия с преобразованием Фурье [172] и двумерная ЯМР спектроскопия [129].

Изучение генома является альтернативой вышеописанным подходам, поскольку позволяет провести идентификацию растения, независимо от физического состояния образца и условий эксперимента. С появлением новых подходов в молекулярной биотехнологии были разработаны новые генетические методы исследования образцов, позволяющие проводить надежную аутентификацию видов женьшеня на уровне ДНК. В работе [17] рассмотрены основные генетические методы аутентификации видов из рода *Panax*. Некоторые из них перечислены в разделе 1.1.

1.9.2 Оценка качества женьшеневой продукции

С тех пор как на мировом рынке появилась тенденция к увеличению продаж средств народной медицины в целом и лекарств на основе женьшеня в частности образовалась потребность и в методах контроля качества такой продукции. В отличие от лекарств, содержащих один основной компонент, женьшень, наподобие фруктов и овощей, содержит множество полезных компонентов. Вариации в типе почвы и климате произрастания женьшеня, а также в процессах обработки растительного сырья влияют на безопасность и одинаковые фармакологические свойства разных партий одного и того же женьшеневого продукта. Мониторинг качества должен осуществляться скоординировано на выбранных стадиях такого производства и учитывать все возможные вариации. Качество изготовления продуктов на основе женьшеня всегда зависит от качества исходного растительного сырья корней *P. ginseng* и экстрактов. Гинсенозиды Rb1, Rb2, Rc, Re, Rg1 и Rd были выбраны основными маркерами для контроля качества. Их суммарное содержание, оцененное с помощью ВЭЖХ-УФ, не должно быть менее 3% от массы экстрактов из *P. ginseng*, 4% для корней *P. quinquefolius* и 10% для экстрактов из них. В корнях *P. ginseng* должно содержаться не менее 0.2% Rg1 и 0.1% Rb1. В 2009 в канадской монографии, посвященной *P. ginseng*, [180] было установлено значение допустимой дневной дозы суммарного содержания женьшеневых сапонинов для всех препаратов в пределах 0.024–0.294 г. Для достоверной оценки качества и свойств любого образца лаборатории используют максимально возможное число биомаркеров. Для оценки качества белого и

красного *P. ginseng* проводили одновременное ВЭЖХ-ИДСР детектирование 14 женьшеневых сапонинов [94]. Корейский белый, красный и черный женьшени охарактеризовывали, используя 19 гинсенозидов в качестве маркеров [95]. Для одновременного определения флавоноидов, сапонинов и полиацетиленов в женьшене использовали ВЭЖХ-ДМД и МС детектирование [181]. Сравнение фармакологического эффекта проводили для образцов различных частей женьшеня разных возрастов, разного географического происхождения от нескольких производителей [85,49,179,182-184]. Содержание индивидуальных гинсенозидов и их суммарное количество отличается в разных коммерческих продуктах на основе женьшеня [182]. Гинсенозидные профили и содержания также варьируются в зависимости от исследуемой части растения – концентрация гинсенозидов уменьшается в ряду: листья, тонкие корневые отростки, корневище, корень, стебель [93]. Для количественной оценки содержаний соединений-маркеров необходимы высококачественные специализированные библиотеки. Недостаток стандартных образцов и улучшенных методов определения этих соединений затрудняет решение задачи количественного анализа женьшеневой продукции. Некоторые стандартные образцы коммерчески доступны, однако их высокая стоимость и небольшое разнообразие не позволяют удовлетворить запросы мировой индустрии растительного сырья. Поскольку структуры многих компонентов женьшеня имеют схожую химическую структуру, были предложены подходы относительного количественного анализа, в которых по калибровочным зависимостям, полученным для универсальных стандартных соединений, рассчитывают концентрации их структурных аналогов. Так, для количественного анализа 26 стероидных алкалоидов использовали коммерчески доступный компонент сравнения – вертицинон [185]. Сравнив с результатами, полученными с использованием обычных градуировочных растворов, было установлено, что точность такого способа анализа в среднем составляла 98.5%. Аналогичные подходы с применением отдельных стандартных веществ для ППТ и ППД-групп гинсенозидов на сегодняшний день активно разрабатывают [143]. Поскольку активность большинства гинсенозидов не подтверждена, во многих исследованиях выбирают основные гинсенозиды, такие как Rb1 и Rg1, в качестве биоактивных компонентов или маркеров. Недостатком такого подхода является потеря связи

между качественным составом образца и проявляемой биологической активностью. Сочетание методов количественной оценки содержаний выбранных маркеров и получения метаболической картины «отпечатков пальца» для каждого образца может облегчить выявления зависимостей состав-активность для различных образцов и поможет повысить сопоставляемость результатов повторяемых в разных условиях исследований.

1.9.3 Получение информации о структуре метаболитов гинсенозидов в режиме on-line

На сегодняшний день в метаболомике растительного сырья активно решается задача идентификации вторичных метаболитов способом «отпечатков пальцев». Традиционным подходом правильного определения структуры является выделения фракции, содержащей отдельный метаболит, и последующего ЯМР анализа этой фракции. Однако множество компонентов не так легко отделить от стальной смеси, и большинство необходимых образцов сравнения отсутствуют в лабораториях. Использование ВЭЖХ с МС детектированием позволило проводить on-line идентификацию компонентов сложных растительных экстрактов [186-189]. Применение тандемных масс-анализаторов и, позднее, комбинированных квадруполей и ионных ловушек с времяпролетным масс-анализатором так же помогло увеличить число идентифицированных компонентов в образцах женьшеня [190, 191, 122, 119, 117]. Доступные образцы сравнения применяют для получения характеристичных путей фрагментации и отдельных ионов для сапонинов женьшеня. Характеристичные ионы и пути фрагментации обычно позволяют идентифицировать основу сапонины и некоторые заместители. Например, для ППД-группы гинсенозидов характерными являются ионы с m/z 407.37, 425.37 и 443.38. Типы сахаридных заместителей, их число и последовательность так же могут быть определены вследствие одновременной или последовательной фрагментации гинсенозида с потерей сахаридных остатков и их разрушением [108]. Таким образом, анализируются структуры всех компонентов экстракта из женьшеня. Для последующей идентификации необходимо хорошее хроматографическое разделение. Однако получение информации о характеристичных ионах и механизмах фрагментации из анализа стандартных образцов сравнения является необходимым условием успешной идентификации

известных и неизвестных компонентов экстракта из женьшеня. Целевые соединения могут быть однозначно идентифицированы путем сравнения времен удерживания, молекулярных и характеристичных фрагментных ионов с образцом сравнения. Идентификация нецелевых компонентов экстракта является сложной проблемой. Первым шагом ее решения, обычно, является нахождение сигналов молекулярных ионов на масс-спектрах неизвестных соединений. Далее, используя определенные критерии, а именно, допустимый уровень точности определения массы, азотное правило и изотопное расщепление, можно получить формулу исследуемого вещества. Зная молекулярную формулу компонента, можно провести поиск по различным химическим базам данных. Из полученных по базам данных кандидатов можно получить структуры характеристичных ионов, групп или частей структуры для облегчения процесса идентификации неизвестных компонентов. Наконец, наиболее вероятная структура может быть выбрана из этих кандидатов путем изучения совпадения паттернов фрагментации. В режиме on-line ранее были получены структурные данные по 152 сапонидам в *P. notoginseng* с помощью ВЭЖХ-ИЭР-МСⁿ [192], 35 гинсенозидам *P. ginseng* [122] и 30 гинсенозидам *P. quinquefolius* [190] с помощью ЖХ-ХИАД-МС. Затем в корнях этих трех растений было дополнительно обнаружено более 430 новых сапонинов [8].

1.9.4 Изучение динамики химической трансформации женьшеневых сапонинов

Во время экстракции, обработки и хранения гинсенозидов происходит изменение их структуры и концентрации. Трансформация наблюдается как в случае малонил-замещенных соединений, так и в случае незамещенных женьшеневых сапонинов (обычно просто называемых гинсенозидами). Малонил и ацетил замещенные, или кислые сапонины - это вещества, у которых малонил или ацетил группа присоединена к 6 атому углерода в глюкозном остатке. Еще в 1983, четыре малонил-гинсенозида, а именно малонил-гинсенозиды Rb1, Rc, Rb2 и Rd, были выделены из *P. ginseng* [193] и позже из *P. quinquefolius* [194]. Малонил-гинсенозид Ra3 [195] и малонил-нотогинсенозид R4 [196] недавно удалось выделить из свежих корней *P. ginseng*. Примерно пятнадцать малонил-гинсенозидов было обнаружено методом ВЭЖХ-МС/МС в экстрактах из женьшеня [190,122,117,197]. Кислые сапонины более полярны, чем нейтральные гинсенозиды

и лучше растворяются в воде, кроме того, они нестабильны и склонны к термическому распаду во время сушки, хранения, нагревания и экстракции [198-200]. При сушке корней женьшеня на воздухе остаточное содержание малонилгинсенозидов будет тем меньше, чем выше температура окружающей среды [198]. Малонилгинсенозиды отсутствуют или находятся на уровне следовых количеств в образцах красного женьшеня, получаемого из корня путем обработки с паром [200]. Женьшеневые сапонины рекомендуют экстрагировать холодными спиртовыми смесями, наиболее эффективной из которых является 40% раствор этанола [198]. Таким образом, малонилгинсенозиды редко удается обнаружить в коммерчески доступных продуктах на основе женьшеня, при извлечении их компонентов с помощью экстракции при нагревании [119]. Парциальное содержание малонилзамещенных сапонинов среди всего разнообразия этих соединений в корне женьшеня очень велико. Их концентрацию оценивают, примерно, в треть общего содержания гинсенозидов в *P. quinquefolius*, однако, она значительно ниже в *P. ginseng* и *P. notoginseng* [201, 27]. Малонилгинсенозид Rb1 является самым распространенным [68]. Профили малонилзамещенных гинсенозидов отличны для разных видов женьшеня [197, 201]. Из-за нестабильности таких гинсенозидов и недостатка стандартных образцов сравнения, получение таких профилей является трудной задачей. Поскольку они обычно не видны при УФ детектировании, получение хроматограмм методом ВЭЖХ-УФ может привести к занижению содержания гинсенозидов, благодаря игнорированию присутствия малонилзамещенных сапонинов. Использование фосфатного буфера оказалось успешным решением для малонилзамещенных и других связанных в эфиры гинсенозидов [199, 116]. При использовании ИДСР и МС детектирования применяют ацетат аммония [117], формиат аммония [119] и уксусную кислоту [197] в качестве подвижных фаз взамен фосфатного буфера. Альтернативным является способ двухстадийного анализа малонилгинсенозидов путем гидролиза с КОН до незамещенных гинсенозидов, и последующего детектирования. Однако такой способ может дать только приблизительные данные по содержанию малонилгинсенозидов, поскольку их производные так же могут подвергнуться трансформации. Для детектирования малонилзамещенных сапонинов в экстрактах применяют как ХИАД-МС [190, 122], так и ИЭР-МС [117, 197, 202]. Наличие

свободной карбоксильной группы в структуре малонил-гинсенозидов означает, что их присутствие в образце может быть быстро установлено при получении в масс-спектрах интенсивных нейтральных потерь масс 44 Да (CO_2), 42 Да ($\text{CH}_2=\text{CO}$) и 60 Да (CH_3COOH). Обычные гинсенозиды в большинстве случаев устойчивы к сушке и хранению образцов [203] и склонны к разложению до новых соединений при интенсивном нагревании и обработке паром. Такая конверсия исследуемых соединений, очевидно, приводит к тому, что гинсенозидные профили образцов до и после процесса обработки будут отличны [204-206, 88]. При этом содержание более полярных гинсенозидов уменьшается, а содержание менее полярных соединений увеличивается. К числу структурных изменений также относятся отщепление сахаридных заместителей и изомеризация по конфигурации гидроксилзамещенного атома углерода С-20 [204]. Гинсенозиды ППД-типа, соответственно, отщепив сахаридную цепь при атоме С-20, превращаются в гинсенозид Rg3 [207, 208]. Далее Rg3 переходит в Rk1 и Rg5 при дегидратации (рис. 4) [85].

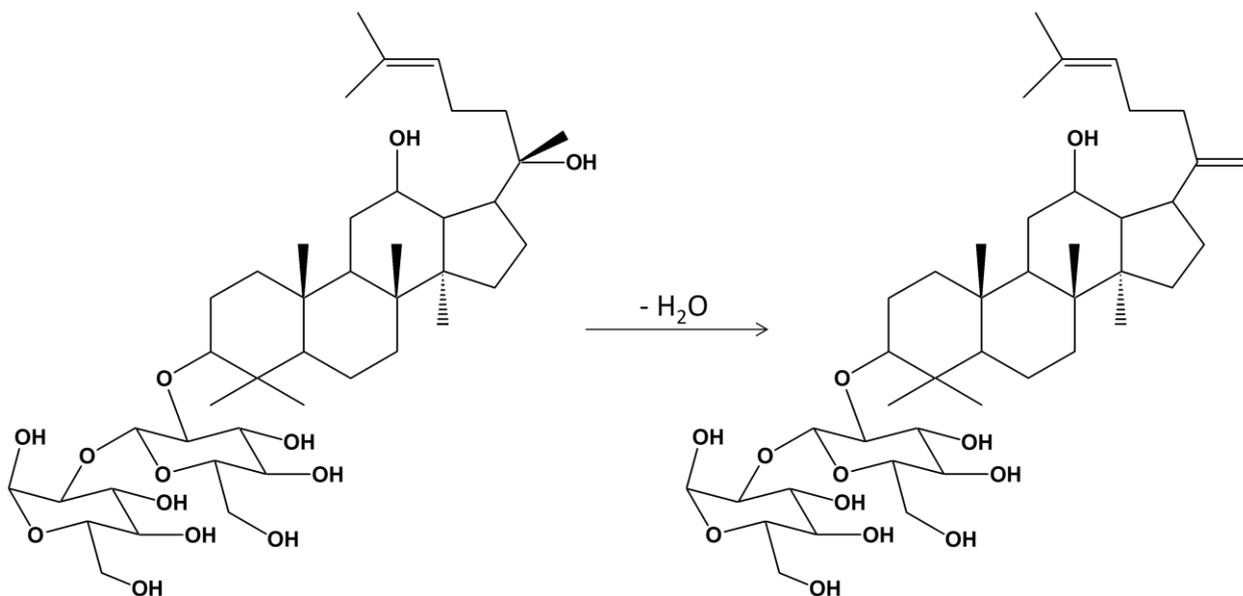


Рис. 4. Отщепление молекулы воды от гинсенозида Rg3 с формированием гинсенозида Rk1.

Небольшое количество гинсенозида Rh2 обнаруженного в образцах красного женьшеня, свидетельствует о том, что отщепление сахаридных остатков при атоме углерода С-3 протекает с трудом при обработке корня с паром [88]. Гинсенозиды ППТ-типа вначале отщепляют сахаридные остатки при атоме С-20, а затем освобождаются от заместителей при атоме С-6, переходя в Rg2 и/или Rh1 [200].

Rh1 далее трансформируется в Rk3 и Rh4 при дегидратации в положении С-20. Вкратце, отщепление сахаридных остатков в положениях С-20, С-6 или С-3 и последующая дегидратация являются характерными последствиями обработки образцов корня женьшеня паром.

1.9.5 Фармакокинетические исследования женьшеневых сапонинов

Изучение фармакокинетических свойств препаратов на основе женьшеня является непростой научной задачей из-за огромного разнообразия сапонинов в составе таких препаратов. Основными параметрами, определяемыми в ходе таких исследований, являются: максимальное время жизни соединения в объекте, период полураспада и биодоступность вещества в препарате. Особое внимание уделяют пробоподготовке и анализу образцов. Простейшим способом пробоподготовки является осаждение белков и жидкость-жидкостная экстракция. В других способах пробоподготовки используют твердофазную экстракцию (ТФЭ) для устранения мешающего влияния матрицы образца. Недостатком ТФЭ по сравнению с жидкость-жидкостной экстракцией являются низкие степени извлечения. Обычно во время фармакокинетических испытаний анализ биопроб на содержание сапонинов проводят методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС. Первый из упомянутых методов удобней и проще в применении, однако, отличается меньшей чувствительностью с нижней границей определяемых содержаний на уровне 1000 нг/мл^{-1} . ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС методы более чувствительны (пределы обнаружения на уровне $0.5\text{--}5 \text{ нг/мл}^{-1}$) и более селективны. Если использовать разбиение хроматограммы на временные сегменты с детектированием по разным выбранным ионам, то можно добиться большей чувствительности и диапазона линейности, чем в случае классического детектирования по выбранным ионам [209]. Эффективность ионизации сапогенинов ППД и ППТ ниже, чем их производных – гинсенозидов, содержащих сахаридные заместители [210]. Обычно дигоксин выступает (рис. 5) в роли внутреннего стандарта для количественного анализа методом МС.

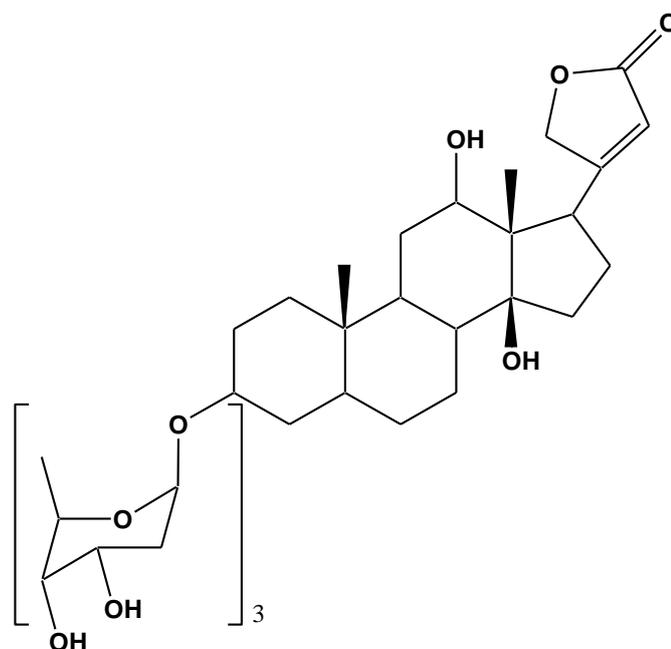


Рис. 5. Структура дигоксина.

Биодоступность сапонинов ППД-типа (гинсенозидов Ra3 [147], Rb1 [211], Rd [212], Rg3 [155] и Rh2) и ППТ-типа (гинсенозидов Rg1 [104], Re [213], Rh1 [150] и нотогинсенозида R1 [211]) при оральном применении менее 5% [148]. С мочой из организма выводится 0.2–1.2% гинсенозидов [214]. Интенсивное протекание химических превращений в пищеварительном тракте [156, 149], плохая мембранная проницаемость [147] и низкая растворимость свободных от сахаридных заместителей метаболитов [215] приводят к низкой усваиваемости женьшеневых сапонинов. Большие дозы препаратов обеспечивают более полное протекание метаболизма и лучшую биодоступность сапонинов [216, 217]. Сапонины ППТ-типа отличаются лучшей биодоступностью по сравнению с ППД-группой гинсенозидов [217, 211], скорее всего, по причине того, что они быстрее разлагаются в организме, чем ППТ гинсенозиды. Компонент К или ИН-901 (рис. 6), является метаболитом гинсенозидов ППД-типа, ухудшает биодоступность сапонинов, поскольку быстро выводится с желчью и метаболизируется в печени, вступая в реакцию образования эфира с жирными кислотами [218, 216].

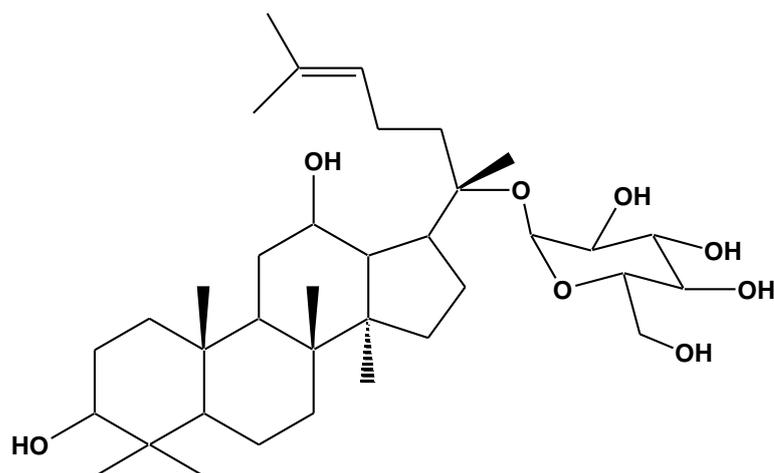


Рис. 6. Структура гинсенозида К (компонента К). ППД-20-Glc.

Биодоступность может быть улучшена при изменении фармацевтической формы препаратов. Например, уменьшение диаметра частиц порошкообразного препарата на основе гинсенозида Rh2 приводит к удвоению его биодоступности [215], применения комплекса ИН-901 и водорастворимого агента – циклодекстрина, так же позволяет увеличить биодоступность, приблизительно, в два раза по сравнению с обычным порошком чистого ИН-901 [219]. Доступность ППД агликона и 25-ОН-ППД улучшается за счет меньшего числа возможных путей метаболизма и лучшей мембранной проницаемости [220-222]. Время до достижения максимальной концентрации в плазме и тканях, обычно меньше 2 часов, указывает на то, что гинсенозиды быстро поглощаются организмом и легко перемещаются по всем тканям [158, 223]. Уровни содержания сапонинов в организме зависят от времени их полураспада. Кривые выведения гинсенозидов содержат несколько различных пиков, что свидетельствует о включении в процесс метаболизма печеночной рециркуляции [216]. Анализ распространения сапонинов в тканях подтвердил, что работа печени отвечает за систематическое выведение гинсенозидов из организма [216, 218, 223]. Содержащийся в печени цитохром P450 является катализатором метаболического превращения, и CYP3A4 катализирует окисление сапонинов, а также способствует перераспределению гинсенозидов в печени. Гинсенозиды Ra3, Rb1, Rc и Rd имеют намного больший период полураспада (18.57–39.4 часов) по сравнению с остальными гинсенозидами (0.2–4.77 часов). Наличие большего числа сахаридных остатков в молекуле гинсенозидов ППД-типа: Ra3, Rb1, Rc и Rd препятствует их выведению с помощью транспортеров, содержащихся в желчи [147]. На сегодняшний день очевидна

необходимость проведения детализированных фармакокинетических исследований как хорошо изученных, так и недавно обнаруженных гинсенозидов.

На данный момент ВЭЖХ-УФ является самым простым и удобным методом контроля содержания гинсенозидов в растительном сырье, экстрактах и продуктах на их основе. Выбор этого метода обусловлен простотой, доступностью и распространенностью данного метода в аналитических лабораториях. Однако, из-за слабого УФ поглощения гинсенозидов, детектирование приходится проводить при 200–205 нм, что приводит к высокому значению фонового сигнала и шума, а, следовательно и к низкой чувствительности. ВЭЖХ-ИДСР считается хорошей альтернативой для ВЭЖХ-УФ определения гинсенозидов, которая позволяет получать хроматограммы со стабильной базовой линией и расширить круг используемых растворителей для лучшего хроматографического разделения. Ограничением как УФ, так и ИДСР методов является невозможность давать достаточно информации о структуре идентифицируемых соединений, что делает невозможным соотнесение пиков на хроматограмме со стандартными образцами, избавленными от влияния матрицы и примесей изомеров.

Использование ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием позволяет идентифицировать гинсенозиды, так как дает важную информацию об их структуре, например, молекулярную массу, последовательность сахаридных заместителей и массу сапогенина. Препараты на основе различных видов из рода *Panax* отличаются по составу гинсенозидов, что и выясняется с помощью методов ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Более того, эти технологии можно использовать в качестве селективных и чувствительных способов количественной оценки содержания гинсенозидов. Несмотря на то, что данные подходы достаточно дороги и сложны для рутинного анализа, их с успехом применяют в изучении фармакокинетики и метаболомике. Наиболее существенными недостатками использования ВЭЖХ для рутинного анализа на содержание гинсенозидов являются потери времени на сложную пробоподготовку и продолжительный (обычно более 60 мин) анализ, что связано с большим числом компонентов, которые необходимо разделить. Спектроскопию в ближней инфракрасной области успешно применяют для определения гинсенозидов в растительном сырье с

хорошей чувствительностью и воспроизводимостью сравнимыми с ВЭЖХ. Кроме того, этот способ более прост в применении и не требует затрат времени на анализ и пробоподготовку, что значимо для рутинного анализа. Однако для этого необходимо провести калибровку по образцам с известным содержанием гинсенозидов, определенным с помощью подходящего референтного метода.

В литературе описано большое разнообразие гинсенозидов, присутствующих в различной пропорции в растительном сырье и продуктах на его основе. Это разнообразие даже для одного вида женьшеня можно объяснить с точки зрения различных природных условий, а именно, вида почвы, климата, географического положения и различных способов первичной обработки растений. Однако такие отклонения могут быть минимизированы при введении систем стандартизованных способов культивации и обработки. Более того, различие в получаемых исследователями результатах может быть связано с разными способами пробоподготовки, например, экстракцией, разными методами анализа и интерпретацией данных. В большинстве научных работ не рассматривают малонил-производные гинсенозидов, присутствие которых на уровне 60% от общего количества обнаружено ранее. На сегодняшний день в Европе, США и Китае узаконены общие правила анализа растительного сырья и препаратов на основе женьшеня для обеспечения надлежащего качества и контроля соответствия ему таких препаратов [114, 230]. Однако единообразие спецификаций производства и применения таких препаратов и методов их анализа крайне необходимо, и его еще предстоит достигнуть.

В будущем предполагается более широкое применение и внедрение инструментальных методов анализа, таких как ЯМР и ВЭЖХ-МС, особенно в области групповой идентификации гинсенозидов в различных объектах, а также исследований метаболома и в целях контроля качества препаратов на основе женьшеня. Такие технологии позволят не только обезопасить применение людьми средств традиционной медицины, но и выявить и изучить пути метаболизма и биологического действия гинсенозидов в живом организме.

ГЛАВА 2. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующее оборудование:

- Система ВЭЖХ-МС-МС, состоящая из гибридного тандемного тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), третий квадруполь с функцией работы в режиме ЛИЛ, оснащенного двумя источниками ионизации: источником ХИАД и источником ИЭР (электроспрей) и крана-дозатора; и жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США) с ДМД детектором.

- Система ВЭЖХ-МС-МС Agilent 6460 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, состоящий из тройного квадрупольного масс-селективного детектора с источником ионизации – ИЭР (ионизация электроспреем), ВЭЖХ насоса, позволяющего работать в режиме градиента высокого давления (до 1200 бар), дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и автосемплера.

- ЯМР спектрометр Bruker Avance 600 МГц (Карлсруэ, Германия).¹

- Колонки для ВЭЖХ:

Kromasil 100 C18, 4.0×100 мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм (HiChrom, Великобритания);

Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США)

Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 3 мкм (Dionex, США)

Для увеличения срока службы хроматографических колонок использовали универсальные предколонок для ВЭЖХ SecurityGuard (Phenomenex, США).

- Программное обеспечение:

Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программных пакетов: Analyst 1.5.1 (ABSciex, Канада), Mass-Hunter (Agilent Technologies, США).

¹ Анализ методом ЯМР был выполнен на в лаборатории ЯМР ИНЭОС РАН к.х.н. Годовиковым И.А., за что автор данной работы выражает особую благодарность.

- Дополнительное оборудование:

Для измерения рН использовали ионометр «SartoriusPB-11» (Sartorius, Германия).

Для ручного ввода пробы использовали стеклянный хроматографический шприц Agilent объемом 100 мкл (Agilent Technologies, США).

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более $\pm 5\%$ (LABMATE, Польша) и одноразовые наконечники необходимых объемов.

Для перемешивания растворов применяли ультразвуковую ванну «Branson 2210 E-DTC» фирмы «Bransonic» США. Пробы центрифугировали с помощью центрифуги модели 203, фирмы Sigma, Германия.

Лиофилизатор модель LZY-0.5 (Китай).

Взвешивание точных навесок проводили на весах ExplorerPro (OhausCorporation, США). Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия). Для упаривания использовали ротационный испаритель с автоматизированной вакуумной станцией (Buchi, Швейцария).

- Реактивы и материалы:

В работе использовали следующие реактивы: гинсенозиды Rb1, Rb2, Rb3, Re, Rd, Rg1, Rf, Rc, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2, R1, F11, RT5 и Компонент-К (более 98 %, Phytolab, Германия), гинсенозид F1 (ChromaDex Int., США), ацетонитрил и этанол (для градиентной хроматографии Panreac, Испания), метанол (Burdick & Jackson, Германия), уксусную и муравьиную кислоты (х.ч., Химмед, Россия). Деионизированную воду готовили из дистиллированной на установке Milli-Q (Millipore, США). Гексадейтеро-ДМСО, пентдейтеро-пиридин и D₂O с атомной долей дейтерия не менее 99.6 % (ООО "Астрахим", Санкт-Петербург). Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в дистиллированной воде в день проведения анализа.

В нашем распоряжении были следующие образцы растительных материалов и коммерческих продуктов на основе женьшеня: образцы измельченных менее чем до 0.05 см³ корней растений *P. ginseng* (Брянская область, Сибирь, Дальний Восток) и *Rhodiola Rosea* (Сибирь), высушенные при комнатной температуре;

образцы свежего корня женьшеня (Дальний Восток), представляющие собой нарезанные до, примерно, 0.1 см³ части основного корня и до 1 см его боковые отростки, половина образцов свежего корня были измельчены в блендере; сушеные дольки корня женьшеня приобретенные у производителя Leiyunshang (Шанхай, Китай); два образца женьшеневого чая (улуна) производителей Леаланис (Россия), Niktea (Россия) и Huanglongtai tea co., ltd. (Китай); образец корейского женьшеневого чая, представляющий собой пористые гранулы на основе корня американского женьшеня (Korea Ginseng Industrial co., ltd., Корея); метанольный экстракт из 50 г сухого корня женьшеня (Дальний Восток), высушенный в токе воздуха при температуре 50 °С (процедура экстракции включала перемешивание при 50 °С в течении 3 часов навески 50 г растительного материала и 3 порций по 30 мл метанола, объединенных перед упариванием и высушиванием экстракта); фитопродукт, приготовленный из смеси (1:1) двух высушенных экстрактов из корней женьшеня (из Брянской области и Сибири), процедура ультразвуковой экстракции включала перемешивание при комнатной температуре в течении 30 минут на ультразвуковой бане навесок 10 г растительного материала и 2 порций по 10 мл метанола, объединенных перед упариванием и высушиванием экстрактов (метанол испаряли при комнатной температуре в токе азота).

2.2 Техника эксперимента

2.2.1 Схема эксперимента по оптимизации МС детектирования гинсенозидов.

Растворы трех стандартных женьшеневых сапонинов Rg1 (ППТ сапогенин), Rb1 (ППД сапогенин), RT5 (ОТ сапогенин), F11 (ОТ сапогенин) с концентрацией 2000 мкг/мл готовили растворением точных навесок 2 мг в 1 мл метанола, после чего, последовательным разбавлением готовили конечные растворы с концентрациями 10, 10 и 2 мкг/мл смеси ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты (0.5 %) в соотношении 1:1. Определение проводили с использованием источника ионов с ИЭР и ХИАД в режиме регистрации выделенных отрицательно и положительно заряженных ионов. Ток коронного разряда 2 мкА (в случае использования ХИАД), Температура переходного капилляра составляла 100 °С, напряжение на распыляющем капилляре - ±4500 В (при использовании ИЭР), поток газа для распыления подвижной фазы в источнике

ионов 0.2 л мин^{-1} , потоки газа-осушителя и газа-завесы 0.2 л мин^{-1} и 0.05 л мин^{-1} . Варьирование дополнительных параметров МС детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов проводили с помощью программного обеспечения Analyst 1.5.1 (ABSciex, Канада). В экспериментах с использованием сканирования с использованием ЛИЛ выбор аналогичных параметров проводили вручную, измеряя значения площадей хроматографических пиков, полученных в идентичных условиях изократического хроматографического разделения определяемых гинсенозидов Rg1 и Rb1: элюирование смесью ацетонитрила (элюент В) и 0.5% водного раствора муравьиной кислоты (элюент А) в соотношении 55:45 со скоростью потока 0.4 мл/мин на хроматографической колонке Acclaim RSLC C18 ($150 \times 2.1 \text{ мм}$) с диаметром зерна сорбента 2.2 мкм. После проведения оптимизации параметров МС детектирования, в выбранных условиях хроматографического разделения на колонке Acclaim RSLC C18 ($150 \times 2.1 \text{ мм}$) с диаметром зерна сорбента 3 мкм были получены масс-спектры пиков всех 17 стандартных гинсенозидов (рисунки П1-П17). Использовали аналогичную вышеописанной процедуру приготовления смесей с концентрацией 2 мкг/мл. Для хроматографического разделения применяли элюент (А) - водный раствор 0.5% HCOOH, и элюент (В) - ацетонитрил. После 3 минутного отрезка элюирования 20% раствором В, концентрацию ацетонитрила линейно изменяли от 20% до 40% в течение 22 мин; далее за 10 мин линейно увеличили концентрацию элюента В до 75%; 100% концентрация В, достигнутая за 1 мин, поддерживалась постоянной на протяжении 4 мин, перед каждым анализом колонку промывали подвижной фазой с начальным соотношением элюентов А и В (4:1) в течение 5 мин. Температура термостата колонки составляла $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, объем вводимой пробы – 0.020 мл. Разделение псевдогинсенозидов F11 и RT5 проводили в изократическом режиме элюирования смесью 0.5% раствора муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила в соотношении (17:8) детектирование проводили в режиме регистрации выбранных ионных переходов.

2.2.2 Схема эксперимента по разработке способа ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного материала и продуктов на основе женьшеня.

Пробоподготовка. К навескам 0.1 г измельченных и высушенных при комнатной температуре корневищ *Panax ginseng* и *Rhodiola rosea* добавляли 10 мл экстрагента. К трем навескам корня женьшеня и трем пробам *Rhodiola rosea* была сделана добавка 100 мкл стандартных образцов гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc с концентрацией 400, 600 и 700 мг л⁻¹, соответственно. Смесь нагревали на ультразвуковой бане при 30 °С в течение 30 мин. После этого 1 мл экстракта отбирали и затем центрифугировали 12 мин при 16 000 об мин⁻¹. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость и пропускали через пористый фильтр (0.45 мкм). Полученную жидкость исследовали хромато-масс-спектрометрическим методом. Отдельно анализировали в идентичных условиях смесь гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc в воде с концентрацией 4, 6 и 7 мг л⁻¹, соответственно.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника ионов с ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Сканирование проводили в гибридной ЛИЛ в интервале m/z 100–1300. Температура источника ионизации составляла 300 °С, напряжение на капилляре – 5.5 кВ; давление газа-завесы – 1.0×10^5 Па; давление газа-распылителя – 2.7×10^5 Па. Разделение пробы проводили в выбранных условиях хроматографического разделения (раздел 2.2.1) в градиентном режиме на колонке Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм) с диаметром зерна сорбента 3 мкм, скорость потока составляла 0.4 мл мин⁻¹. Температура термостата колонки составляла 25 °С, объем вводимой пробы – 0.020 мл.

2.2.3 Схема эксперимента по получению гинсенозидных профилей растительного материала и продуктов на основе женьшеня.

Пробоподготовка. К навескам 0.1 г корней *P. ginseng*, *P. quinquefolius* и *Rhodiola Rosea*, корейского женьшеневого чая, женьшеневого улуна и фитопродукта на основе экстрактов из корня женьшеня, образцов добавляли 10 мл экстрагента, В качестве экстрагента использовали смесь метанол:вода (1:4). Затем в течение 30 мин проводили ультразвуковую экстракцию при 30 °С. После

экстракции отбирали по 1400 мкл и центрифугировали (5 минуты при 16000 оборотах в минуту). Затем пробы пропускали через пористый фильтр (0.45 мкм) и переносили в новые пробирки. Наконец, отбирали по 1 мл образцов в виалы и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника ионов с ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Сканирование с использованием ЛИЛ проводили в интервале m/z 100–1370. Температура источника ионизации составляла 300 °С, напряжение на капилляре – 5.5 кВ; давление газа-завесы – 1.0×10^5 Па; давление газа-распылителя – 2.7×10^5 Па. Разделение пробы проводили в выбранных условиях хроматографического разделения (раздел 2.2.1) на колонке Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм) с диаметром зерна сорбента 3 мкм, скорость потока составляла 0.4 мл мин⁻¹. Температура термостата колонки составляла 25 °С, объем вводимой пробы – 0.020 мл.

2.2.4 Схема эксперимента по препаративному ВЭЖХ выделению фракции неизвестного сапонина из чая на основе женьшеня.

Пробоподготовка. К навескам 0.1 г измельченного в ступке женьшеневого чая добавляли растворитель, представлявший собой смесь метанола с водой. Затем проводили ультразвуковую экстракцию при 30 °С. После экстракции отбирали надосадочную жидкость и центрифугировали (5 минуты при 16000 оборотах в минуту). Затем пробы пропускали через пористый фильтр (0.45 мкм) и переносили в новые пробирки. Наконец, отбирали по 1 мл образцов в виалы, для проведения препаративного ВЭЖХ выделения фракции и анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Условия хромато-масс-спектрометрического разделения и регистрации. Определение проводили с использованием источника ионов с ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Сканирование с использованием ЛИЛ проводили в интервале m/z 100–1370. Температура источника ионизации составляла 100 °С, напряжение на капилляре – 5.5 кВ; давление газа-завесы – 1.0×10^5 Па; давление газа-распылителя – 2.7×10^5 Па. Разделение пробы проводили на колонке Kromasil 100 C18 (4.0×100 мм), с диаметром зерна сорбента 5 мкм, скорость потока составляла 1 мл мин⁻¹. Температура термостата колонки - 25 °С, объем вводимой пробы – 0.10 мл. В качестве растворителей использовали чистую

воду (элюент А) и ацетонитрил (элюент В). Сбор фракции осуществляли с помощью переключения крана дозатора между двумя положениями: положение 1 – элюат подается напрямую в источник ИЭР, положение 2 – элюат полностью переносится во флакон – приемник. Отобранные фракции анализировали в выбранных хроматографических условиях разделения и МС детектирования на колонке Acclaim RSLC C18 (150 × 2.1 мм) с диаметром зерна сорбента 3 мкм (раздел 2.2.1). Фракцию №1 осушали на ротационном испарителе при 0.8 КПа. Осадок растворяли в дейтеро-ДМСО и проводили анализ методом ЯМР. Фракцию №2 осушали с использованием лиофильной сушки. Для этого со скоростью 0.1 °С/сек жидкую фракцию №2 в 17 бюксах (по 5 мл раствора в каждом) для лиофильной сушки охладили до -60 °С, затем со скоростью 0.08 °С/сек довели температуру в осушительном шкафу до -40 °С, после выдерживания в течение 8 ч температуру начали увеличивать со скоростью 0.05 °С/сек до -20 °С. При данной температуре образец выдерживали 15 ч, после чего, с той же скоростью увеличили температуру до -5 °С, далее проводили термостатирование в течение 10 ч. На последней стадии со скоростью 0.03 °С/сек температуру повышали до комнатной и выдерживали при ней не менее 6 ч. Полученное вещество растворяли в 350 мкл смеси пиридина-d5 и D₂O (7:1) проводили анализ методом ЯМР.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ

3.1 Разработка способов определения гинсенозидов методом ВЭЖХ-МС/МС.

В разделах 1.6 приведена информация по способам группового определения гинсенозидов в растительном сырье и продуктах на основе женьшеня, кроме того, существует множество успешно применяемых методик (раздел 1.5) целевого определения выбранных аналитов из числа гинсенозидов и их метаболитов. Для этих целей обычно используют различные варианты МС детектирования, лучшими метрологическими характеристиками и чувствительностью среди всех этих вариантов обладает регистрация в режиме выбранных ионных переходов. Этот подход ранее был использован нами для определения глюкозидов, входящих в состав растения *Rhodiola rosea*, а именно: салидрозида, розавина и розарина [224]. Пределы обнаружения розарина, розавина и салидрозида в образцах растительных экстрактов составили 6, 4 и 2 нг мл⁻¹ соответственно. Разработка методик с применением данного способа детектирования возможна только при наличии стандартных образцов определяемых веществ, так как на первой стадии необходимо провести оптимизацию условий регистрации сигналов для каждого аналита. Напротив, применение МС методов для группового анализа позволяет успешно обнаружить не только основные компоненты, но и следовые количества менее распространенных гинсенозидов [8]. В процессе работы мы исследовали возможность применения двух вышеупомянутых стратегий анализа сапонинов женьшеня.

3.1.1 Разработка способов детектирования гинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов

Для проверки применимости режима регистрации выбранных ионных переходов использовали стандартные образцы гинсенозидов Rg1 (ППТ сапогенин), Rb1 (ППД сапогенин), RT5 (ОТ сапогенин), F11 (ОТ сапогенин). По химическим свойствам эти соединения относятся к категории среднеполярных органических веществ со средней гидрофобностью, не проявляют ярко выраженных кислотно-основных свойств, однако, их гидроксильные группы способны к

депротонированию, при интенсивном нагревании гинсенозиды склонны к разложению, наличие большого количества гидроксогрупп делают эти вещества малолетучими и неудобными для определения методом ГХ. Согласно литературным данным [101], оптимальным методом для определения этих веществ является ВЭЖХ-МС. Для разработки способа определения гинсенозидов при их совместном присутствии методом ВЭЖХ-МС/МС необходимо провести оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования, подобрать подходящие условия хроматографического разделения (обеспечивающие экспрессное и эффективное разделение исследуемых соединений), оценить метрологические характеристики (предел обнаружения, диапазон линейности градуировочного графика) и провести апробацию разработанной методики на примере анализа исследуемых образцов.

В литературе [101] описан способ определения гинсенозидов с использованием масс-спектрометрического детектирования. В этой работе использовали ИЭР в режиме регистрации отрицательных ионов. В нашей работе мы использовали именно этот способ ионизации молекул определяемых веществ, так как аналиты в своем составе имеют гидроксильные группы, которые способствуют процессу ионизации, и нет необходимости использовать ХИАД, которая, как правило, используется для трудноионизируемых, слабополярных соединений. На рисунке 7 для сравнения приведен полученный нами масс-спектр ХИАД раствора гинсенозида Rg1 с концентрацией 10 мкг/мл. Можно отметить достаточно низкую интенсивность сигналов в области молекулярного иона, что не позволяет использовать этот способ ионизации при детектировании в режиме выбранных ионных переходов.

Процедура оптимизации МС детектирования с использованием ИЭР в общем случае включает в себя выбор оптимального значения потенциала декластеризации (ПД) на входе в масс-анализатор. На следующем этапе работы подбирается величина входного потенциала (ВП) на нулевом квадруполе МС детектора, соответствующая максимальной интенсивности сигнала исследуемого иона. Далее выбирают подходящие для детектирования ионные переходы и для каждого из них подбирают оптимальное значение энергии диссоциации, активируемой соударением (ДАС), во втором квадруполе МС детектора.

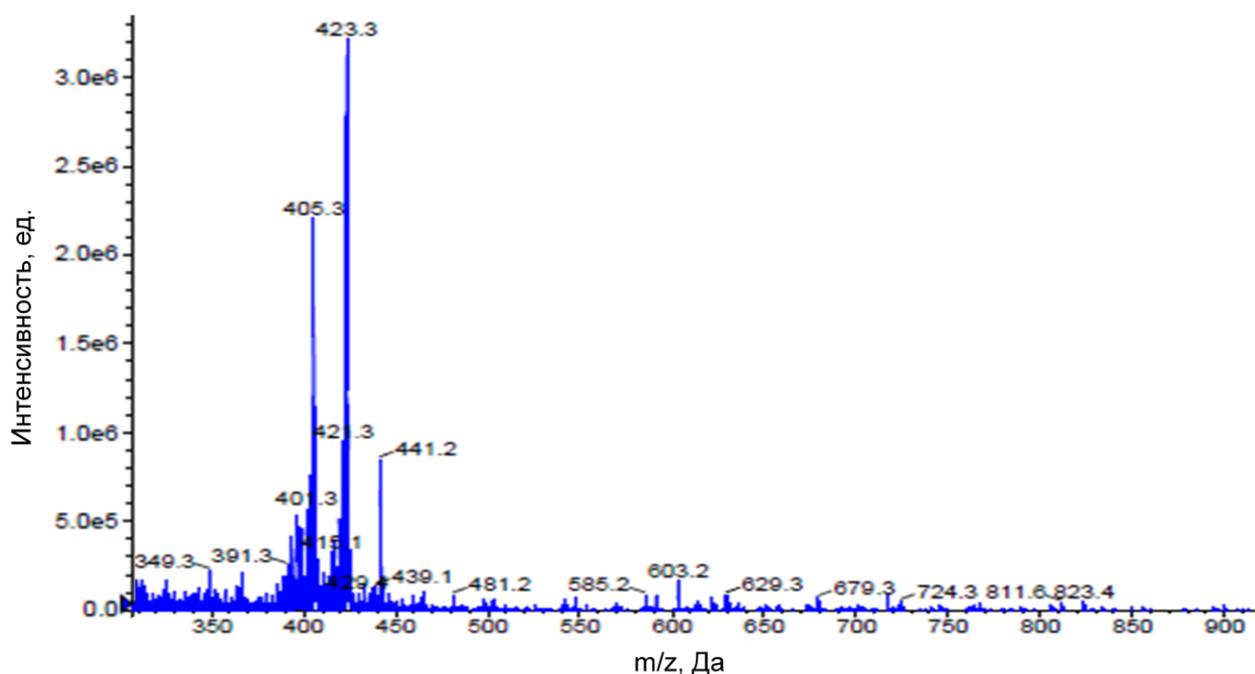


Рис. 7. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора Rg1. Режим ХИАД в варианте регистрации положительных ионов.

Процедура оптимизации МС детектирования с использованием ИЭР в общем случае включает в себя выбор оптимального значения потенциала декластеризации (ПД) на входе в масс-анализатор. На следующем этапе работы подбирается величина входного потенциала (ВП) на нулевом квадруполе МС детектора, соответствующая максимальной интенсивности сигнала исследуемого иона. Далее выбирают подходящие для детектирования ионные переходы и для каждого из них подбирают оптимальное значение энергии диссоциации, активируемой соударением (ДАС), во втором квадруполе МС детектора.

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (использовали водно-ацетонитрильные растворы гинсенозидов с концентрацией до 10 мкг/мл). На рисунке 8 представлен масс-спектр раствора ППД гинсенозида Rb1, в котором присутствует ион депротонированной молекулы Rb1 с $m/z=1108.1$ (режим регистрации отрицательных ионов) и его аддукты большей молекулярной массы. Образование молекулярного иона вероятней всего происходит за счет депротонирования атома кислорода, который принадлежит одной из гидроксильных групп и обладает кислотными свойствами. В режиме регистрации положительно заряженных ионов сигнал протонированной молекулы отсутствовал.

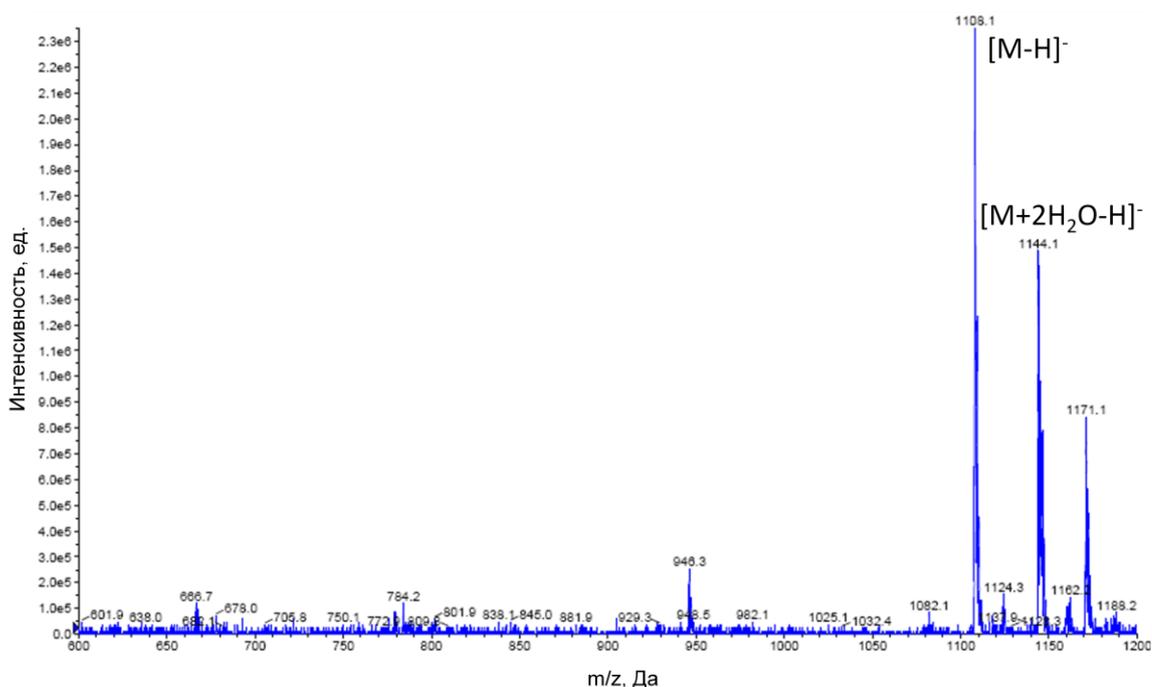


Рис. 8. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора Rb1. Режим ИЭР в варианте регистрации отрицательных ионов.

Масс-спектр ППТ гинсенозида Rg1 (рис. 9) так же содержит интенсивный ион депротонированной молекулы Rg1 с $m/z=800.3$ (режим регистрации отрицательно заряженных ионов) и его аддукты большей молекулярной массы. Образование молекулярного иона так же вероятней всего происходит за счет депротонирования атома кислорода одной из гидроксильных групп.

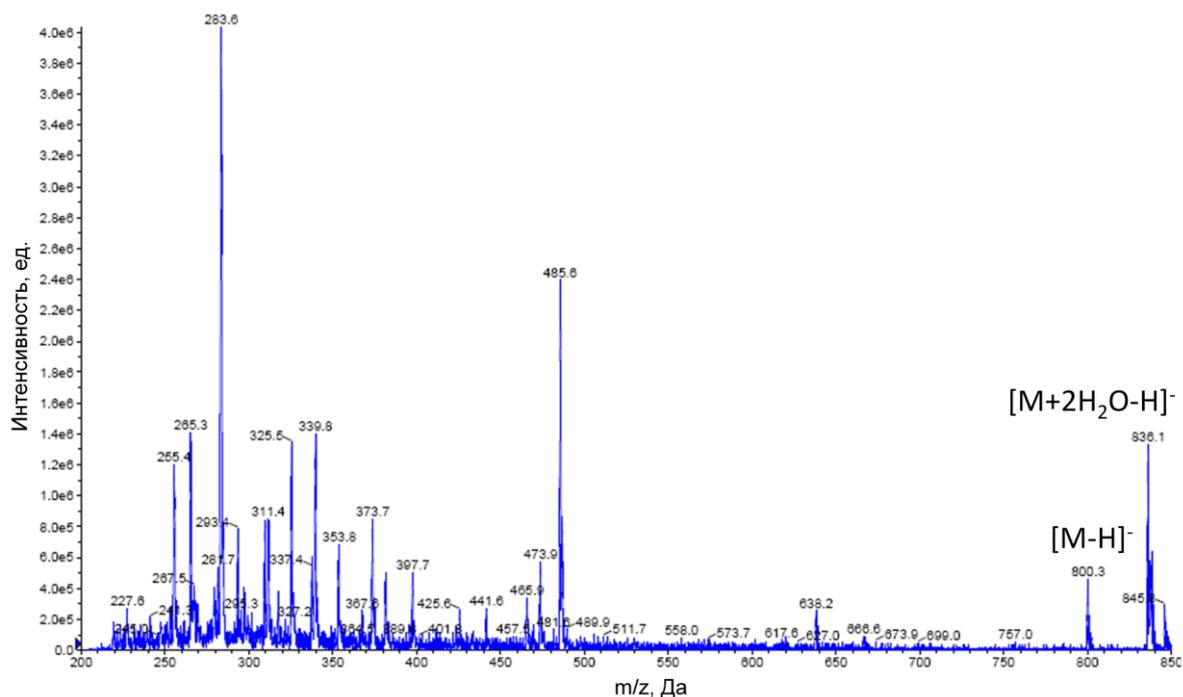


Рис. 9. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора Rg1. Режим ИЭР в варианте регистрации отрицательных ионов.

В режиме регистрации положительно заряженных ионов сигнал протонированной молекулы отсутствовал (рис. 10).

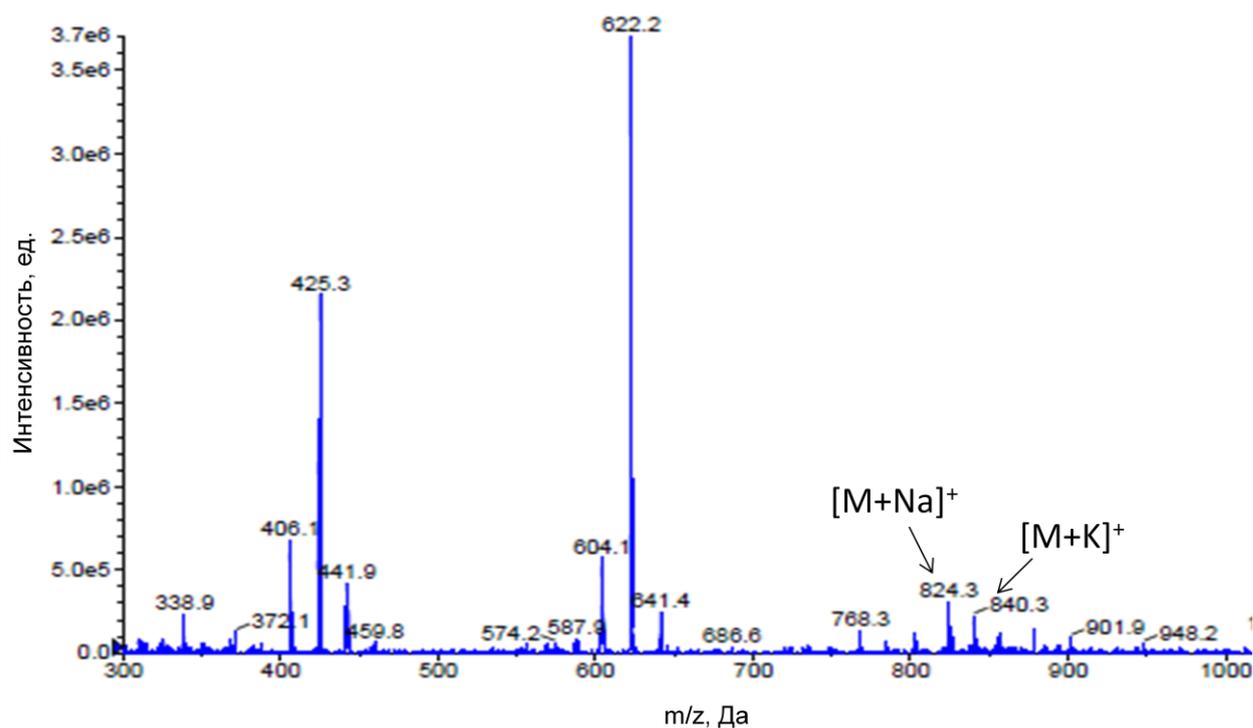


Рис. 10. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора Rg1. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

На рисунке 11 представлены масс-спектры раствора псевдогинсенозида RT5 в положительном и отрицательном режимах сканирования на первом квадруполе. Как и в случае гинсенозида Rb1 в масс-спектре, полученном в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, наиболее интенсивным оказался сигнал депротонированной молекулы соединения. В режиме регистрации положительно заряженных ионов, напротив, большую интенсивность имеет ион молекулярного аддукта с натрием. Такие аддукты не удастся использовать для получения спектра фрагментных ионов, поскольку заряд молекулы, обычно сосредоточенный на атоме натрия, при фрагментации исчезает, вследствие отщепления атома щелочного металла. По абсолютному значению интенсивности (около $7 \cdot 10^5$ ед.) представленные на масс-спектрах сигналы протонированной и депротонированной молекулы RT5 отличаются незначительно, поэтому оба режима могут быть использованы для детектирования псевдогинсенозидов.

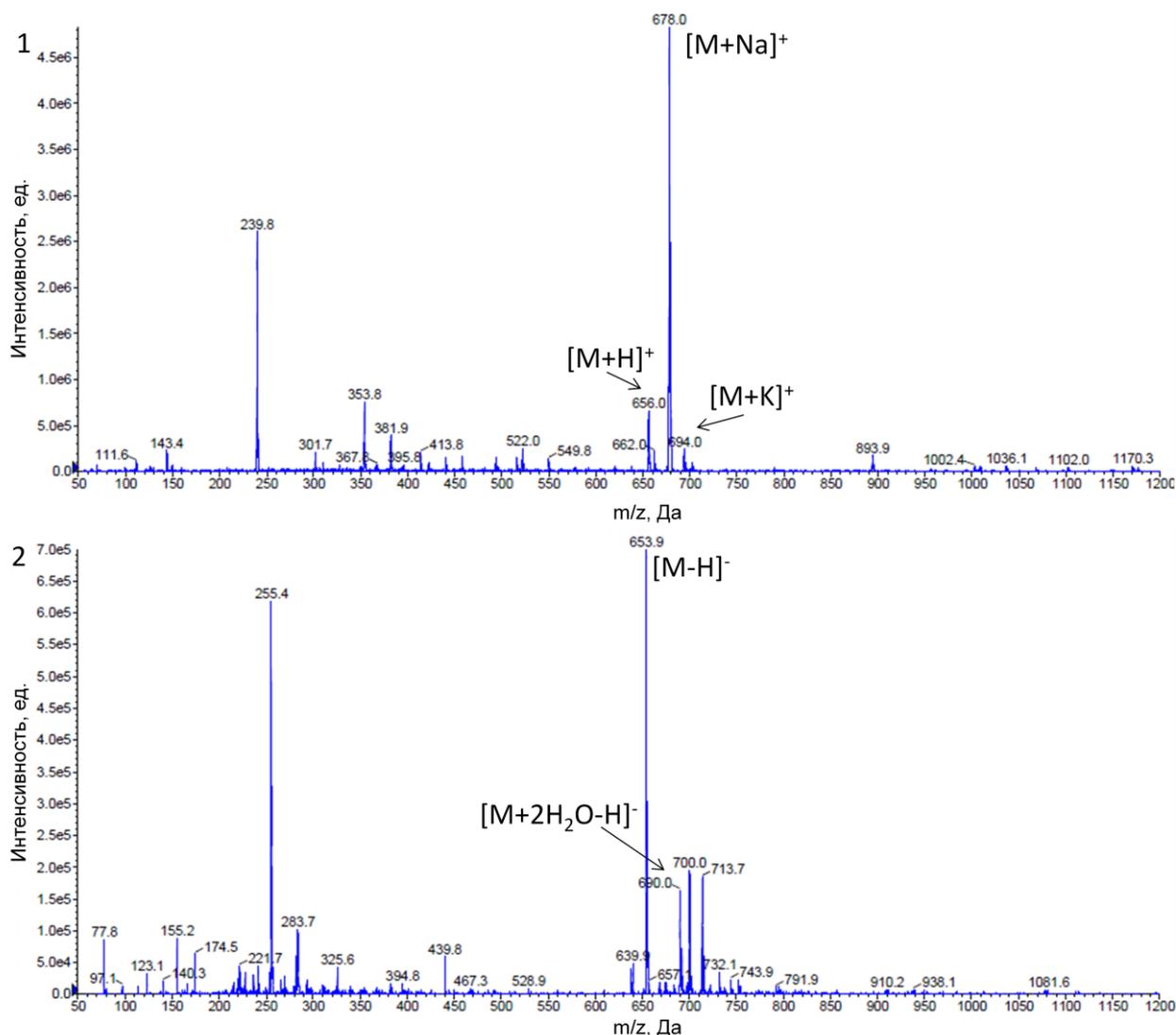


Рис. 11. Масс-спектры 2 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора RT5. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных (1) и отрицательных (2) ионов.

Наличие интенсивного сигнала протонированной молекулы в режиме регистрации положительно заряженных ионов является важной особенностью этой подгруппы сапонинов женьшеня, и будет использовано в дальнейшем.

Таким образом, наиболее распространенные гинсенозиды, производные ППД, ППТ и ОТ, можно детектировать в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов и выбранных ионных переходов. Для этого необходимо выбрать оптимальные значения ВП, ПД и ЭС при ДАС. Критерием выбора оптимальных значений ПД и ВП на нулевом квадруполе масс-спектрометрического детектора является максимальная интенсивность молекулярного иона в масс-спектре. При определении Rb1, Rg1 и RT5 при использования ИЭР в режиме регистрации отрицательных ионов необходимо использовать ВП около -10 В, следует отметить,

что для большинства определяемых веществ на данном масс-анализаторе наибольшая интенсивность сигнала наблюдается при значениях ВП в диапазоне от -11 до -8 В. В последующих экспериментах было установлено, что при определении Rb1 следует устанавливать значения ПД в диапазоне от -160 до -110 В, для гинсенозида Rg1 оптимальные значения ПД лежат в диапазоне от -110 В до -70 В, аналогично для RT5 – от -95 до -40 В.

Следующим этапом оптимизации масс-спектрометрического детектирования стал выбор подходящих ионных переходов для каждого аналита. Для этого проводили исследование влияния энергии соударений (ЭС) в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра фрагментных ионов, образующихся при распаде депротонированных молекул и интенсивность образующихся фрагментных ионов. На рисунке 12 представлены масс-спектры фрагментных ионов Rb1, Rg1 и RT5, полученные в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов ионов в варианте ИЭР, при этом использовали следующие выбранные параметры масс-спектрометрического детектирования: ВП на нулевом квадруполе -10 В и ПД -130, -80 и -65 В, соответственно. Энергия фрагментации -50 В. Как видно из рисунка 12 наилучшая фрагментация наблюдалась в случае псевдогинсенозида RT5.

Наиболее подходящими для качественного и количественного анализа являются ионные переходы $653 \rightarrow 491$; $653 \rightarrow 161$. Наиболее интенсивными ионными переходами для гинсенозида Rb1 оказались: $1108 \rightarrow 179$ и $1108 \rightarrow 946$, при этом образование обоих фрагментов происходит с отщеплением глюкозного остатка с депротонированной гидроксильной группой (m/z 179) или без нее, в таком случае она остается присоединенной к молекуле гинсенозида (m/z 946). В масс-спектре фрагментных ионов (рис. 12), полученных из депротонированной молекулы ППТ гинсенозида Rg1 можно выделить ионы с m/z 475 и m/z 160, однако их интенсивность слишком мала, чтобы проводить достоверное детектирование по данным ионным переходам при низких содержаниях аналита в образце. То же относится и к масс-спектру фрагментных ионов ППД гинсенозида Rb1.

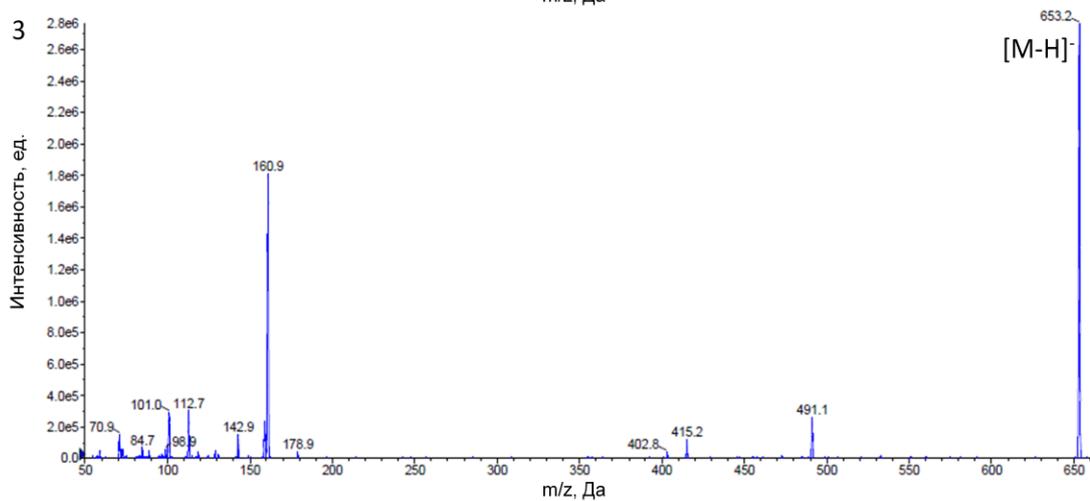
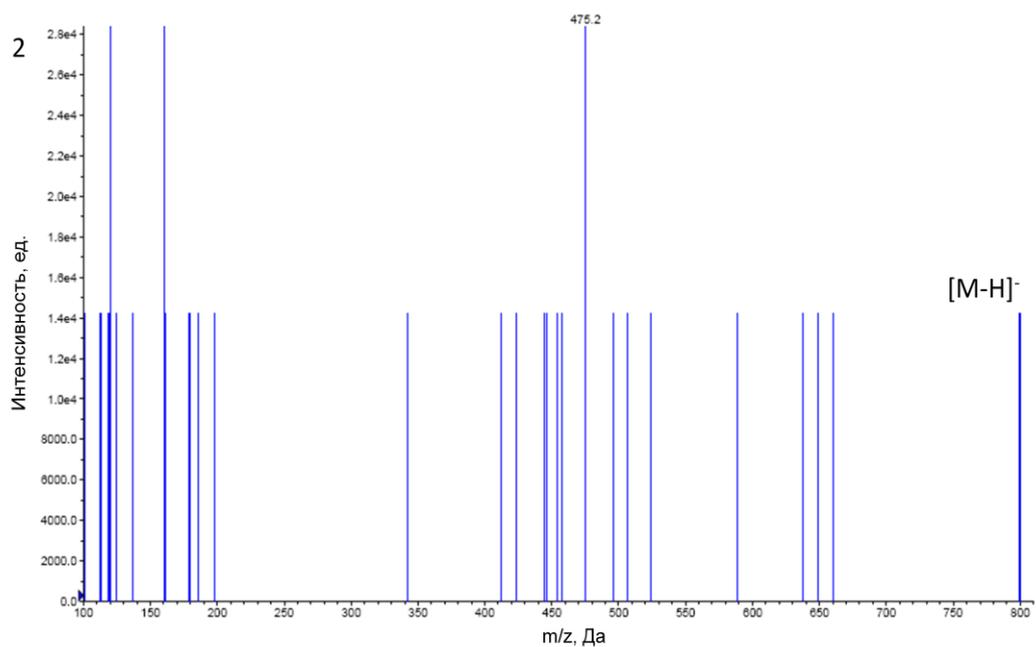
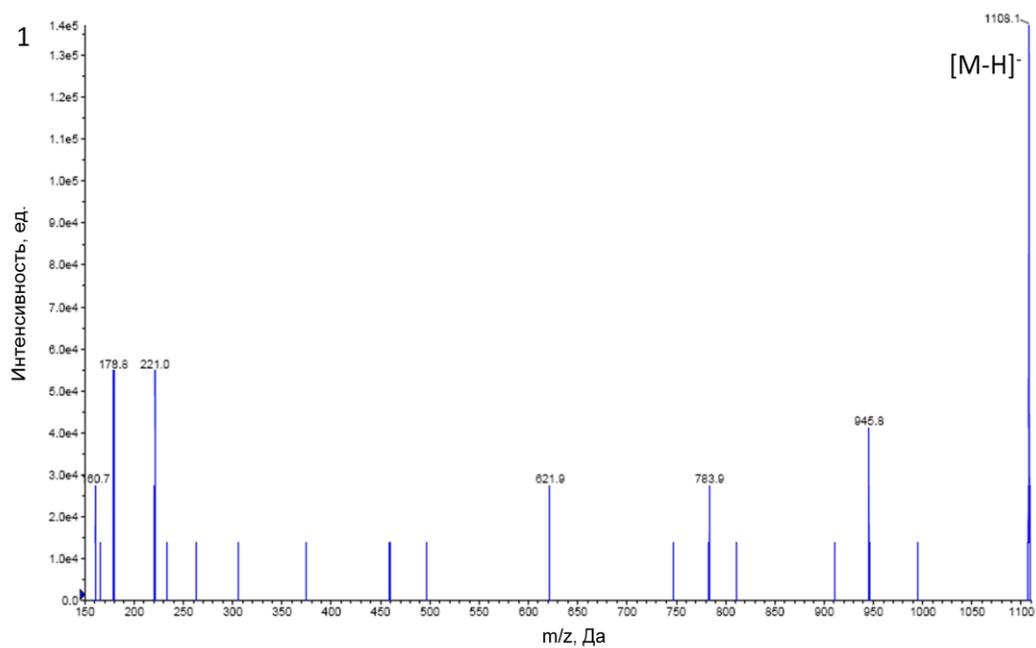


Рис. 12. Спектр фрагментных ионов депротонированных молекул Rb1 (1), Rg1 (2) и RT5 (3). Режим ИЭР в варианте регистрации отрицательных ионов.

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала исследуемых веществ в данном варианте источника ионизации (ИЭР) в режиме регистрации выбранных ионных переходов необходимо использовать следующие параметры работы масс-спектрометра (табл. 3).

Таблица 3. Оптимальные условия детектирования гинсенозидов с использованием ИЭР

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

Альтернативой этим подходам может служить использование режима сканирования с использованием ЛИЛ (раздел 3.1.3) для положительно заряженных ионов. Из-за низкой интенсивности сигналов фрагментных ионов, полученных с помощью ДАС из изолированных депротонированных молекул ППТ и ППД гинсенозидов их детектирование в режиме регистрации выбранных ионных переходов может уступать по чувствительности сканированию с использованием ЛИЛ (рис. 13). Из сравнения высоты пиков очевидно, что применение детектирования в режиме сканирования с использованием ЛИЛ является предпочтительным, по сравнению с режимом регистрации выбранных ионных переходов.

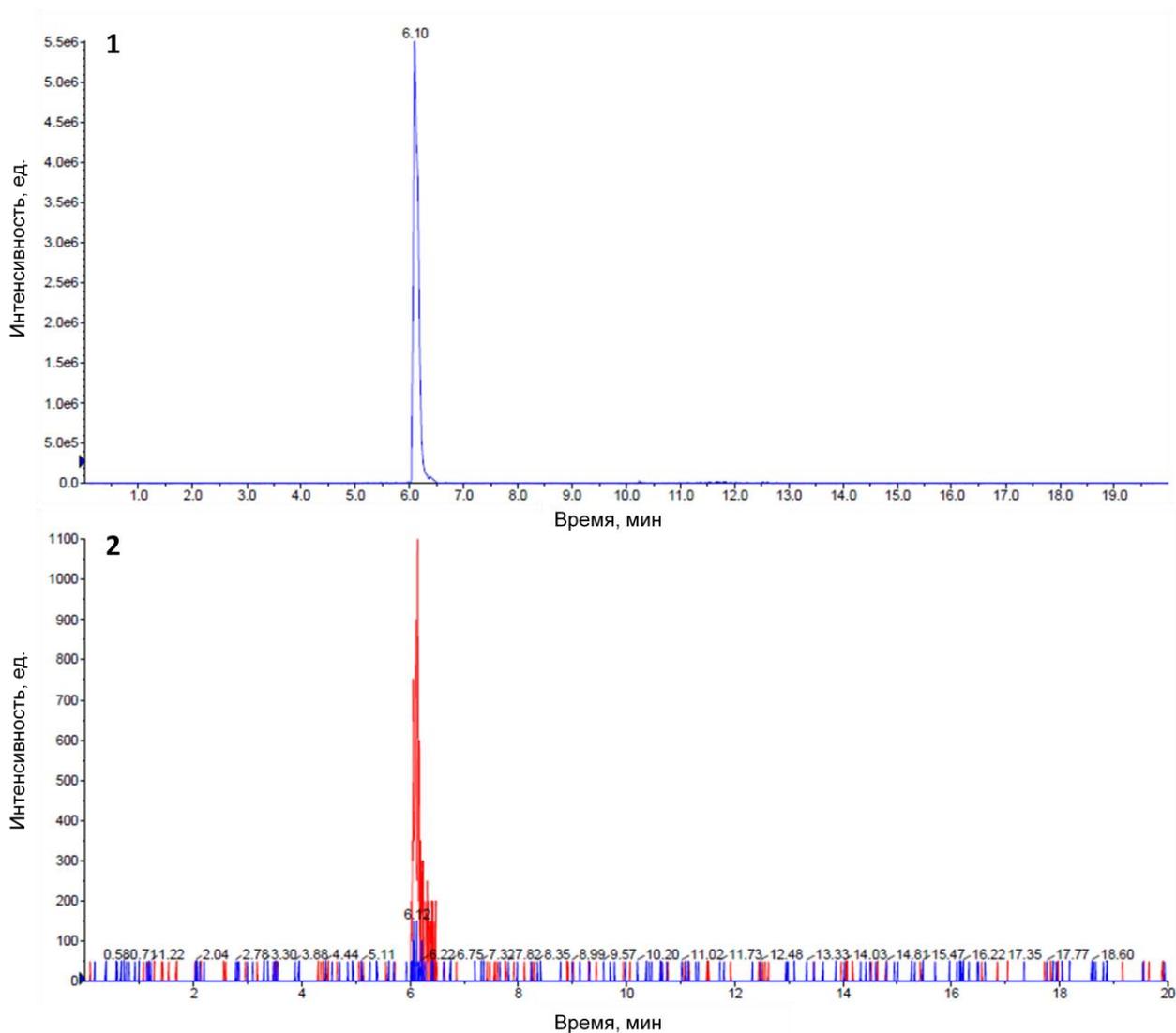


Рис. 13. Хроматограммы раствора гинсенозида Rg1 (2 мкг мл⁻¹), полученные в режиме сканирования с использованием ЛИЛ (1) и в режиме регистрации выбранных ионных переходов (2).

3.1.2 Разработка способов определения псевдогинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов

Как было выяснено выше (раздел 3.1.1) псевдогинсенозиды склонны к образованию протонированных и депротонированных молекул при ИЭР, интенсивности этих сигналов близки, но масс-спектр фрагментных ионов в режиме регистрации отрицательных сигналов демонстрирует присутствие лишь небольшого числа характеристичных фрагментов. Поэтому, рассмотрим целесообразность применения режима регистрации положительно заряженных ионов на примере другого псевдогинсенозида - F11 (рис. 23).

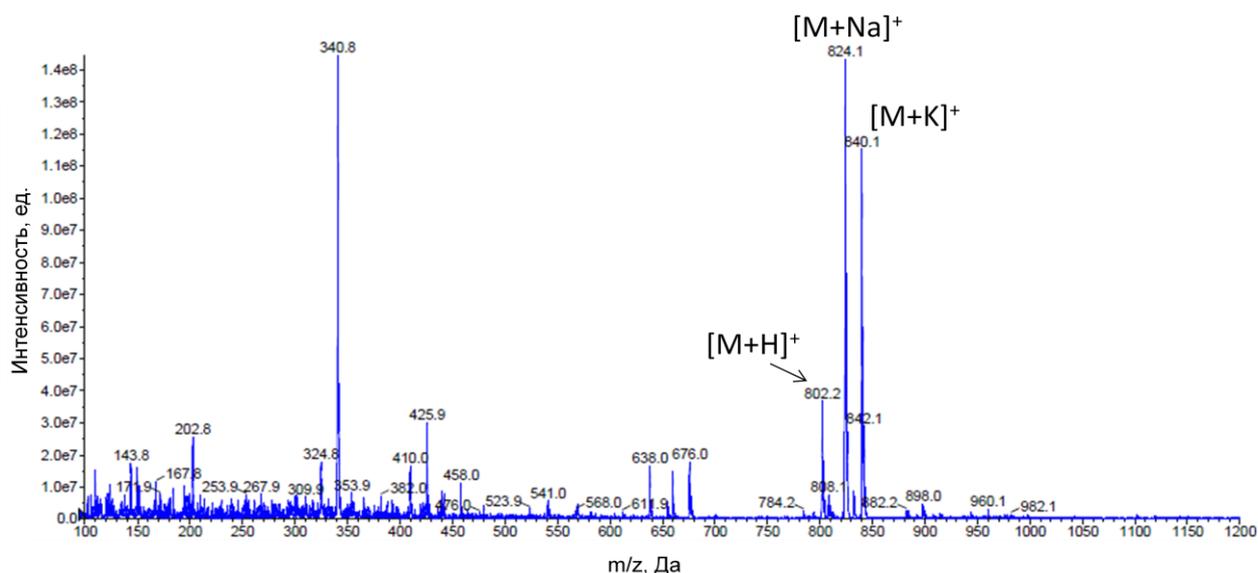


Рис. 14. Масс-спектр 10 мкг/мл водного - ацетонитрильного раствора F11. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

Для получения большей интенсивности сигнала протонированной молекулы (m/z 801) псевдогинсенозида F11 выбирали подходящие параметры детектирования ПД и ВП, аналогично экспериментам в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (раздел 3.1.1). На рисунках 15 и 16 представлены соответствующие зависимости.

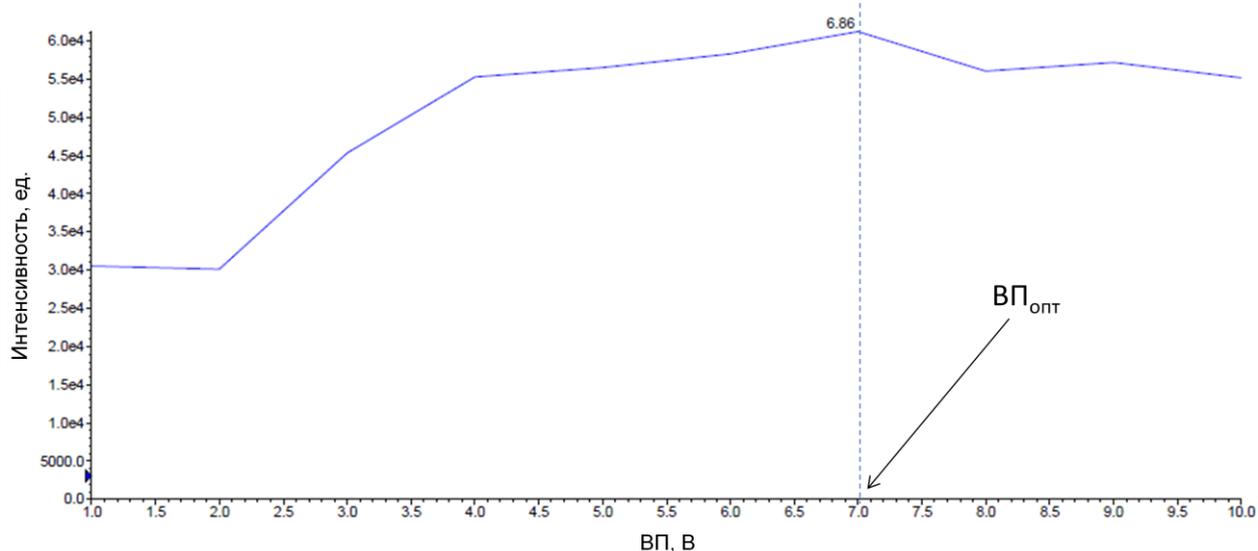


Рис. 15. Оптимизация ВП нулевого квадруполя масс-спектрометрического детектора при детектировании молекулярного иона F11 с $m/z=801$. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

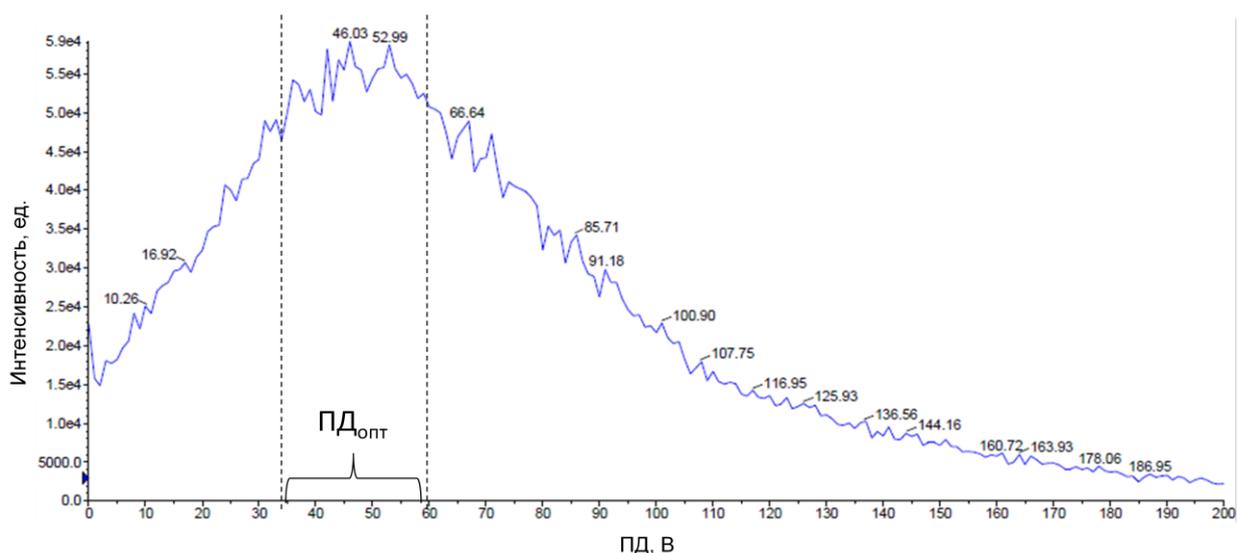


Рис. 16. Оптимизация ПД масс-спектрометрического детектора при детектировании молекулярного иона F11 с $m/z=801$. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

Исходя из приведенных зависимостей, для регистрации протонированной молекулы F11 следует использовать ВП около 7 В и ПД в районе 50 В. Спектр фрагментных ионов (рис. 17) выгодно отличается от полученного в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (рис. 12) по количеству характеристичных сигналов и их интенсивностям.

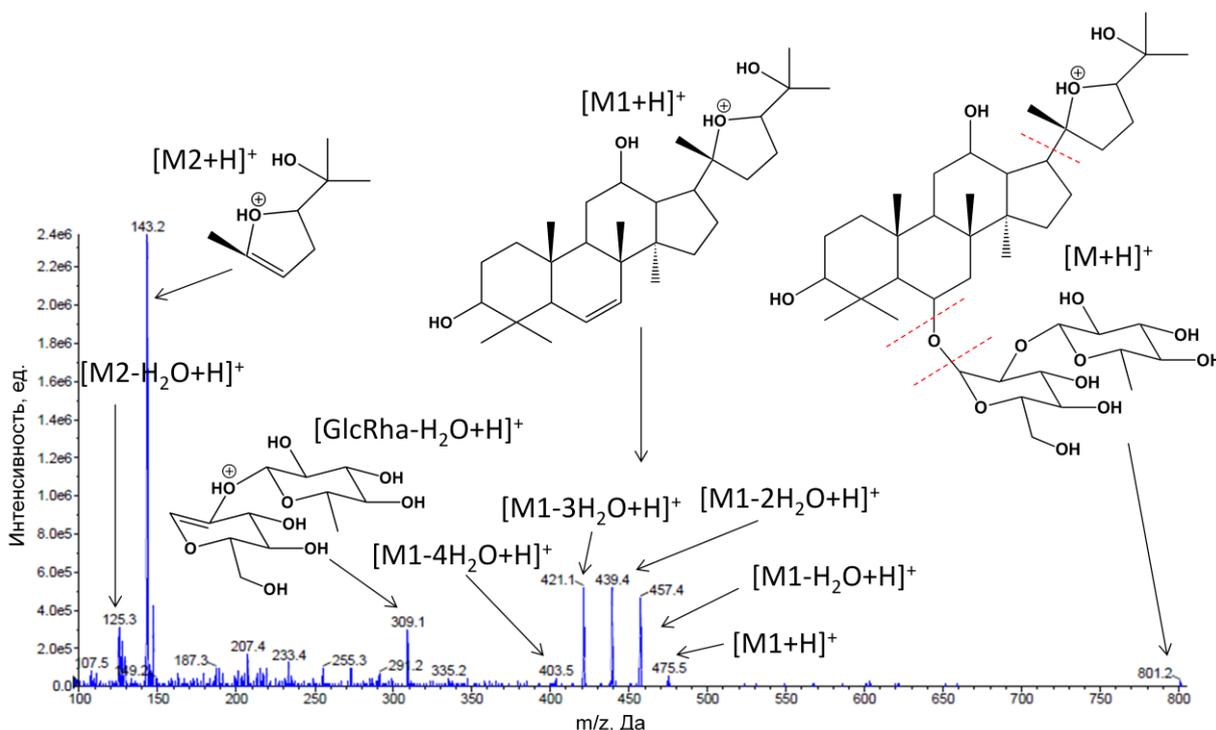


Рис. 17. Спектр фрагментных ионов и их структуры для депротонированной молекулы F11 с $m/z=801$. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

Для количественного и качественного анализа продукции, содержащей женьшень, на псевдогинсенозиды следует выбрать два фрагментных иона. Для количественного анализа следует использовать самый интенсивный ион (m/z 143), а для качественного – характерный для ОТ сапогенина ион с m/z 439. Выбор оптимальных значений ЭС для этих двух ионов представлен на рисунках 18 и 19.

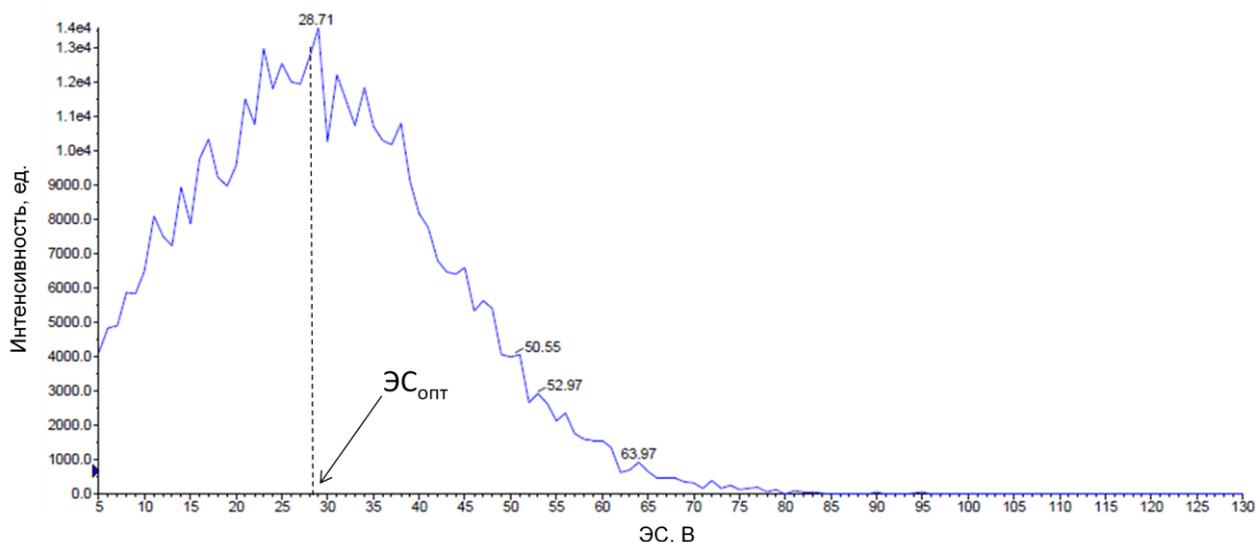


Рис. 18. Оптимизация ЭС с образованием фрагментного иона (m/z 439) из депротонированной молекулы F11 с $m/z=801$. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

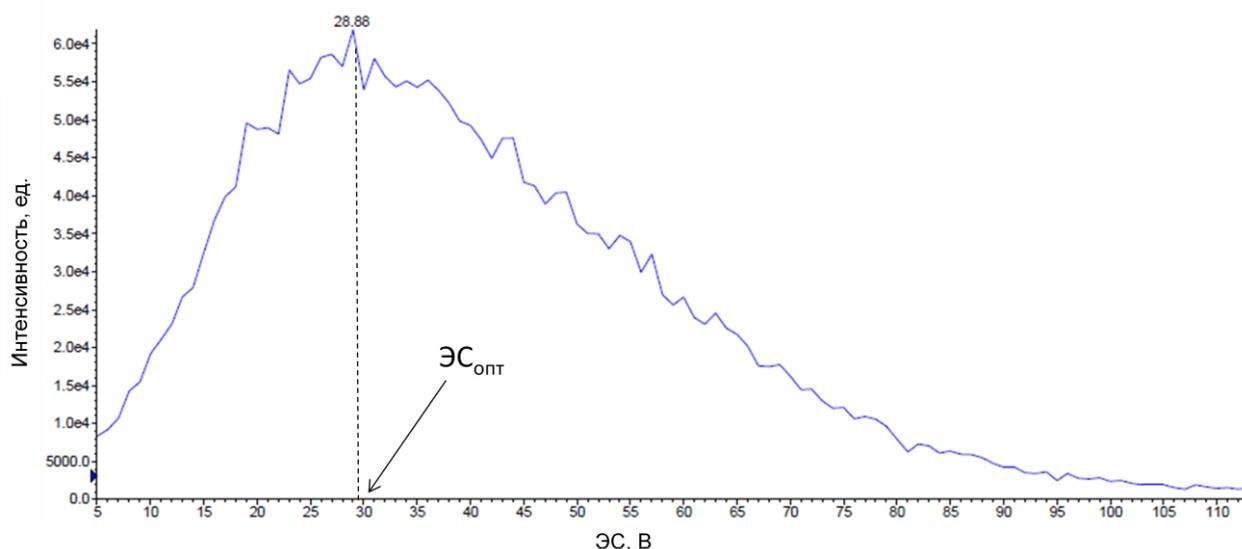


Рис. 19. Оптимизация ЭС с образованием фрагментного иона (m/z 143) из депротонированной молекулы F11 с $m/z=801$. Режим ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

Таким образом, интенсивности выбранных ионных переходов в оптимизированных условиях детектирования (табл. 4) оказались в диапазоне 1-10

(*10⁴) ед., что обуславливает возможность обнаружения псевдогинсенозидов даже при малых содержаниях в образце. Для количественного анализа следует использовать самый интенсивный ион (m/z 143), а для качественного – характерный для октиллольного сапогенина ион с m/z 439.

Для оценки пределов обнаружения, достигаемых с помощью регистрации в режиме выбранных ионных переходов, подбирали подходящие условия хроматографического разделения для двух коммерчески доступных стандартных псевдогинсенозидов RT5 и F11. В качестве неподвижной фазы при определении F11 и RT5 в пробах использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом Acclaim RSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм, фирмы «Thermo». При хроматографическом определении F11 и RT5 использовали изократическое элюирование 32% раствором ацетонитрила в деионизированной воде с добавкой 0.34% муравьиной кислоты. В данных условиях

Таблица 4. Хромато-масс-спектрометрические условия разделения при определении F11 и RT5

Параметр	Выбранное значение
объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	30 °С;
скорость подачи элюента	0.40 мл/мин;
подвижная фаза	32% Ацетонитрил 68% раствор HCOOH (0.5%)
потенциал декластеризации (ПД)	50 В
входной потенциал на нулевом квадруполе (ВП)	7 В
энергия соударений (ЭС)	30 В
выбранные ионные переходы F11	801 → 439 801 → 143
выбранные ионные переходы RT5	655 → 439 655 → 143
полярность регистрируемых ионов	Положительные

коэффициенты емкости (k') F11 и RT5 равняются 5.1 и 5.6 соответственно, и являются приемлемыми при разделении этих компонентов при их совместном присутствии (оптимальное значение коэффициента емкости должно быть в диапазоне от 1 до 10). В таблице 4 представлены выбранные хромато-масс-спектрометрические условия определения F11 и RT5.

Полученные в выбранных условиях значения хроматографических параметров приведены в таблице 5, а на рисунке 20 представлена хроматограмма 200 нг/мл раствора смеси псевдогинсенозидов F11 и RT5.

Таблица 5. Хроматографические параметры при разделении F11 и RT5. При расчетах использовали величину мертвого времени равного 0.80 мин

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

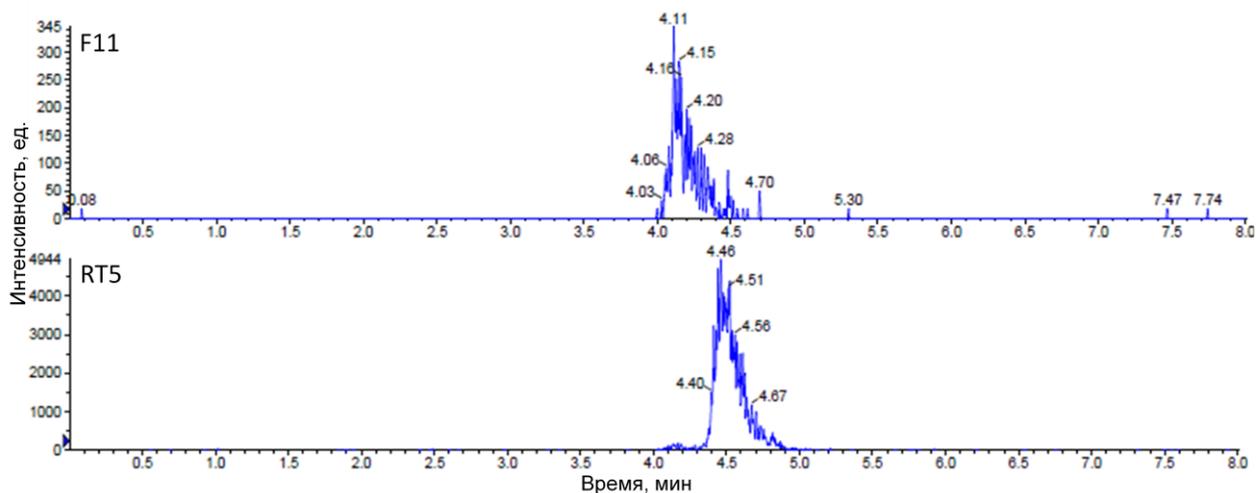


Рис. 20. Хроматограммы стандартной смеси псевдогинсенозидов F11 и RT5 (200 и 300 нг мл⁻¹), полученные в режиме регистрации ионных переходов с m/z 801→143 и 655→143, соответственно.

С использованием стандартных растворов (раздел 2.2.1) были определены метрологические характеристики разработанного способа определения псевдогинсенозидов (табл. 6).

Таблица 6. Метрологические характеристики предложенного подхода определения псевдогинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов

Вещество	Диапазон линейности, нг мл ⁻¹	Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r ²	Предел обнаружения в водном растворе, нг мл ⁻¹
F11	50—2000	$y = 7x - 56$	0.9999	20
RT5	30—3000	$y = 103x + 2040$	0.9999	10

3.1.3 Выбор условий ВЭЖХ-МС детектирования гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ

Как было показано в разделе 3.1.1, наилучшим способом ионизации для гинсенозидов является ИЭР, причем более характеристичные и интенсивные сигналы получаются в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для чувствительного детектирования ППД, ППТ и псевдогинсенозидов, а также их менее распространенных аналогов было решено использовать сканирование с использованием ЛИЛ тройного квадрупольного масс-анализатора, в специальном режиме сканирования с использованием ЛИЛ (рис. 21).

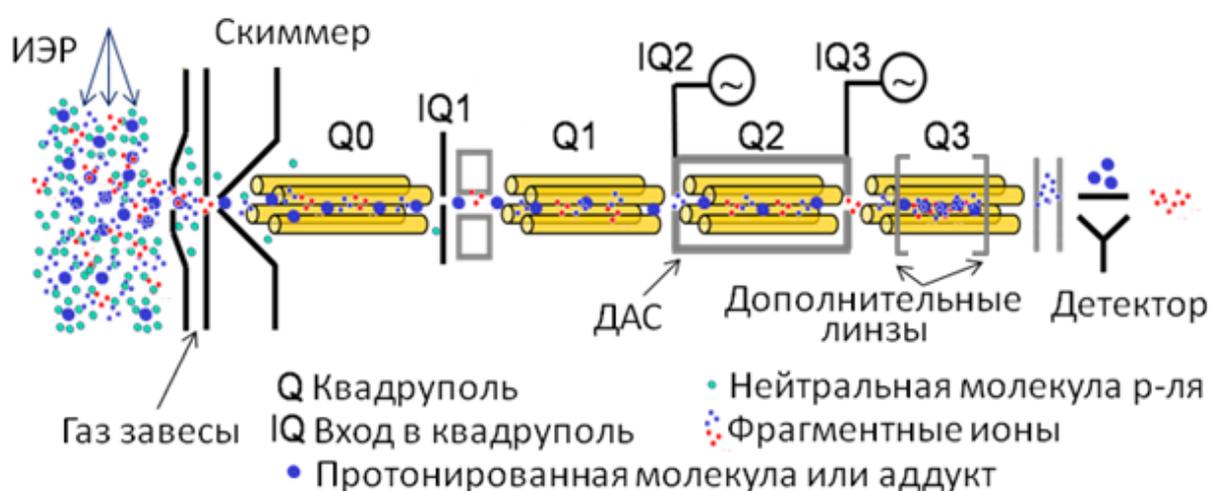


Рис. 21. Процесс регистрации сигналов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.

В данном режиме сканирования происходит образование молекулярного иона и аддуктов, а также их фрагментов в источнике ионизации, с последующим прохождением этих ионов через нулевой и первый квадруполи, их ДАС во втором квадруполе и накоплением в третьем квадруполе, функционирующем в качестве ЛИЛ. Затем стабилизированные в ЛИЛ ионы порциями (с определенным m/z)

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

Критерием выбора значений ПД, ВП, ЭС и других параметров было соблюдение двух условий: во-первых, высокая интенсивность аддукта молекулярного иона с натрием в масс-спектре, так как именно он позволяет определить молекулярную массу гинсенозида, и, во-вторых, наличие интенсивных сигналов основных фрагментов, так как по ним удобней проводить количественную оценку содержания гинсенозидов в образце, определять тип сапогенина и заместителей. На первый взгляд, эти два условия противоречат друг другу (поскольку фрагментные ионы получаются из молекул аналита, также способных образовывать аддукты), однако во время экспериментов было выяснено, что фрагментация молекул гинсенозида идет, главным образом, в источнике ионизации при любых условиях, поэтому не требуется увеличивать ЭС для получения нужных фрагментов во втором квадруполе. По этой причине значение ЭС было установлено минимальным и равным 5 В, что гарантировало получение более интенсивных сигналов протонированных молекул женьшеневых сапонинов и их аддуктов с натрием и калием, значения m/z которых позволяют установить молекулярную массу аналита.

Для выбора оптимальных значений ВП и ПД использовали раствор гинсенозидов Rg1 и Rb1 с концентрацией 2 мкг/мл. Хроматографирование проводили в изократическом режиме (раздел 2.2.1). Полученные в выбранных условиях хроматографические пики гинсенозидов Rb1 и Rg1, представлены на рисунке 22.

Условия ИЭР в ВЭЖХ-МС анализе с использованием сканирования с использованием ЛИЛ в режиме регистрации положительно заряженных ионов (температура в источнике – 350 °С, потоки газа-распылителя - 2.7×10^5 Па, газа-осушителя – 2.7×10^5 Па и газа-завесы – 1.0×10^5 Па) были заданы в соответствии с рекомендацией производителя масс-спектрометра для скоростей потока 0.4-0.7 мл/мин и водных подвижных фаз.

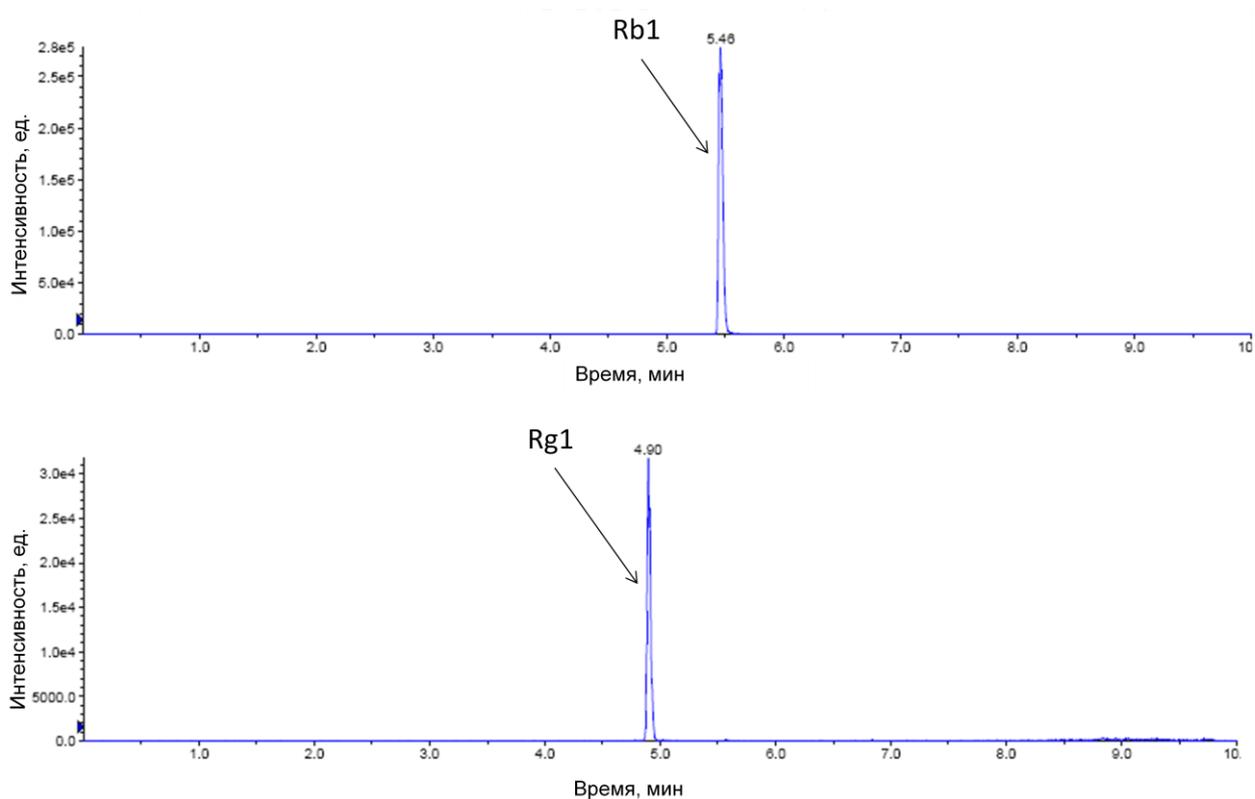


Рис. 22. Хроматограммы стандартных растворов гинсенозидов Rg1 и Rb1, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте регистрации положительных ионов.

При выбранном значении ВП = 10 В варьировали значения ПД с шагом в 10 В. Значения площадей пиков получали по выбранным сигналам из промежутков (шириной 2 Да с центром, соответствующим молекулярному аддукту гинсенозида с натрием) выделенным из полного диапазона сканирования (100-1400 Да) при хроматографировании растворов с концентрацией 2 мкг/мл (рис. 23).

В экспериментах со стандартными растворами 17 гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ было установлено, что даже при минимальном значении ЭС в масс-спектрах присутствуют интенсивные фрагментные ионы, образующиеся в источнике ИЭР, а интенсивность сигналов аддуктов молекул гинсенозидов сильно уменьшается при увеличении ЭС. Таким образом, для регистрации масс-спектров женьшеневых сапонинов в выбранном режиме сканирования использовали следующие величины параметров: ВП – 10 В, ПД – 70 В и ЭС – 5 В. Полученные в выбранных условиях спектры пиков из 17 стандартных растворов гинсенозидов приведены на рисунках П1-П17 приложения.

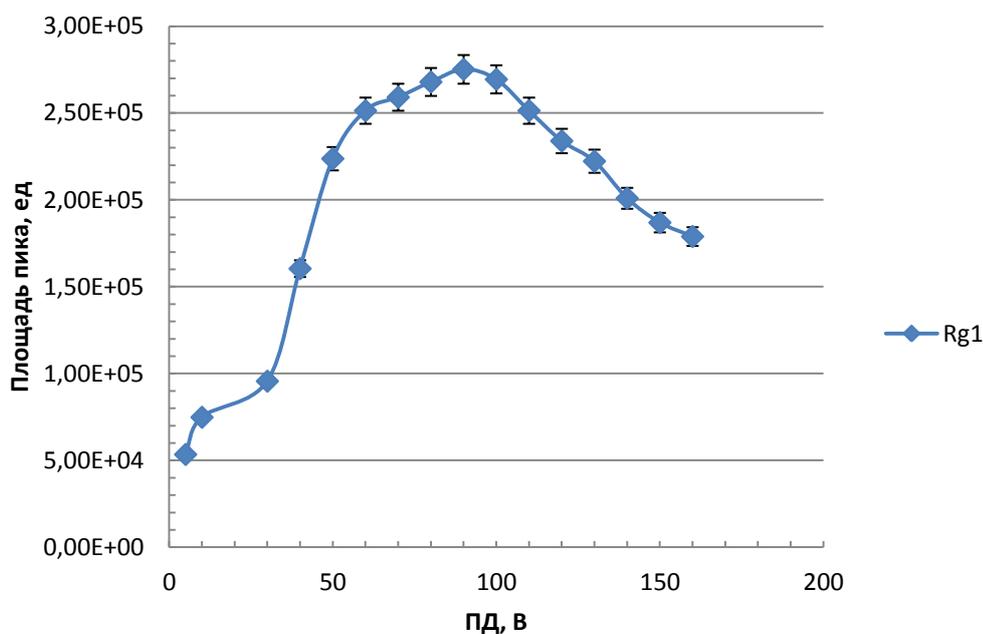


Рис. 23. Зависимость площади пика гинсенозида Rg1 от заданной величины ПД при масс-спектрометрическом детектировании в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.

Тандемное МС детектирование позволяет обойтись без полного хроматографического разделения всех компонентов пробы, однако применение такового позволяет снизить загрязнение источника ионизации и повысить достоверность обнаружения. Так же, правильный выбор рН подвижной фазы на стадии хроматографического разделения позволяет повысить чувствительность определения, за счет увеличения доли заряженной формы определяемого вещества в растворе. В случае гинсенозидов, проявляющих слабые кислотные свойства, оптимально использование сильно кислых подвижных фаз, что позволяет перевести аналиты в форму протонированных молекул или аддуктов с находящимися в растворе катионами металлов. Таким образом, в качестве элюентов были выбраны ацетонитрил (элюент В) и 0.5% водный раствор муравьиной кислоты (элюент А). В качестве неподвижной фазы, используемой для хроматографического разделения, был выбран сорбент на основе силикагеля, модифицированный группами С18 (Acclaim RSLC). Использовали две колонки, заполненные этим сорбентом, размерами 150×2.1 мм и диаметром зерна сорбента 2.2 мкм и 150×2.1 мм (3 мкм). На данном этапе работы так же параллельно варьировали программу градиентного элюирования по ацетонитрилу, таким образом, чтобы добиться максимальной эффективности, чувствительности и

оптимального коэффициента емкости (от 1 до 5). Выбранные программы градиентного элюирования представлены на рисунке 24.

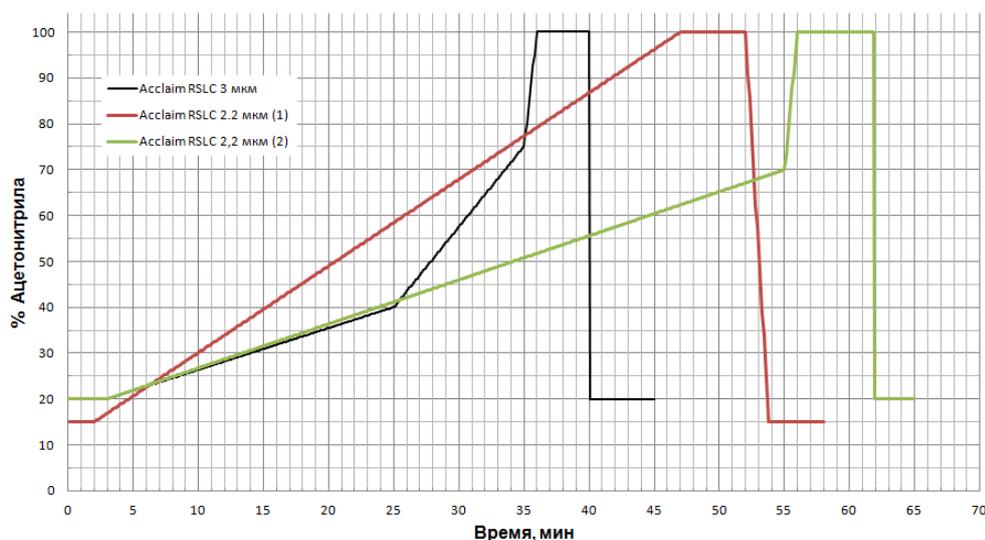


Рис. 24. Программы градиентного элюирования на колонках Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 2.2 мкм и 3 мкм.

Измерение проводили в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в качестве пробы использовали водный раствор смеси 17 стандартных гинсенозидов с содержанием 10 мкг/мл. При использовании 1 программы градиентного элюирования (рис. 24) на колонке с диаметром зерна сорбента 2.2 мкм не удалось добиться приемлемого разделения гинсенозидов Rg1 и Re. Последующая оптимизация способа разделения на выбранном сорбенте привела к решению этой проблемы (рис. 25).

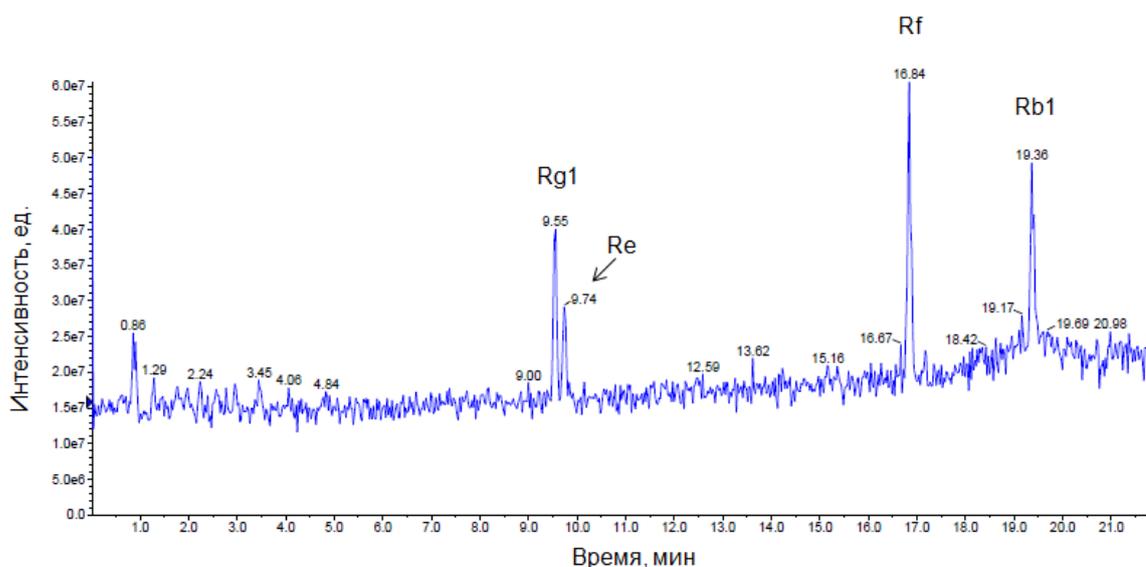


Рис. 25. Хроматограмма стандартной смеси гинсенозидов Rg1, Rf, Re и Rb1 на колонке Acclaim RSLC 120 C18 (2.2 мкм) при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл мин⁻¹.

Колонка той же фирмы с диаметром зерна сорбента 3 мкм также оказалась пригодна для разделения выбранных гинсенозидов. В таблице 7 приведены достигнутые характеристики разделения на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 3 мкм. Продолжительность хроматографического анализа составила 45 мин. На рисунке 26 представлены хроматограммы двух стандартных смесей, содержащих суммарно 17 гинсенозидов.

Таблица 7. Параметры хроматографического разделения гинсенозидов в выбранных условиях градиентного элюирования на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 3 мкм

Гинсенозид	Время удерживания, мин	Разрешение пиков	Эффективность, ТТ/м	Симметрия
R1	8.10	7.50	60000	1.0
Rg1	9.45	1.2	130000	1.0
Re	9.64	36	133000	1.1
F11	16.71	0.04	194000	1.0
RT5	16.72	1.1	178000	1.0
Rf	16.99	9.6	183000	1.0
Rg2	19.30	0.14	240000	1.1
Rh1	19.33	1.3	340000	1.0
Rb1	19.60	4.6	320000	1.0
Rc	20.47	4.5	530000	1.0
Rb2	21.40	1.6	290000	0.9
Rb3	21.78	0.7	300000	1.0
F1	21.95	6.0	310000	1.1
Rd	23.37	40.5	380000	0.9
Rg3	30.26	21.7	2800000	1.0
C-K	33.51	4.3	1150000	1.0
Rh2	34.24	-	1900000	1.0

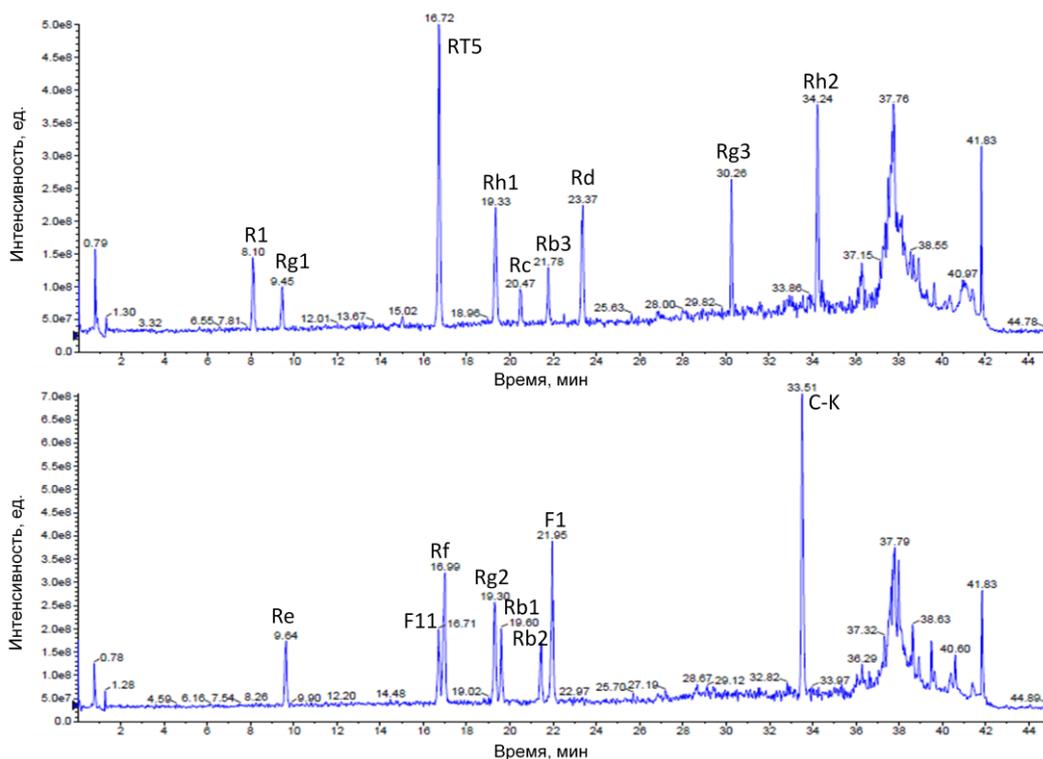


Рис. 26. Хроматографическое разделение гинсенозидов в выбранных условиях градиентного элюирования на колонке Acclaim RSLC C18 с диаметром зерна сорбента 3 мкм.

3.2 Разработка способов количественной оценки содержаний гинсенозидов

Выбранные в разделах 3.2 и 3.3 условия хромато-масс-спектрометрического определения гинсенозидов были далее использованы для разработки способов измерения содержаний этих веществ в образцах корня женьшеня и других коммерческих продуктах. Для оценки количественного содержания гинсенозидов, вначале, необходимо сравнить интенсивности сигналов в масс-спектрах для выбора оптимального способа регистрации хроматограмм (рис. 27).

Для оценки содержания в смеси или образце гинсенозидов с ППТ сапогенинами, например Rg1, Rf и Re, можно использовать ионы с m/z 459.4, 441.4, 423.4 и 405.5, а для гинсенозидов с ППД сапогенинами, например Rb1, были выбраны ионы с m/z 443.4, 425.4 и 407.5. Эти наборы ионов не только являются характеристичными для ППД и ППТ гинсенозидов, но и являются самыми интенсивными (рис. 27). Интенсивности выбранных ионов близки, и все они соответствуют сапогенину с потерей некоторого числа молекул воды, поэтому

суммирование интенсивностей данных сигналов гарантирует получение лучших пределов обнаружения, независимо от изменений условий проведения анализа.

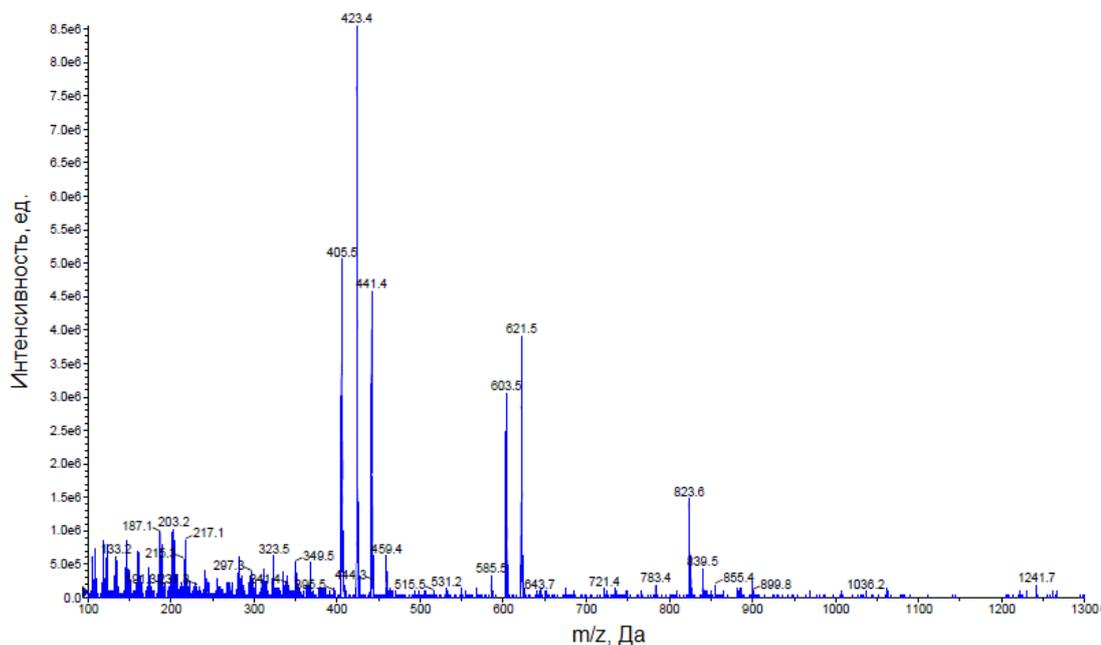


Рис. 27. Масс-спектр гинсенозида Rg1, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в выбранных условиях ЖХ-МС определения.

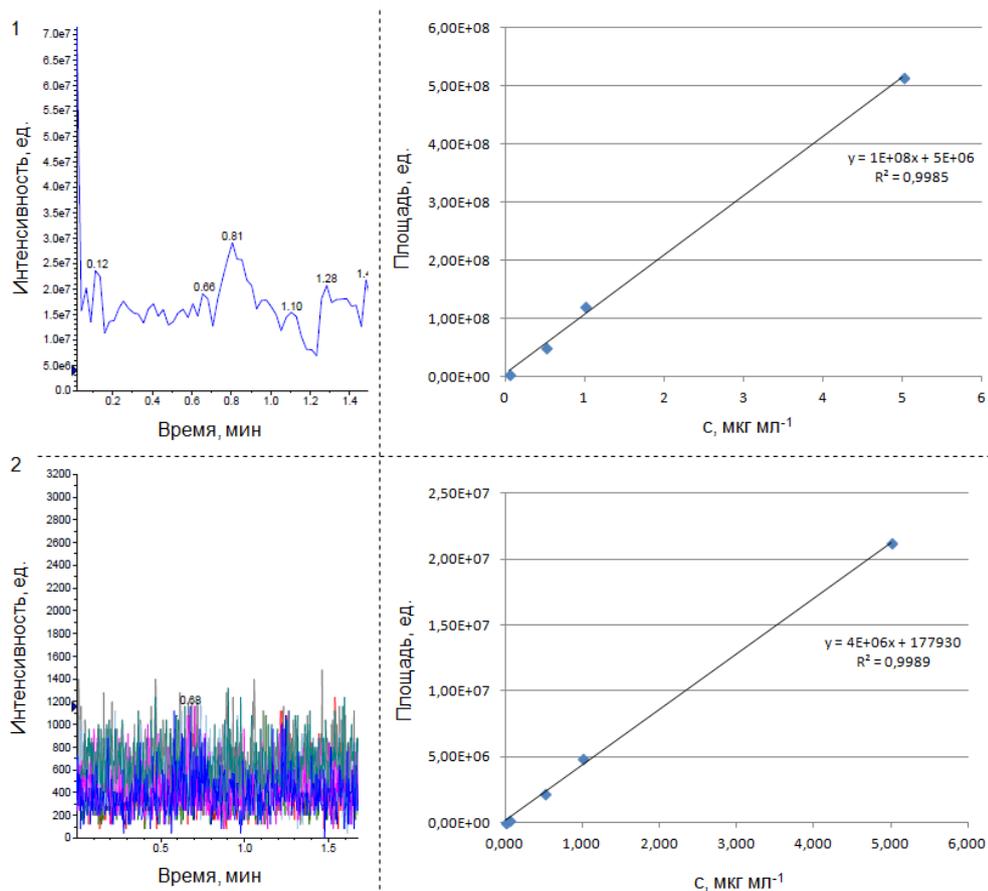


Рис. 28. Сравнение фона, шума и градуировочных зависимостей для сканирования с использованием ЛИЛ (1) и режима селективной регистрации выбранных сигналов (2).

Для сравнения чувствительности определения данных соединений по сумме интенсивностей выбранных сигналов в водных растворах в режиме сканирования с использованием ЛИЛ и в режиме селективной регистрации тех же выбранных сигналов (рис. 28) можно использовать полученные значения пределов обнаружения (табл. 8), так как сравнивать их по значению коэффициента чувствительности не корректно из-за разных условий получения аналитического сигнала в данных режимах.

Из приведенных в таблице 8 данных можно заключить, что разница между этими способами определения незначительна, а использование режима сканирования, при котором третий квадруполь работает в качестве ЛИЛ, позволяет не только проводить достаточно чувствительное определение гинсенозидов, но и одновременно их идентификацию по характеристичным сигналам.

Таблица 8. Метрологические характеристики предложенного подхода определения гинсенозидов по суммарной интенсивности в режиме регистрации выделенных сигналов (2) и по суммарной интенсивности выбранных сигналов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ (1)

Вещество	Способ детектирования	Диапазон линейности, мкг мл ⁻¹	Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r^2	Предел обнаружения в водном растворе, мкг мл ⁻¹
Rg1	1	0.02–5	$y = 5.0 \times 10^7 x + 5.4 \times 10^6$	0.992	0.006
	2	0.02–5	$y = 4.8 \times 10^5 x + 2.0 \times 10^4$	0.999	0.006
Rf	1	0.01–5	$y = 10.2 \times 10^7 x + 4.5 \times 10^6$	0.999	0.003
	2	0.003–5	$y = 4.2 \times 10^6 x + 1.8 \times 10^5$	0.999	0.001
Re	1	0.03–5	$y = 3.2 \times 10^7 x + 1.4 \times 10^6$	0.998	0.009
	2	0.01–5	$y = 9.0 \times 10^5 x + 1.7 \times 10^4$	0.999	0.003
Rb1	1	0.04–5	$y = 1.4 \times 10^7 x + 0.3 \times 10^6$	0.999	0.01
	2	0.02–5	$y = 4.7 \times 10^5 x - 4.3 \times 10^5$	0.996	0.006

3.3 Разработка способов ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа

По литературным данным в корнях, листьях, ягодах некоторых растений семейства *Araliaceae* содержатся гинсенозиды различной структуры [8]. Переработка растительного материала обычно содержит стадии измельчения и высушивания, при этом гинсенозиды могут претерпевать химические превращения [207, 85]. Аналогичные процессы происходят при производстве лекарственных средств и других продуктов на основе женьшеня. Во время анализа растительного сырья и таких продуктов применяют различные способы пробоподготовки, что также приводит к изменению состава и структуры гинсенозидов. Таким образом, важно максимально упростить и сократить пробоподготовку, а также не использовать нагревание, выпаривание, концентрирование и прочие операции, приводящие к сильным изменениям в структуре гинсенозидов. Неизбежным, однако, является применение экстракции гинсенозидов из матрицы образца. На этой стадии используют различные органические растворители, воду и различные способы повышения степени извлечения, такие как ультразвук и микроволновое излучение, а также механическое перемешивание. Целью данной части работы была разработка быстрого способа извлечения гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня. Предполагалось использовать ультразвуковую экстракцию при различных условиях без последующего упаривания и перерастворения экстракта. Для этого было изучено влияние на эффективность экстракции таких факторов, как: состав экстрагирующей смеси, объем смеси и число последовательных актов экстракции, кроме того, была получена зависимость хроматографических параметров от состава экстрагента.

3.3.1 Проверка применимости экстракции гинсенозидов способом «введено – найдено»

При анализе объектов со сложной матрицей, например, растительного сырья эффективность жидкостной экстракции невозможно достоверно определить методом «введено – найдено», так как такая матрица является уникальной и уже содержит в себе неизвестное количество определяемых компонентов, кроме того, эти вещества содержатся в образце в связанной форме и эффективность их

извлечения существенно отличается от извлечения специально введенной добавки определяемого вещества или внутреннего стандарта. Поэтому применение метода «введено – найдено» является недостаточным для оценки степеней извлечения гинсенозидов из женьшеневого растительного сырья и продуктов на его основе.

Для подтверждения применимости жидкостной экстракции для извлечения гинсенозидов был проведен эксперимент с добавкой известных количеств гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc к сухому корню женьшеня и модельному образцу растительного сырья неизвестного состава, не содержащего женьшеня (рис. 29).

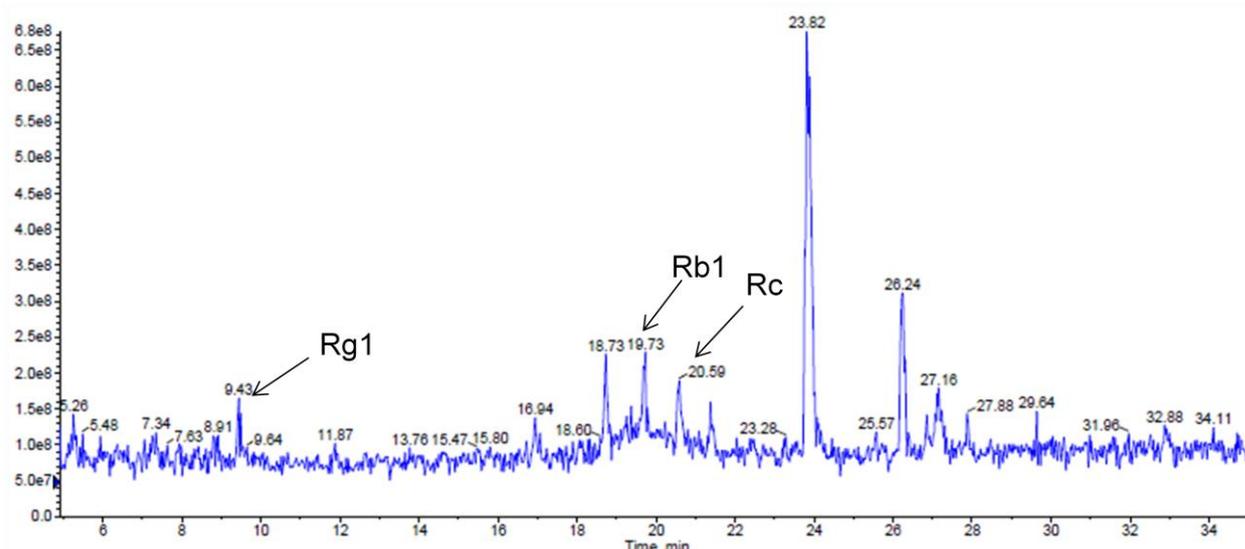


Рис. 29. Хроматограмма экстракта из модельного образца растительного сырья с добавкой гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc с концентрацией 4, 6 и 7 мг л⁻¹ экстракта.

Три навески образца корня, образца корня с добавкой и модельного образца растительного сырья с добавкой были проэкстрагированны смесью метанол:вода (1:4) соответственно описанию эксперимента 2.2.2. После этого экстракты были проанализированы методом ВЭЖХ-МС/МС вместе с модельной смесью гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rc в воде с концентрацией 4, 6 и 7 мг л⁻¹ соответственно. Для экстрактов из модельного образца растительного сырья и образца высушенного корня женьшеня с добавкой степени извлечения рассчитывались по формулам 1 и 2 соответственно.

$$R, \% = S_m / S_0 \times 100 \quad (1)$$

$$R, \% = (S_{xa} - S_x) / S_0 \times 100 \quad (2)$$

Где S_m – площадь пика на хроматограмме модельного образца с добавкой, S_0 – площадь пика на хроматограмме водной смеси гинсенозидов известной

концентрации, $(S_{xa} - S_x)$ – разность площадей пиков на хроматограмме образца высушенного корня женьшеня с добавкой и без добавки. Из таблицы 9 видно, что для двух исследованных образцов с добавкой наблюдается почти полное извлечение гинсенозидов, это связано с тем, что добавленные в виде раствора гинсенозиды находятся в несвязанной форме на поверхности растительного материала, поэтому они практически полностью смываются органическим растворителем во время экстракции. Таким образом, реальные степени извлечения гинсенозидов из растительного сырья существенно ниже.

Таблица 9. Содержание гинсенозидов в образцах растительного материала и образцах с добавкой ($N=3, P=0.95$)

Гинсенозид Образец	Rg1		Rb1		Rc	
	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %	S, ед. ($\times 10^7$)	R, %
Корень сух.	7.9 ± 0.2	-	45 ± 1	-	9.1 ± 0.2	-
Корень сух. с добавкой	18.1 ± 0.4	98.8	50 ± 1	94.4	14.5 ± 0.3	99.1
Модельный образец с добавкой	10.9 ± 0.2	106.9	4.4 ± 0.1	79,3	4.8 ± 0.1	86.6
Стд. водный раствор	10.2 ± 0.2	-	5.5 ± 0.1	-	5.5 ± 0.1	-

3.3.2 Сравнение хроматографических параметров разделения при использовании различных органических растворителей

Элюирующая сила подвижной фазы определяется ее составом. В проведенных экспериментах начальный состав подвижной фазы: ацетонитрил:вода (1:4). Для того чтобы избежать размывания хроматографической зоны, пробу следует вводить в систему после перерастворения аналитов в начальной подвижной фазе или в фазе с максимально близким составом. В свою очередь на разделение определяемых веществ влияет состав матрицы анализируемого экстракта. При проведении экстракции и ВЭЖХ-МС/МС определения гинсенозидов непосредственно в экстракте необходимо подобрать подходящий экстрагент таким образом, чтобы не происходило сильного размывания и

перекрывания пиков на хроматограмме. На первой стадии эксперимента в качестве экстрагентов использовали 20% смеси метанола, этанола и ацетонитрила с водой. В таблице 10 представлены хроматографические параметры для нескольких гинсенозидов при анализе полученных экстрактов напрямую методом ВЭЖХ-МС/МС. Из полученных значений видно, что использование смеси ацетонитрил:вода не приемлемо, так как наблюдается плохое разрешение пиков, связанное с экстракцией мешающих компонентов матрицы образца сухого корня женьшеня. Параметры удерживания и разрешения пиков на хроматограммах экстрактов 20% растворами метанола и этанола являются приемлемыми.

На второй стадии эксперимента были рассчитаны хроматографические параметры для экстрактов различными смесями воды и этанола. Исходя из полученных значений (табл. 11) можно сделать вывод, что наилучшая эффективность и разрешение хроматографических пиков наблюдается при экстракции 20% этанолом. Плохая эффективность и разрешение пиков может приводить к ухудшению качества получаемых масс-спектров и количественных измерений.

3.3.3 Изучение эффективности извлечения гинсенозидов

Во всех экспериментах применяли жидкостную экстракцию на ультразвуковой бане. Для ориентировочной оценки необходимого для экстракции объема экстрагента использовали смесь метанол:вода (1:4). Экстракты анализировали напрямую. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Для сравнения эффективности извлечения (рис. 30) учитывался различный объем добавленного экстрагента, концентрация гинсенозида R_d приводится в пересчете на грамм свежего измельченного образца корня азиатского женьшеня. После экстракции 10 мл экстрагента проводили последовательную экстракцию 20 мл и 30 мл, двумя и тремя порциями по 10 мл, соответственно, для повышения эффективности.

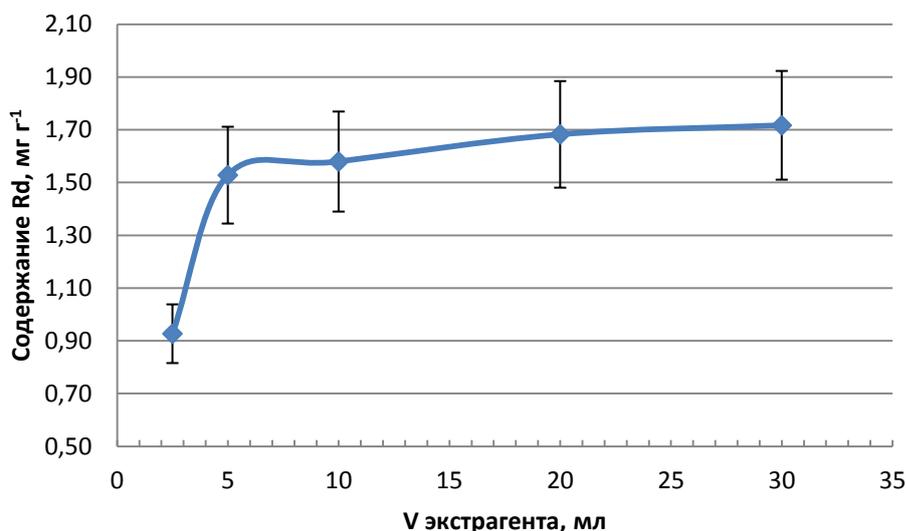


Рис. 30. Зависимость содержания гинсенозида Rd от объема экстрагента и числа экстракций.

Согласно рисунку для удовлетворительной экстракции достаточно 5-10 мл экстрагента, при этом последовательная экстракция несколькими порциями такого объема не приводит к значительному увеличению степени извлечения. Для того чтобы оценить выигрыш в извлечении гинсенозидов при последовательной экстракции несколькими порциями растворителя, а также для проверки применимости используемого подхода для экстракции из корейского женьшеневого чая (образец 2) и сравнения с экстракцией из свежего измельченного корня женьшеня (образец 1). В таблице 12 площади пиков на хроматограммах экстрактов первой порцией 10 мл 20% метанола в воде приняты за 100%. Площади пиков, а, следовательно, и количество гинсенозидов извлекаемых суммарно во время 2 и 3 экстракций находится на уровне 5—10% от общего извлеченного количества аналитов.

Более значимым фактором, влияющим на извлечение гинсенозидов из сложной матрицы, является состав экстрагента. В эксперименте по изучению зависимости степеней извлечения гинсенозидов от состава экстрагента (раздел 2.2.2), концентрацию гинсенозидов после 3-х последовательных экстракций 10 мл 20% метанола в воде приняли равной 100%. Однако степени извлечения при использовании однократной экстракции 10 мл смесей, содержащих 50% и 70% органических растворителей оказались в 1.5—2 раза выше (рис. 31).

Таблица 10. Хроматографические параметры для нескольких гинсенозидов при анализе образцов, проэкстрагированных различными растворителями, напрямую методом ВЭЖХ-МС/МС

Экстрагент	Ацетонитрил (20%)			Этанол (20%)			Метанол (20%)		
	Гинсенозиды	t_R , мин	N, ТТ	RS (Rg1/Re)	t_R , мин	N, ТТ	RS (Rg1/Re)	t_R , мин	N, ТТ
Rg1	9.4	34969	0.7	9.4	71824	1.2	9.4	43264	0.67
Re	9.6	6373	RS>>1	9.6	23642	RS>>1	9.6	7236	RS>>1
Rc	20.0	25549	RS<<1	20.0	39840	1.0	20.0	20367	0.94
Rb1	19.3	19641	RS<<1	19.5	16883	1.1	19.3	17139	0.85

Таблица 11. Хроматографические параметры для нескольких гинсенозидов при анализе образцов, проэкстрагированных различными концентрациями этанола в воде, напрямую методом ВЭЖХ-МС/МС

% этанола в подвижной фазе	Rg1			Re		Rc		Rb1	
	t_R , мин	N, ТТ	Rs	t_R , мин	N, ТТ	t_R , мин	N, ТТ	t_R , мин	N, ТТ
0	9.4	35344	0.61	9.6	4905	20.0	17707	19.3	16607
20	9.4	71824	1.18	9.6	23642	20.0	39840	19.4	16883
50	9.3	22237	0.47	9.5	3439	20.0	15193	19.4	16675
80	9.3	15277	0.60	9.5	4045	20.0	15118	19.3	16435
100	9.3	34299	0.80	9.6	4079	19.9	70685	19.3	23741

Таблица 12. Площади пиков гинсенозидов Rf и Rd на хроматограммах экстрактов из образца измельченного корня женьшеня (образец 1) и корейского женьшеневого чая (образец 2). ($N=3, P=0.95$)

Образец (№ экстракта)	Rd		Rf	
	S, ед. ($\times 10^6$)	%	S, ед. ($\times 10^6$)	%
Образец 1 (1 экстракция)	198 ± 4	100	257 ± 5	100
Образец 1 (2 экстракция)	11.4 ± 0.2	5.8	9.4 ± 0.2	3.7
Образец 1 (3 экстракция)	3.0 ± 0.1	1.5	2.6 ± 0.1	1
Образец 2 (1 экстракция)	261 ± 4	100	76 ± 2	100
Образец 2 (2 экстракция)	19.4 ± 0.3	7.4	4.3 ± 0.1	5.6
Образец 2 (3 экстракция)	8.14 ± 0.03	3.1	1.28 ± 0.02	1.7

R, % гинсенозида Rc

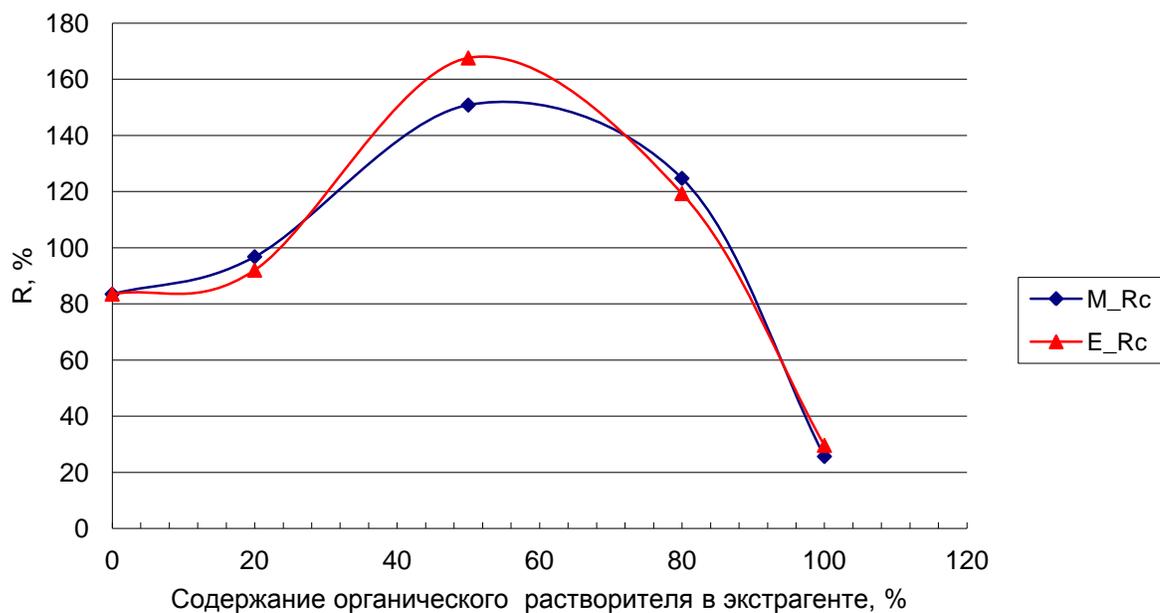


Рис. 31. Зависимость степени извлечения от концентрации органического растворителя в экстрагенте для гинсенозидов Rg1 и Rb1 (M – метанол, E – этанол).

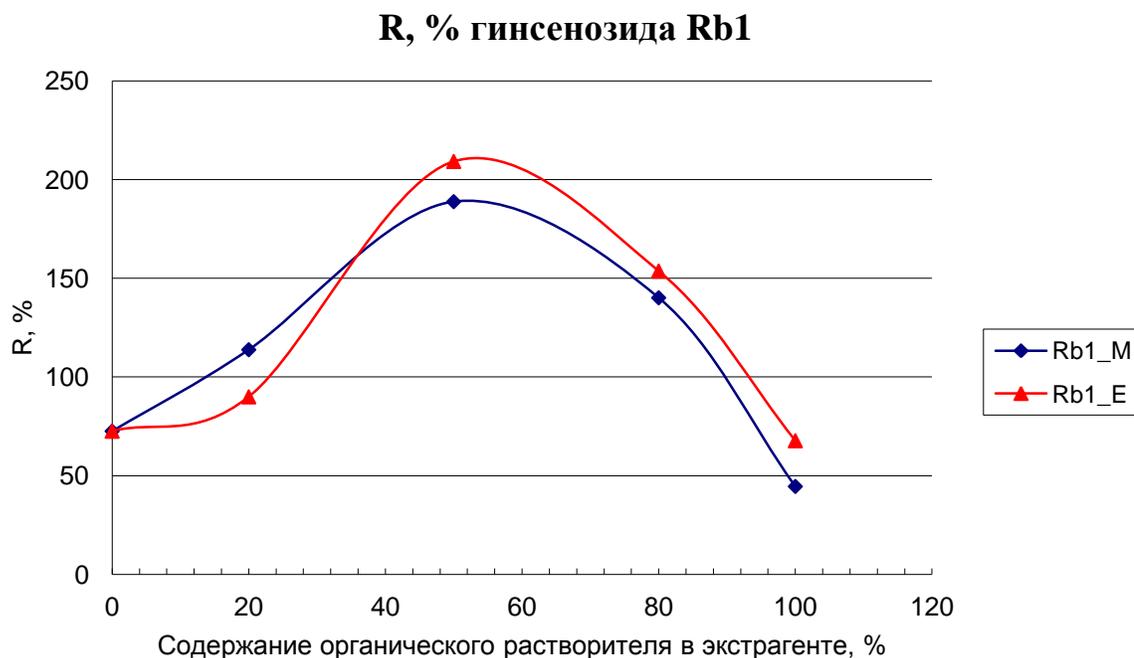


Рис. 31. Зависимость степени извлечения от концентрации органического растворителя в экстрагенте для гинсенозидов Rg1 и Rb1 (М – метанол, Е – этанол). (Продолжение)

Способом «введено-найдено» была подтверждена применимость разработанного способа экстракции гинсенозидов из свежего измельченного корня женьшеня, рассчитанные степени извлечения гинсенозидов Rg1, Rb1, Rc лежат в диапазоне от 80 до 110%. При использовании ультразвуковой экстракции при 30 °С гинсенозиды Rb1 и Rc не превращались в гинсенозиды Rg3 и Rh2. Использование смесей вода:метанол и вода:этанол с концентрацией органического растворителя 40—80% в качестве экстрагента хорошо подходит для количественных и полуколичественных исследований образцов растительного сырья и продуктов на основе женьшеня. Однако, из-за сильного размывания пиков (табл. 11) для идентификации неизвестных гинсенозидов и разделения изомеров лучше подходит экстрагент вода:этанол (4:1). Для ускорения процедуры пробоподготовки и скрининговых анализов коммерческих продуктов достаточно проводить одну экстракцию 10 мл растворителя, поскольку в таком случае потери аналитов не превышают 10—15% в сравнении с многократной экстракцией тем же растворителем.

ГЛАВА 4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ МАСС-СПЕКТРОВ ГИНСЕНОЗИДОВ. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ГРУППОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

4.1 Основные принципы интерпретации масс-спектров на примере стандартных гинсенозидов

4.1.1 Отличительные черты масс-спектров гинсенозидов

В разделе 3.1.3 были выбраны условия регистрации спектров в режиме сканирования с использованием ЛИЛ женьшеневых сапонинов в варианте регистрации положительно заряженных ионов. Масс-спектры 17 стандартных гинсенозидов представлены в приложении (рис. П1-П17). Такой масс-спектр гинсенозида можно разделить на три области (рис. 32). В первой области расположены сигналы протонированной молекулы, молекулярных аддуктов с натрием и калием, сигналы однозарядных кластеров из двух молекул сапонины, а также сигналы, соответствующие фрагментным ионам с потерей сахаридных заместителей. Во второй области расположены сигналы фрагментных ионов сапогенина с потерей некоторого числа молекул воды, протонированных боковых цепей, а также крупные фрагменты сапогенина. В третьей области с небольшими значениями m/z присутствуют важные для интерпретации масс-спектра сигналы моносахаридных фрагментов и других заместителей, а также более мелкие фрагменты сапогенина.

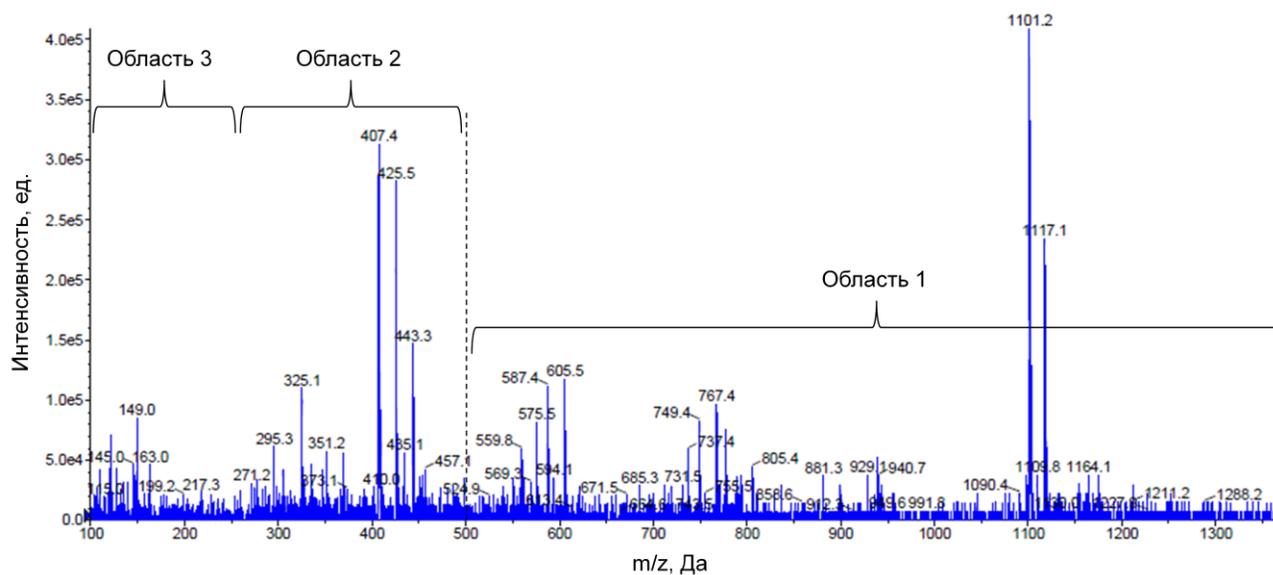


Рис. 32. Масс-спектр гинсенозида Rc, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Из значений m/z сигналов натриевого и калиевого аддукта можно вычислить молекулярную массу гинсенозида (табл. 13). Возможность образования таких аддуктов обусловлена присутствием в молекуле кислотных гидроксильных групп и сахаридных остатков.

Таблица 13. Рассчитанные значения молекулярной массы некоторых гинсенозидов и их аддуктов с натрием и калием.

Соединения	Молекулярная масса	Значение m/z сигнала иона $[M+Na]^+$	Значение m/z сигнала иона $[M-H]^-$
Rb1	1108.6	1131.5	1107.7
Rb2	1078.6	1101.4	1077.7
Rb3	1078.7	1101.6	1077.7
Rc	1078.6	1101.6	1077.5
Rg1	800.6	823.6	799.7
Rf	800.6	823.6	799.7
Re	946.5	969.5	945.5
Rd	946.5	969.5	945.5

Формирование положительного заряда также может происходить при протонировании свободных от заместителей гидроксильных групп с отщеплением одной или нескольких молекул воды. Причем гидроксильные группы, принадлежащие боковой цепи намного легче отщепляются по сравнению с гидроксильными заместителями в циклической части молекулы. Это можно продемонстрировать на примере гинсенозида F1, так, свободная гидроксильная группа при атоме углерода C20 легко отщепляется в виде молекулы H_2O с формированием двойной связи (рис. 33). Напротив, в молекуле гинсенозида Rh1 глюкозный заместитель расположен при атоме углерода C20, поэтому данная гидроксильная группа, как и соседняя с ней, намного меньше склонны к отщеплению и формированию сигнала с m/z 621.

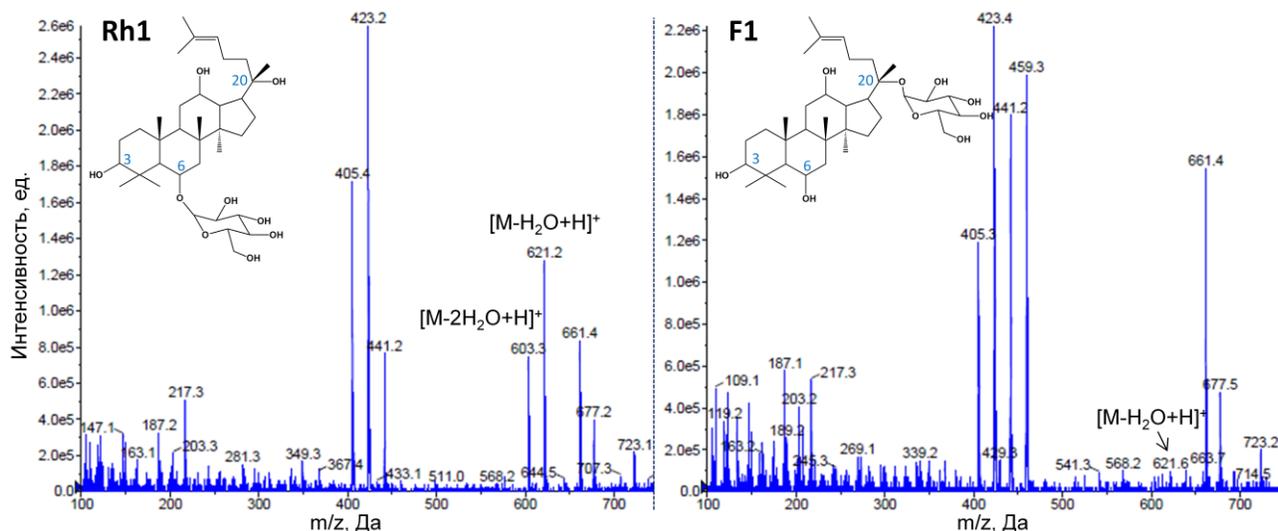


Рис. 33. Масс-спектры гинсенозидов Rh1 и F1, полученные в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Рассмотрим более сложные гинсенозиды Rf и Rg1 (рис. 34), которые содержат два глюкозных остатка. Как и гинсенозид Rh1, Rf содержит в структуре свободную гидроксильную группу при атоме C20, поэтому на его спектре появляются интенсивные сигналы ионов $[M-H_2O+H]^+$ и $[M-2H_2O+H]^+$ (m/z 783.2 и 765.5, соответственно). В спектре Rg1 эти сигналы не различимы от шума, однако, присутствует сигнал с m/z 661.3, соответствующий отщеплению глюкозного остатка при атоме C6 с освобождением гидроксильной группы и сохранением атома натрия, присоединенного, вероятно, группировкой атомов и глюкозным остатком поблизости атома C20 ($[M-Glc+Na]^+$).

Кроме того, очевидно, что вероятность отщепления одного глюкозного фрагмента от молекулы Rg1, где они расположены в разных позициях, больше, чем в случае гинсенозида Rf, в котором оба остатка образуют единую сахаридную цепь, и появляется возможность отщепления всей цепи путем разрыва одной глюкозидной связи. Таким образом, сигналы с m/z 621, 603 и 585, относящиеся к потере одного из глюкозных остатков и, дополнительно, 1 и 2 молекул воды, соответственно, имеют большую относительную интенсивность в масс-спектре гинсенозида Rg1 (рис. 34).

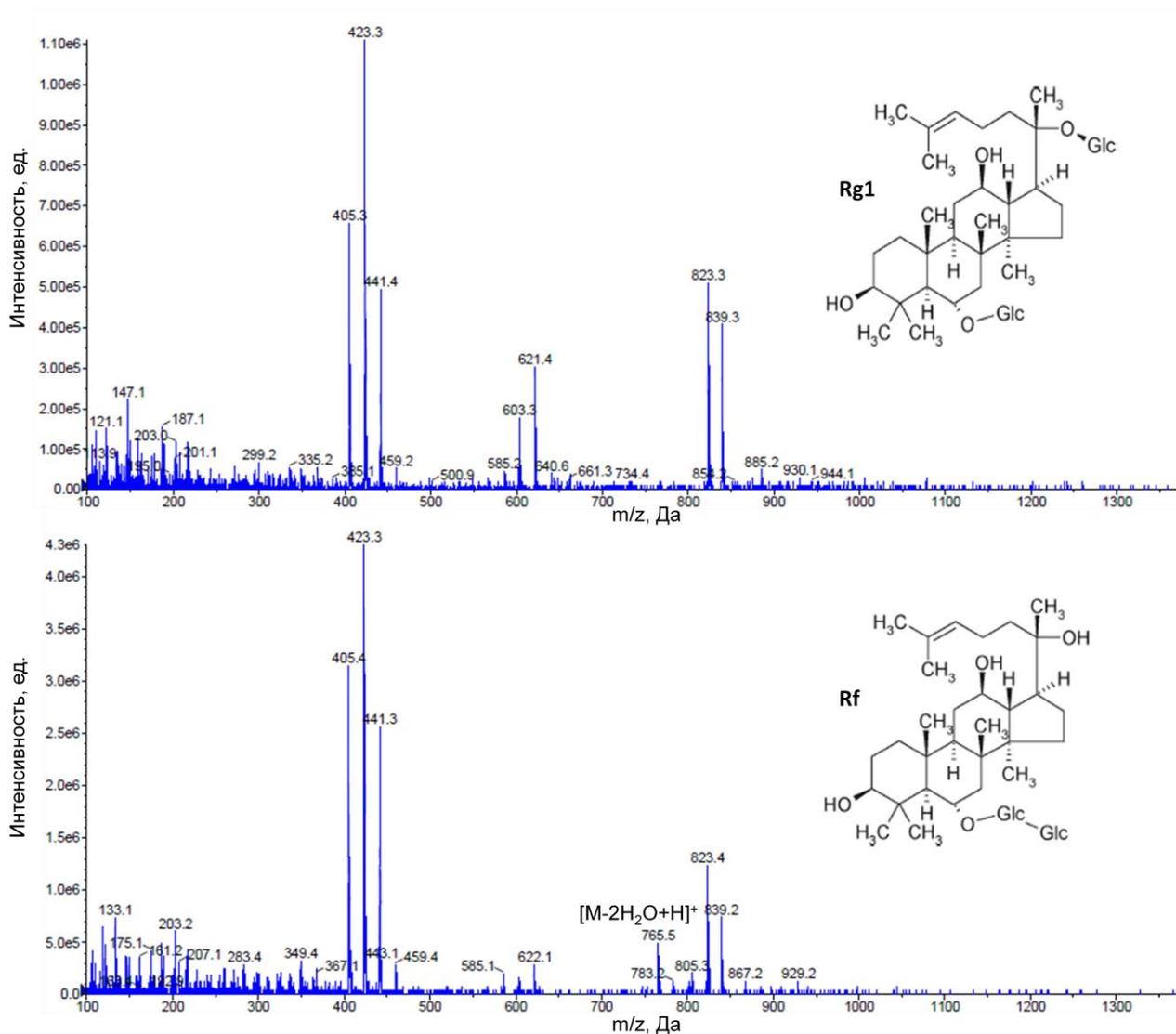


Рис. 34. Масс-спектры гинсенозидов Rg1 и Rf, полученные в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Используя полученные закономерности, можно перейти к рассмотрению гинсенозида R1, в составе которого один ксилозный и два глюкозных заместителя. Сигнал $[M-Xyl+Na]^+$ с m/z 823 совпадает по структуре с молекулярным натриевым аддуктом гинсенозида Rg1, что означает невозможность одновременного определения этих двух соединений в том случае, если их пики не разделены на хроматограмме (рис. 35). При отщеплении всей сахаридной цепи при атоме С6 образуется ион $[M-Glc-Xyl+Na]^+$ (m/z 661). Кроме того, можно отметить наличие сигналов $[M-Glc-H_2O+H]^+$ и $[M-Glc-Xyl-2H_2O+H]^+$, соответствующих отщеплению глюкозного остатка при атоме С20 и двух

крайних моносахаридов в заместителях, а также молекул воды (m/z 753 и 603 соответственно).

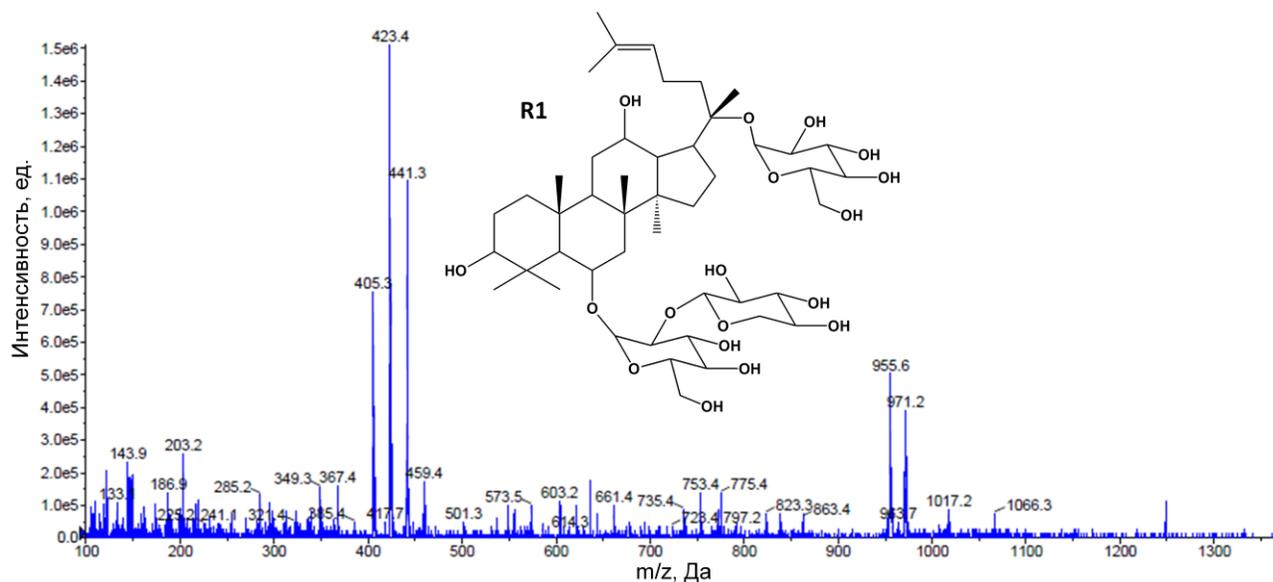


Рис. 35. Масс-спектр гинсенозида R1, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Приведенные закономерности появления сигналов в масс-спектрах ППТ гинсенозидов справедливы и для рассмотренных ППД гинсенозидов. Присутствие на масс-спектрах выше интенсивных ионов с m/z 459, 441, 423 и 405, которые используются для количественной оценки содержаний ППТ гинсенозидов (раздел 3.3), является качественной характеристикой этой подгруппы женьшеневых сапонинов. Так, гинсенозиды Re и Rd, имеющие одинаковую молекулярную массу (табл. 13), представляют две подгруппы – ППТ и ППД гинсенозидов, соответственно. Наличие дополнительной гидроксильной группы в положении 6 у ППТ гинсенозидов увеличивает полярность, поэтому на хроматограмме (рис. 26) эти два изомерных гинсенозида разделены на 14мин. Однако различить их можно и на основе масс-спектров. Так (рис. 36), ППД гинсенозид Rd при фрагментации в источнике ИЭР или при ДАС дает положительно заряженный ион с m/z 443. Аналогично при отщеплении дополнительно 1 или 2 молекул воды образуются ионы с m/z 425 и 403 соответственно.

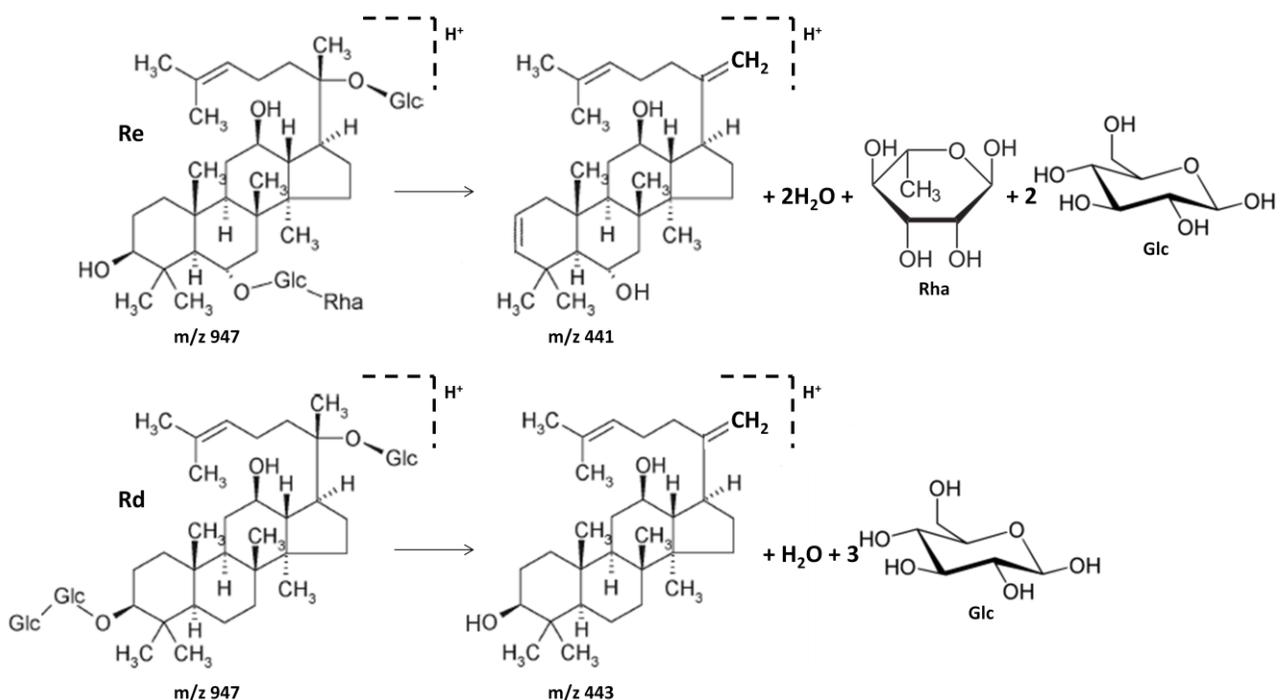


Рис. 36. Схемы фрагментации гинсенозидов Rd и Re в источнике ИЭР и ячейке соударений.

На масс-спектрах гинсенозидов Rd и Re, таким образом, во второй области располагаются серии сигналов характеристичных для их сапогенина (рис. 37). При отщеплении двух сахаридных остатков происходят схожие процессы формирования фрагментов, поэтому в масс-спектре гинсенозида Re присутствуют сигналы с m/z 621 и 603, в то время как в масс-спектре ППД гинсенозида Rd в этой области располагается сигнал с m/z 605. Близкую относительную интенсивность на данных масс-спектрах имеют ионы молекулярных аддуктов с натрием (m/z 969), большая интенсивность такого иона свидетельствует о присутствии заместителя в положении C20.

Другой распространенной группой являются псевдогинсенозиды, имеющие ОТ сапогенин. ДАС на примере псевдогинсенозида F11 была рассмотрена в разделе 3.1.2. Рассмотрим возможность применения сканирования с использованием ЛИЛ в режиме регистрации положительно заряженных ионов для данной подгруппы определяемых веществ (рис. 38).

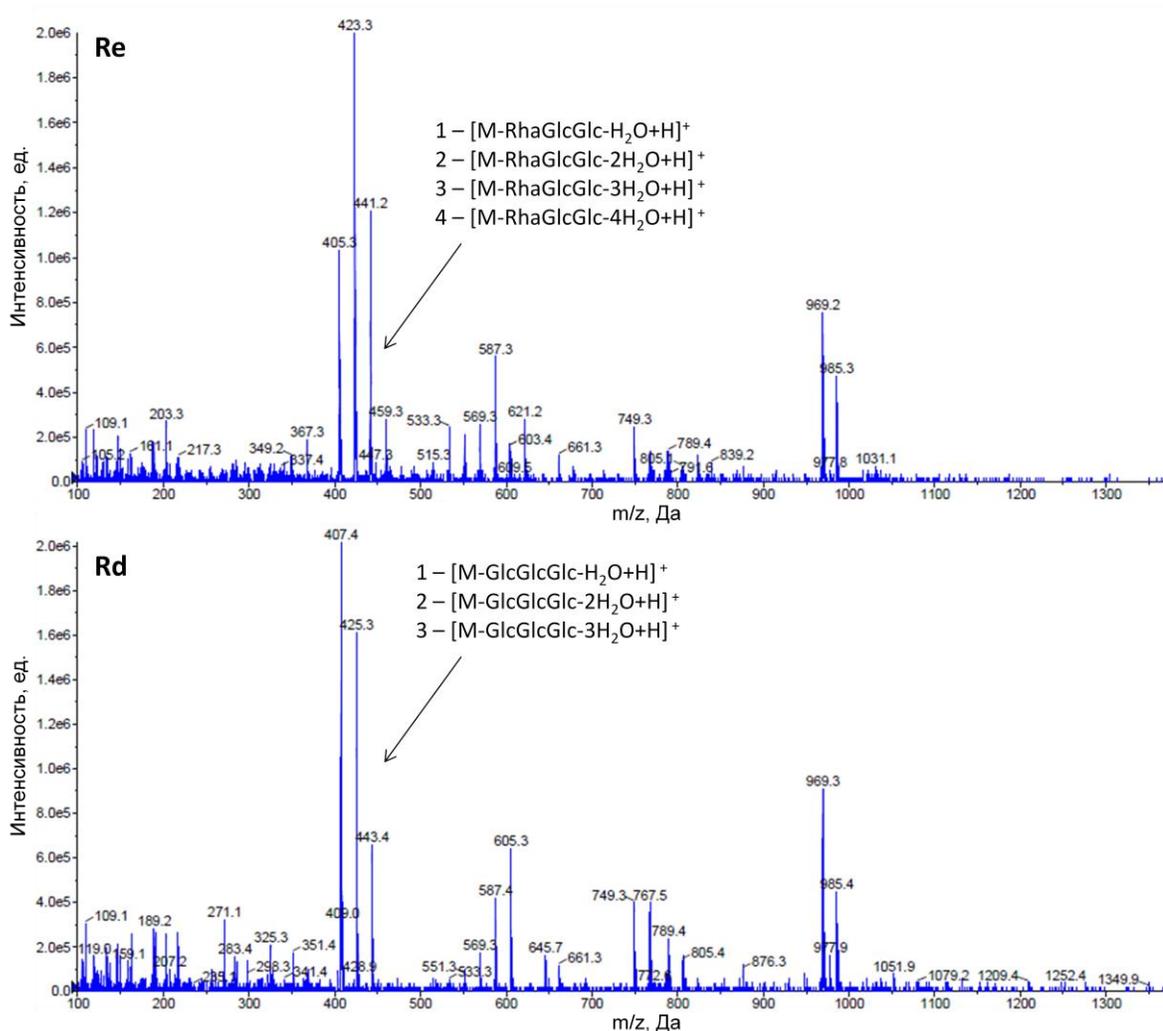


Рис. 37. Масс-спектры гинсенозидов Re и Rd, полученные в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

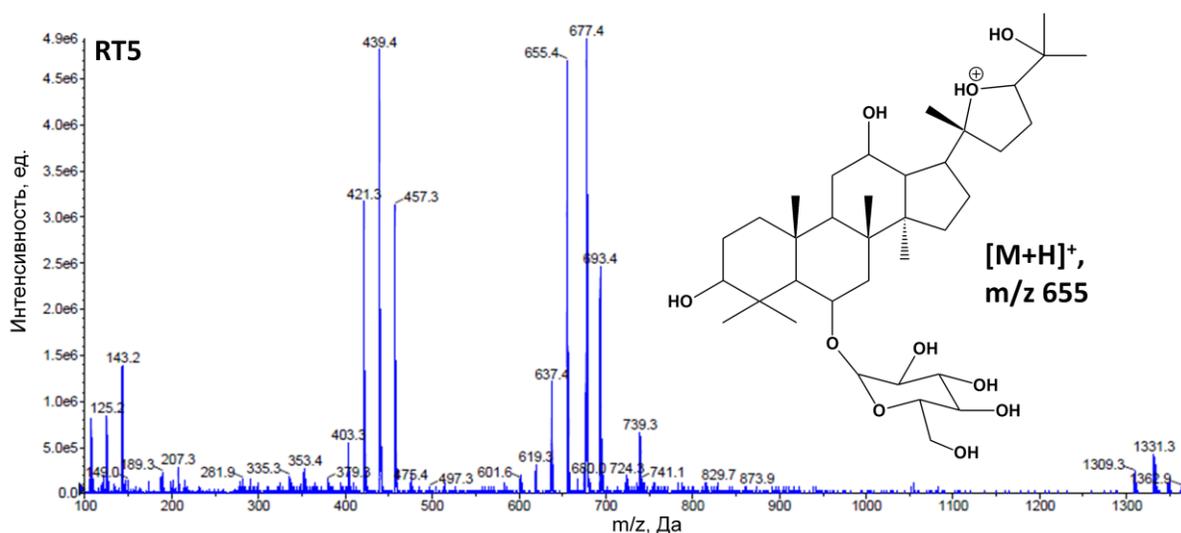


Рис. 38. Масс-спектр гинсенозида RT5, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Одной из отличительных особенностей масс-спектров псевдогинсенозидов является присутствие сигнала протонированной молекулы. Кроме того, в масс-спектре видны сигналы $[2M+H]^+$ и $[2M+Na]^+$ (m/z 1309 и 1331 соответственно), однако, это не является уникальной чертой масс-спектров псевдогинсенозидов (рис. П4, П8, П14 и П17). Наличие в структуре RT5 дополнительного цикла тетрагидрофурана, включающего атом углерода C20, приводит к тому, что, в отличие от ППД и ППТ гинсенозидов, во второй области масс-спектра присутствует 5 характеристичных сигналов с m/z 475, 457, 439, 421 и 403 соответственно. Структура иона с m/z 439 представлена на рисунке 39.

В третьей области масс-спектра (рис. 38) присутствуют интенсивные сигналы с m/z 143 и 125, соответствующие отщеплению боковой цепи, содержащей дигидрофурановый цикл. Однако в большинстве случаев в режиме сканирования наблюдается большое число шумовых сигналов в диапазоне 0 – 200 Да, поэтому такие сигналы не всегда можно использовать для корректной интерпретации масс-спектра. Здесь следует отметить, что в третьей области также есть сигналы заряженных моносахаридных фрагментов и других заместителей, например, в случае малонил-гинсенозидов.

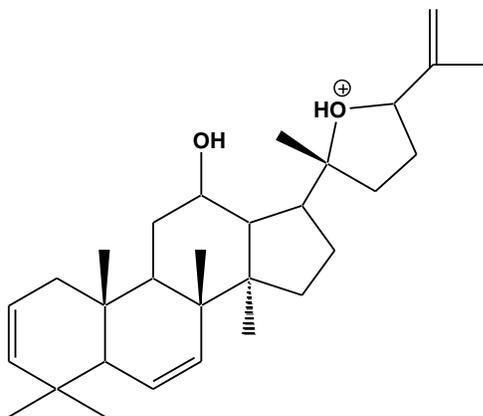


Рис. 39. Структура иона с m/z 439.

В таблице 14 приведены основные сигналы из 1 и 2 области масс-спектров некоторых стандартных гинсенозидов.

Таблица 14. Значения m/z наиболее интенсивных сигналов в спектрах гинсенозидов в режиме сканирования с использованием ЛИЛ.

Гинсенозид	МС–МС, m/z
Rb1	1131.5 [M+Na] ⁺ , 1091.5 [M-H ₂ O+H] ⁺ , 929.6 [M-Glc-H ₂ O+H] ⁺ , 911.6 [M-Glc-2H ₂ O+H] ⁺ , 807.7 [M-GlcGlc+Na] ⁺ , 785.6 [M-GlcGlc+H] ⁺ , 767.5 [M-GlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.8 [M-GlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 605.6 [M-GlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 587.6 [M-GlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 569.4 [M-GlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 551.6 [M-GlcGlcGlc-4H ₂ O+H] ⁺ , 443.6 [M-GlcGlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 425.3 [M-GlcGlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 407.4 [M-GlcGlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺
Rb2	1101.4 [M+Na] ⁺ , 767.7 [M-XylGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.6 [M-XylGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 587.4 [M-XylGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 515.6 [M-XylGlcGlc-6H ₂ O+H] ⁺ , 443.3 [M-XylGlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 425.5 [M-XylGlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 407.5 [M-XylGlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺
Rb3	1101.6 [M+Na] ⁺ , 767.8 [M-XylGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.6 [M-XylGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 623.6 [M-XylGlcGlc+H] ⁺ , 605.5 [M-XylGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 587.5 [M-XylGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 569.5 [M-XylGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 443.4 [M-XylGlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 425.4 [M-XylGlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 407.5 [M-XylGlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺
Rc	1101.6 [M+Na] ⁺ , 767.7 [M-XylGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.6 [M-XylGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 605.5 [M-XylGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 587.5 [M-XylGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 569.6 [M-XylGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 443.4 [M-XylGlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 425.5 [M-XylGlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 407.5 [M-XylGlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺
Rg1	823.6 [M+Na] ⁺ , 621.5 [M-Glc-H ₂ O+H] ⁺ , 603.5 [M-Glc-2H ₂ O+H] ⁺ , 459.4 [M-GlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 441.4 [M-GlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 423.4 [M-GlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 405.4 [M-GlcGlc-4H ₂ O+H] ⁺
Rf	823.6 [M+Na] ⁺ , 765.5 [M-2H ₂ O+H] ⁺ , 621.5 [M-Glc-H ₂ O+H] ⁺ , 603.5 [M-Glc-2H ₂ O+H] ⁺ , 459.4 [M-GlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 441.4 [M-GlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 423.4 [M-GlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 405.4 [M-GlcGlc-4H ₂ O+H] ⁺
Re	969.8 [M+Na] ⁺ , 767.6 [M-Glc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.7 [M-Glc-2H ₂ O+H] ⁺ , 621.7 [M-RhaGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 603.6 [M-RhaGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 587.8 [M-GlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 459.4 [M-RhaGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 441.4 [M-RhaGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 423.4 [M-RhaGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺ , 405.5 [M-RhaGlcGlc-4H ₂ O+H] ⁺
Rd	969.5 [M+Na] ⁺ , 785.6 [M-Glc+H] ⁺ , 767.5 [M-Glc-H ₂ O+H] ⁺ , 749.6 [M-Glc-2H ₂ O+H] ⁺ , 587.5 [M-GlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 569.5 [M-GlcGlc-4H ₂ O+H] ⁺ , 551.5 [M-GlcGlc-5H ₂ O+H] ⁺ , 443.3 [M-GlcGlcGlc-H ₂ O+H] ⁺ , 425.5 [M-GlcGlcGlc-2H ₂ O+H] ⁺ , 407.5 [M-GlcGlcGlc-3H ₂ O+H] ⁺

4.1.2 Примеры гинсенозидов, имеющих неотличимые масс-спектры

В разделе 4.1.2 были рассмотрены основные особенности масс-спектров гинсенозидов, однако, даже на примере стандартных гинсенозидов можно убедиться в том, что масс-спектр не всегда дает возможность однозначно идентифицировать вещество. Так, известно [226] большое число энантиомерных гинсенозидов, содержащих хиральный атом C20. Их масс-спектры будут неотличимы друг от друга, однако было показано [226], что боковая цепь в положении C20 в 20(S)-гинсенозидах имеет фиксированную ориентацию в пространстве, жестко упакована вблизи терпеноида. В структуре 20(R)-гинсенозидов эта боковая цепь сильнее выступает наружу и имеет большую подвижность. Таким образом, 20(S)-гинсенозиды являются более гидрофобными, что может быть использовано для их разделения в обращенно-фазовой хроматографии. Кроме того, известно множество изомерных гинсенозидов, отличающихся типом заместителя (рис. 40).

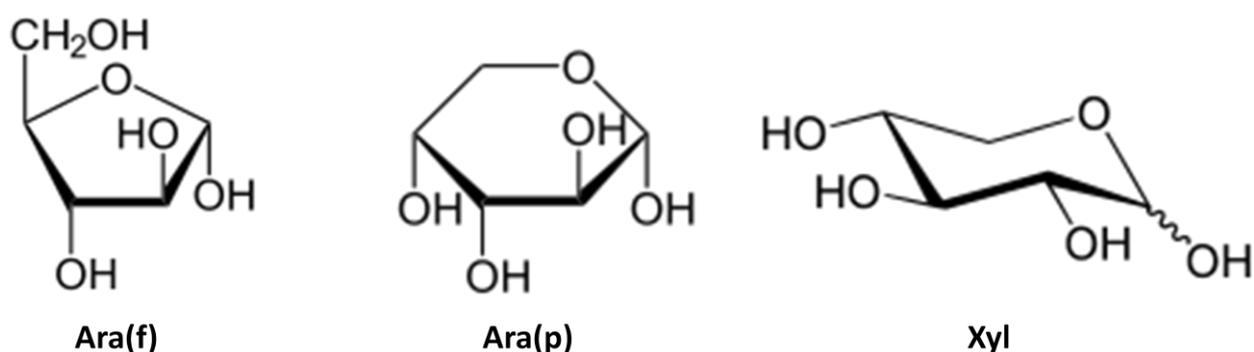


Рис. 40. Структуры арабинопиранозного, арабинофуранозного и ксилозного сахаридных остатков.

Масс-спектры соответствующих гинсенозидов Rb2, Rb3 и Rc, в состав которых входит арабинопиранозный, ксилозный и арабинофуранозный моносахарид, соответственно, содержат одинаковые сигналы во всех трех областях (рис. 41).

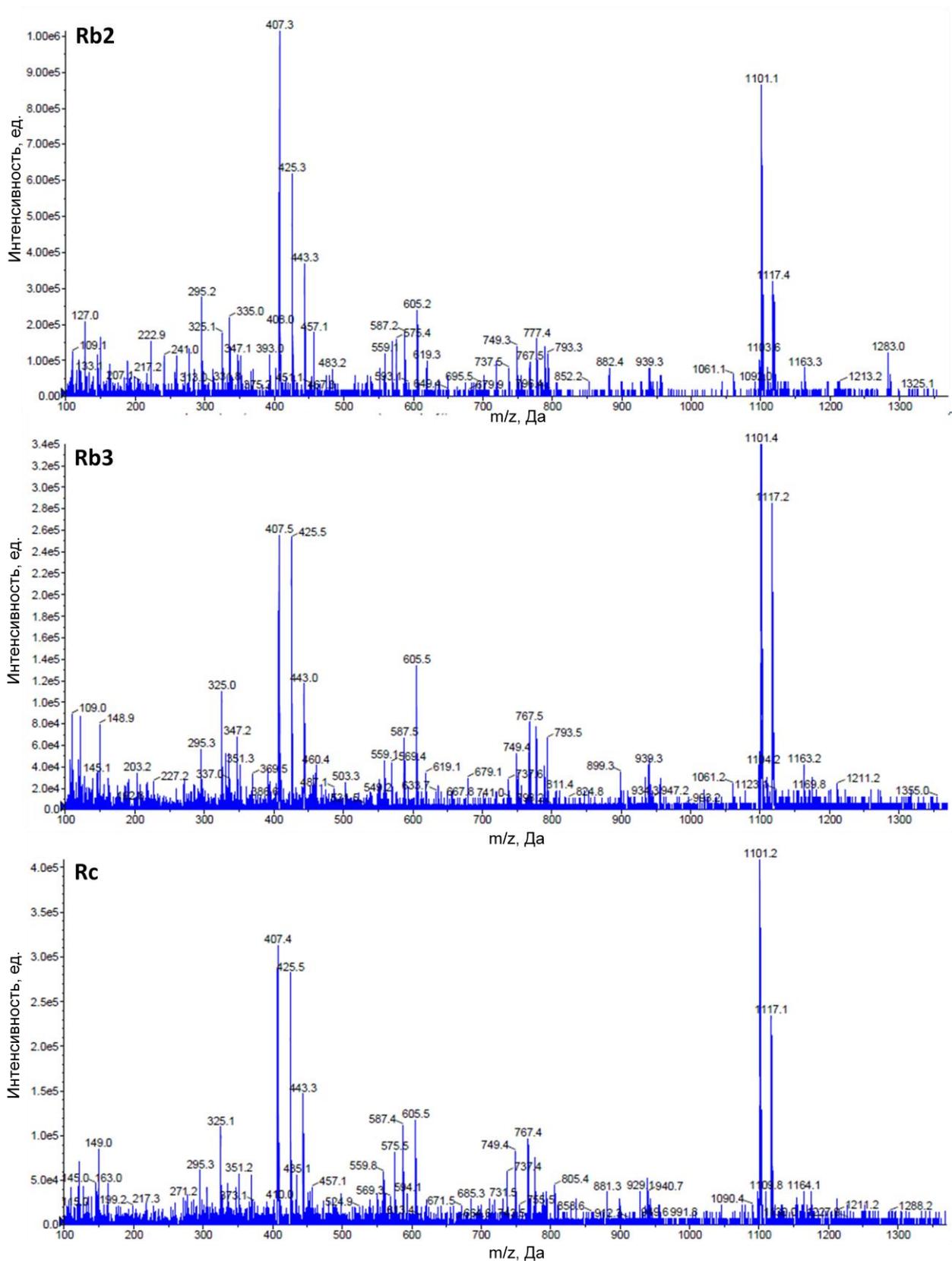


Рис. 41. Масс-спектры гинсенозидов Rb2, Rb3 и RbC, полученные в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Несмотря на незначительное структурное различие, эти три анализа хорошо разделены в выбранных хроматографических условиях (рис. 26). Коэффициент емкости уменьшается в ряду Rb2, Rb3, Rc, это обстоятельство можно использовать, для того чтобы различать на хроматограмме пики гинсенозидов Ra1, Ra2 (рис. 42) и другие.

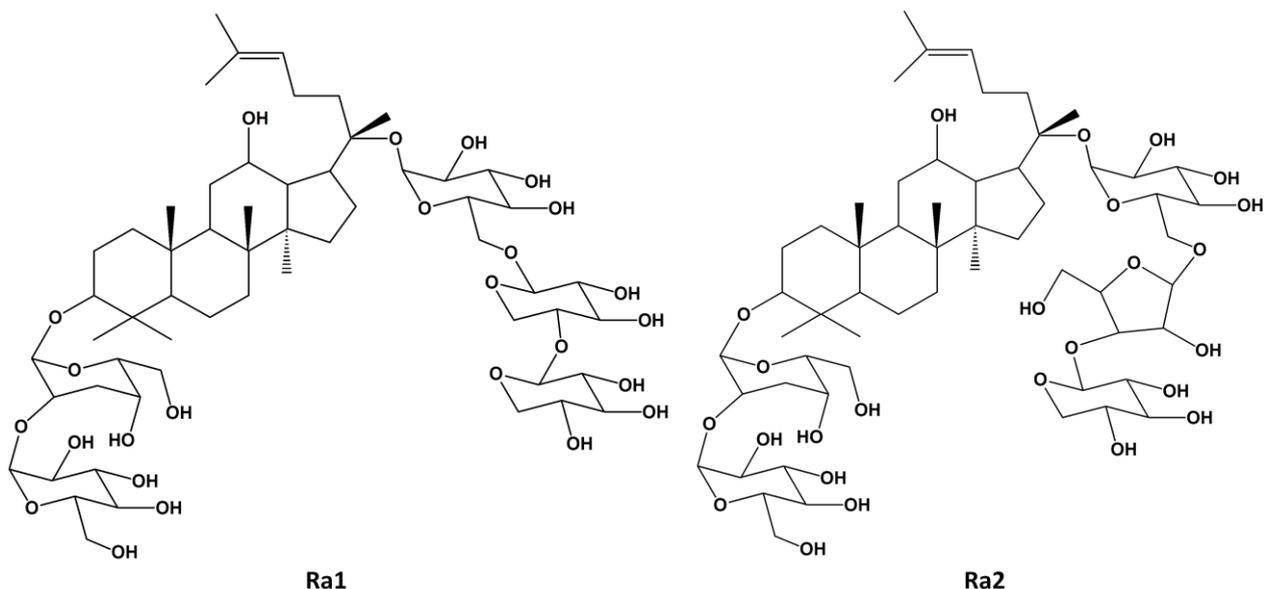


Рис. 42. Структуры гинсенозидов Ra1 (ППД-20-GlcAra(p)Xyl-3-GlcGlc) и Ra2 (ППД-20-GlcAra(f)Xyl-3-GlcGlc).

4.2 Алгоритм получения структурной информации из данных МС анализа образцов, содержащих женьшеневые сапонины

В соответствии с закономерностями возникновения сигналов в масс-спектрах гинсенозидов различной структуры, рассмотренным в разделе 4.1.1, первым этапом в ходе получения структурной информации из данных МС анализа является определение **M** (молекулярной массы сапонины) из значений m/z сигналов молекулярных аддуктов с натрием и калием, или сигнала протонированной молекулы в случае псевдогинсенозидов. На втором этапе, следует помнить, что во всех, известных на данный момент, ППТ гинсенозидах и их производных с модифицированным сапогенинов боковые цепи присоединены в положениях C20 и C6, а в гинсенозидах ППД-типа и их аналогах с измененной боковой цепью в положении C17 сахаридные цепочки присоединены в положениях C20 и C3. В ОТ гинсенозидах и дегидратированных ППТ и ППД гинсенозидах в положении C20 нет свободной гидроксильной группы, и, соответственно, отсутствует возможность присоединения к ней моносахаридных остатков. Кроме того в разделе 4.1.1 было

показано, что при отщеплении моносахаридных остатков от цепей в положениях С3 и С6 возможно сохранение структуры натриевого аддукта, образуемого атомами кислорода, соседствующими с С20. Рассмотрим возможность определения состава сахаридных боковых цепей на примере гинсенозида Rb1 (рис. 43).

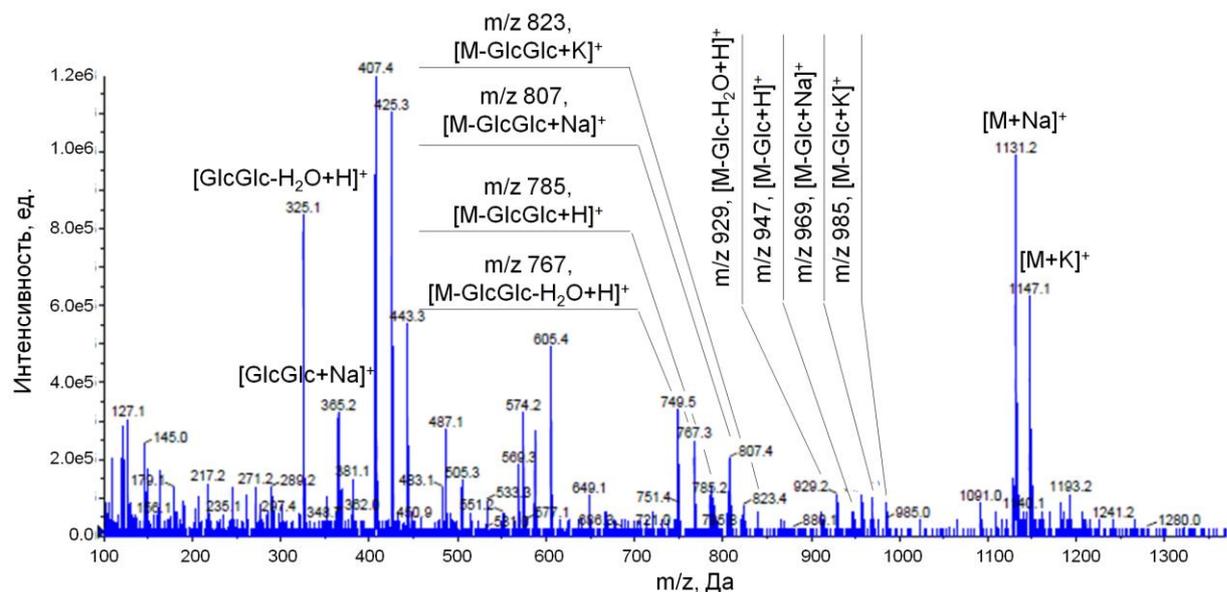


Рис. 43. Масс-спектр гинсенозида Rb1, полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Пара сигналов с m/z 985 и 969 свидетельствует о возможности отщепления глюкозного заместителя с сохранением свободной ОН-группы (масса уходящего фрагмента 162 а.е.м.) и структуры калиевого и натриевого аддуктов, соответственно ($1147 - 162 = 985$, $1131 - 162 = 969$). Другая пара сигналов с m/z 947 и 929 соответствует фрагментации исходной протонированной молекулы с отщеплением глюкозного остатка в положении С20 (без и с отсоединением молекулы воды, соответственно), таким образом, можно установить, что в молекуле, рассматриваемого гинсенозида присутствует две боковые сахаридные цепочки, оканчивающиеся глюкозой. Далее наличие сигналов с m/z 823 и 807 указывает на возможность отщепления цепочки из двух глюкозидных моносахаридов, присоединенной в положении С3, с сохранением целостности связи молекулы с атомами калия и натрия, соответственно ($985 - 162 = 823$, $969 - 162 = 807$). Аналогично рассуждая можно заключить, что из наличия сигналов с m/z 785 и 767 следует, что боковая цепь в положении С20 идентична боковой цепи в положении С3. И действительно, при вычитании из молекулярной массы вещества ($1131 - 23 = 1108$ а.е.м.) всех четырех уходящих глюкозных заместителей, получаем ($1108 -$

4*162 = 460 а.е.м.) массу ППД, сапогенина гинсенозида Rb1. Кроме того, наличие интенсивного сигнала с m/z 325 явно указывает на отщепление протонированной цепи из двух глюкозных остатков (рис. 44).

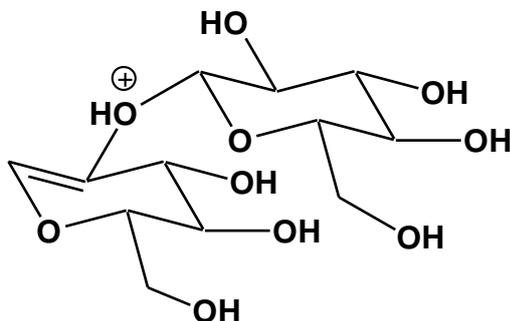


Рис. 44. Структура иона с m/z 325.

Таким образом, третьим этапом алгоритма получения структурной информации из масс-спектра женьшеневого сапонина, после вычисления его молекулярной массы, числа и состава боковых сахаридных цепей, является вычисление M_s (массы сапогенина гинсенозида). Для исследованных стандартных ППТ, ППД и ОТ производных гинсенозидов M_s равны 476, 460 и 492, соответственно. Однако помимо выбранных трех самых распространенных типов женьшеневых сапонинов в корнях, листьях и других частях разных растений из рода *Panax* встречается множество соединений с измененными сапогенинами (рис. 45).

Таким образом, M_s не является однозначной характеристикой типа сапогенина. Например, ОТ сапогенин ($M_s = 492$) является изомерным сапогенинам В3-в и В4-в (используются обозначения из работы [8]). В данном случае, сапогенины В3-в и В4-в отличаются от ППТ положением двойной связи и дополнительной гидроксильной группой в боковой цепи, поэтому времена удерживания таких гинсенозидов в ОФ ВЭЖХ должны быть меньше их ППТ аналогов. На рис. 47 представлен масс-спектр пика ($t_R = 8.7$ мин), полученный при хроматографировании экстракта из корня женьшеня (раздел 2.2.2).

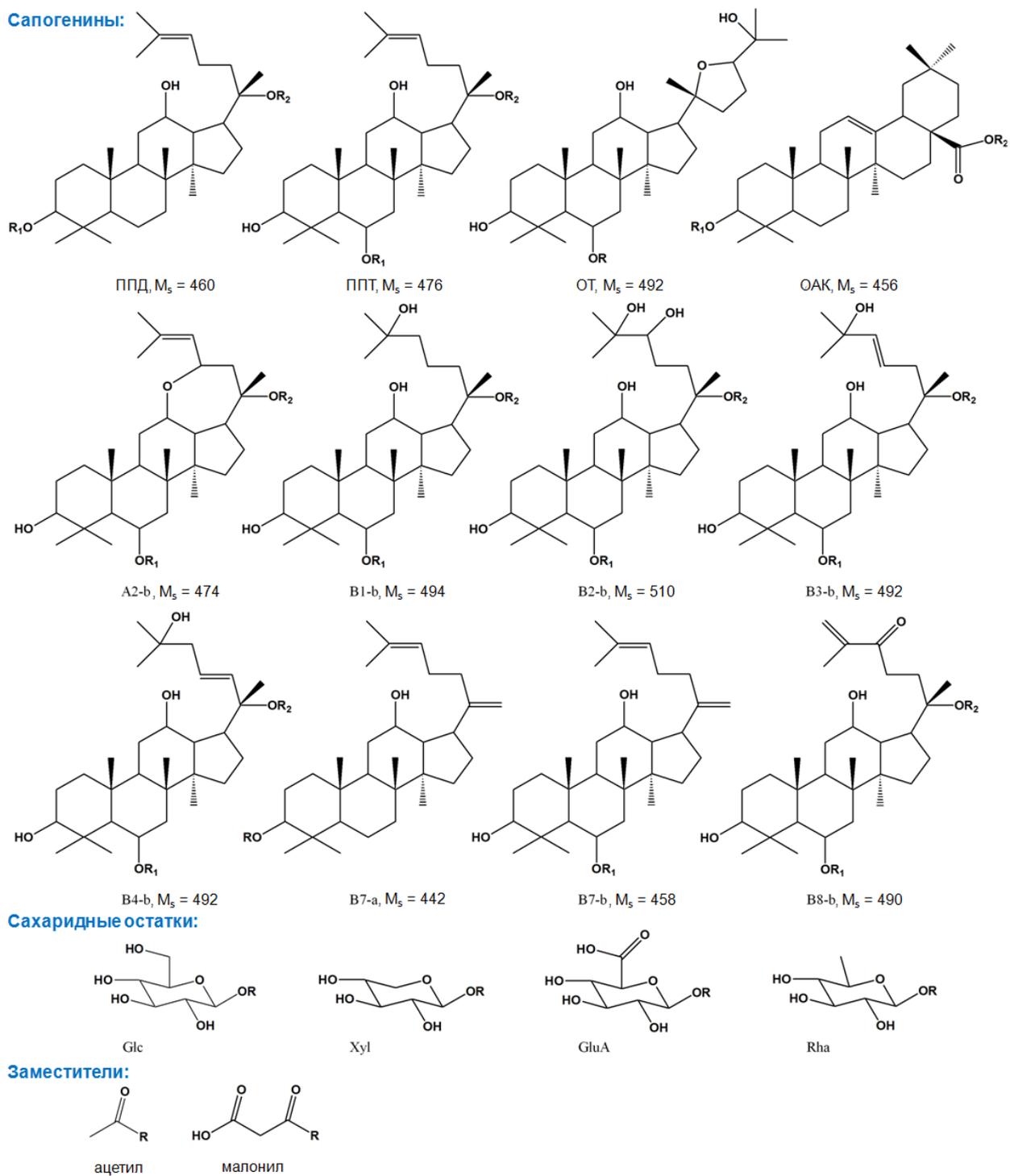


Рис. 45. Строение некоторых структурных элементов обнаруженных в природе гинсенозидов.

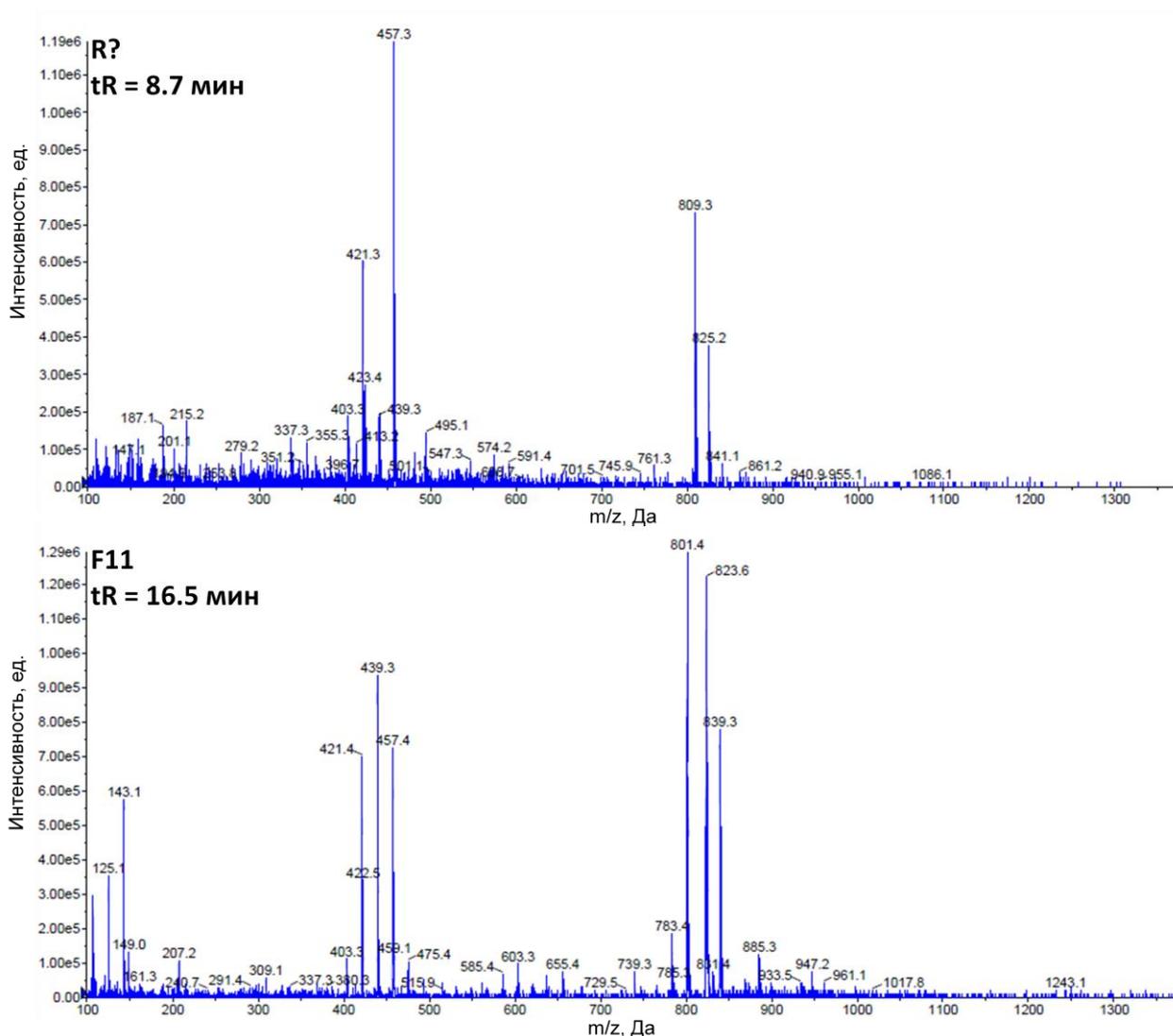


Рис. 46. Масс-спектры гинсенозида F11 и неизвестного гинсенозида ($t_R = 8.7$ мин), полученный в режиме сканирования с использованием ЛИЛ в варианте ИЭР и регистрации положительных ионов.

Поскольку значения M_s для данных гинсенозидов совпадают, следует обратить внимание на присутствие интенсивного сигнала протонированной молекулы в масс-спектре F11. Таким образом, отношение интенсивностей сигналов протонированной молекулы гинсенозида и натриевого аддукта ($M_{H/Na} = I_{[M+H]^+}/I_{[M+Na]^+}$) будет еще одним характеристичным параметром, особенно значимым при идентификации псевдогинсенозидов. Так для псевдогинсенозида F11 $M_{H/Na} = 1.1$ а для неизвестного гинсенозида (рис. 46) близко к 0. Кроме того, в масс-спектре F11 присутствует группа сигналов, соответствующих последовательной потере воды в структуре сапогенина (m/z 475, 457, 439, 421 и 403). Четыре из них также присутствуют в масс-спектре неизвестного гинсенозида, а относительные интенсивности этих пиков на масс-спектрах могут сильно

отличаться в зависимости от условий анализа (например, значения ЭС). Следовательно, во избежание ложной идентификации на четвертом этапе следует проводить сравнение паттернов фрагментации сапогенинов во второй и третьей областях масс-спектров. Так, если в качестве основной характеристики паттерна фрагментации ОТ сапогенина выбрать вышеупомянутые сигналы (m/z 475, 457, 439, 421 и 403), а в качестве дополнительной характеристики выбрать сигналы ионов с m/z 143 и 125, структура которых была показана в разделе 3.1.2 (рис. 17), то можно повысить достоверность определения сапогенина гинсенозида.

Таким образом, для исследованных подгрупп гинсенозидов можно предложить следующие паттерны фрагментации сапогенина (рис. 47-49), состоящие из двух групп сигналов. Первые – сигналы, соответствующие молекуле сапогенина с потерей части гидроксильных групп во второй области масс-спектра, а вторые – характеристичные фрагменты сапогенина с меньшей молекулярной массой во второй и третьей областях масс-спектра.

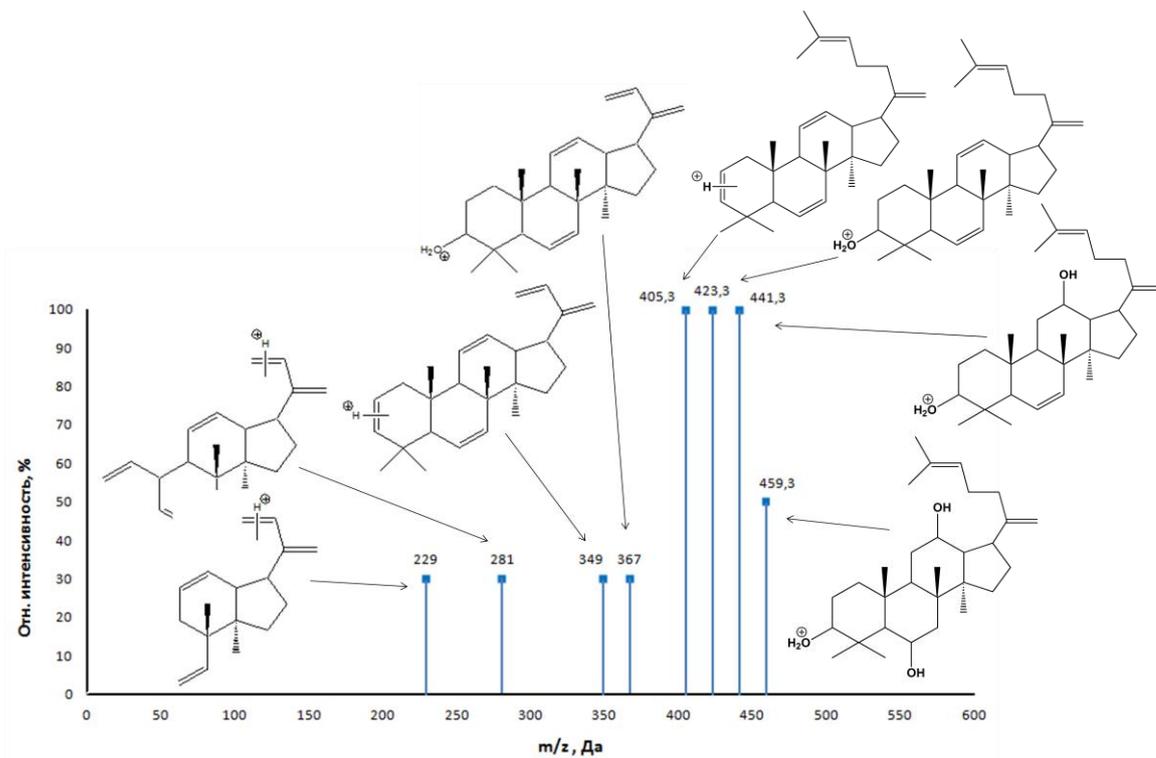


Рис. 47. Паттерн фрагментации ППТ сапогенина.

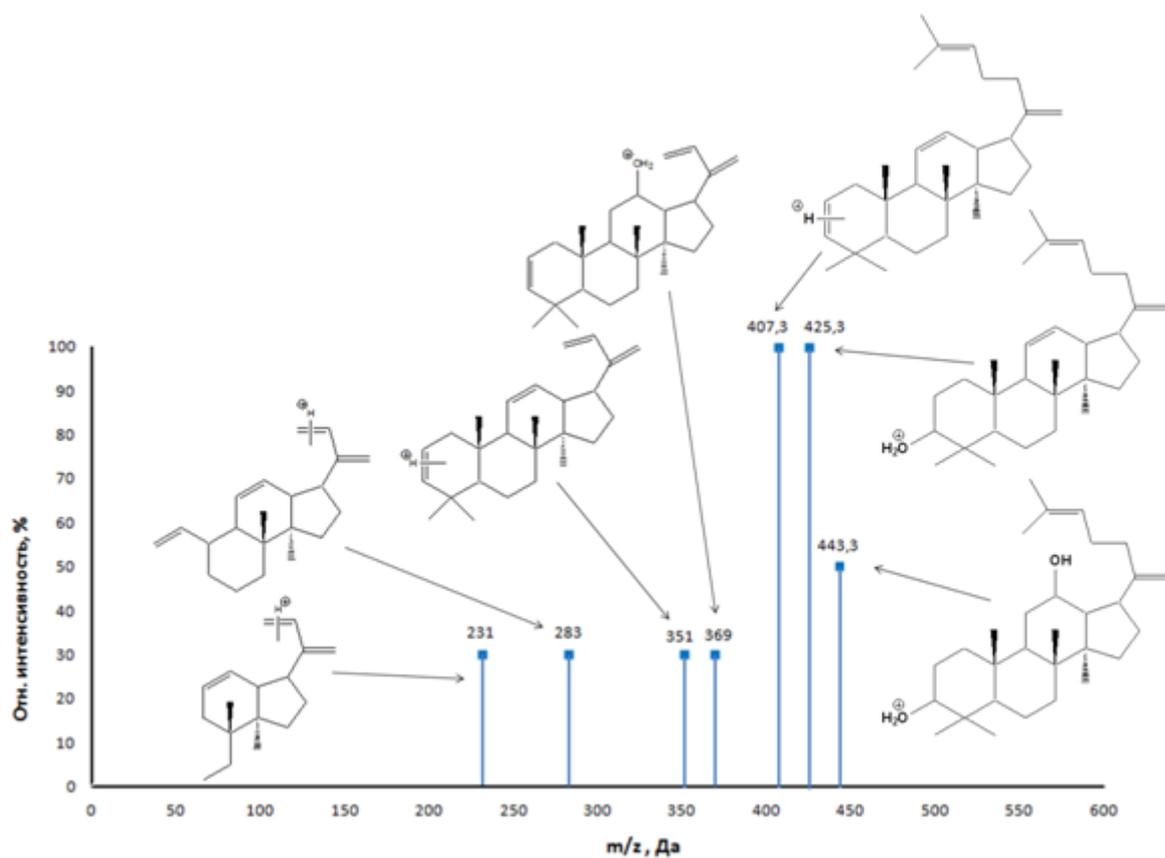


Рис. 48. Паттерн фрагментации ППД сапогенина.

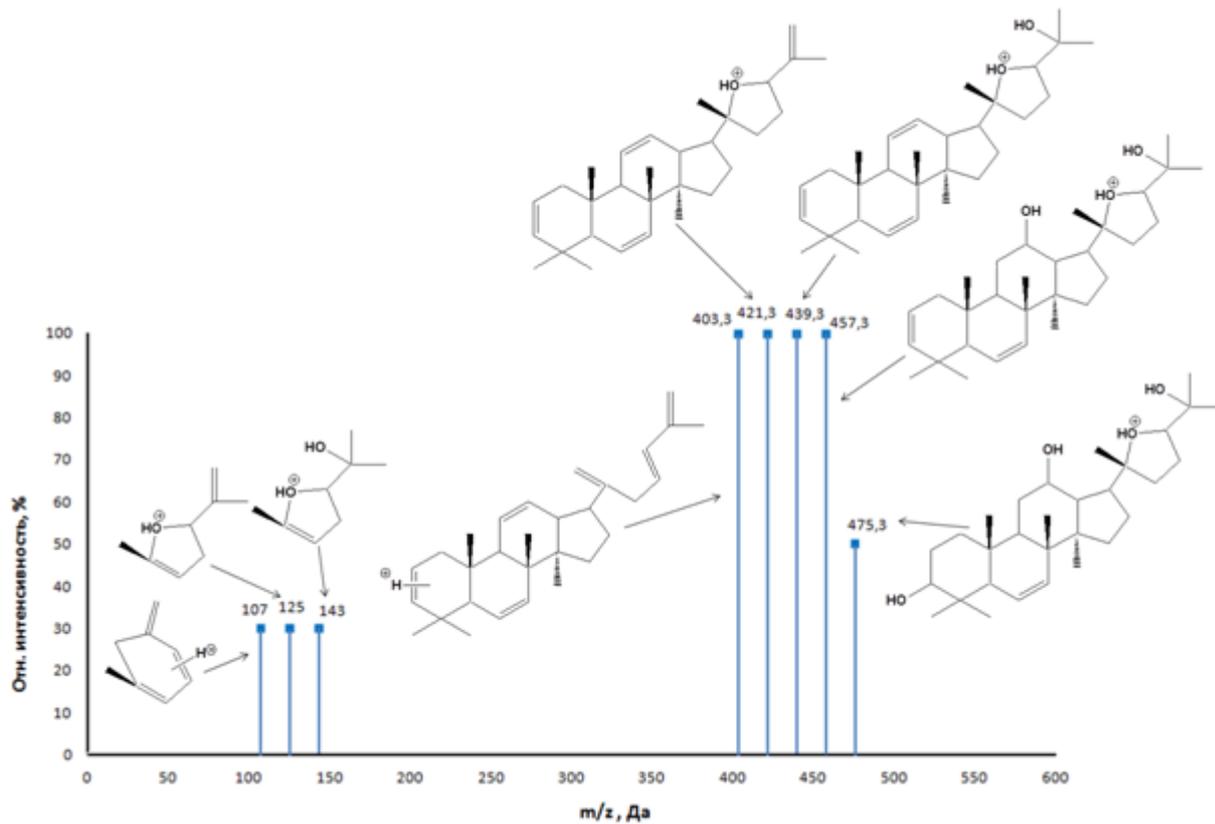


Рис. 49. Паттерн фрагментации ОТ сапогенина.

Известные из литературных данных гинсенозиды, имеющие ОАК сапогенин, были обнаружены в нескольких проанализированных образцах. Идентификацию их выполняли по значению молекулярной массы и наличию сигналов, соответствующих потере заместителей. Исходя из других сигналов, присутствующих в масс-спектрах был предложен паттерн фрагментации ОАК сапогенина (рис. 50). Правильность этого предположения необходимо в будущем подтвердить с использованием стандартных образцов этих соединений.

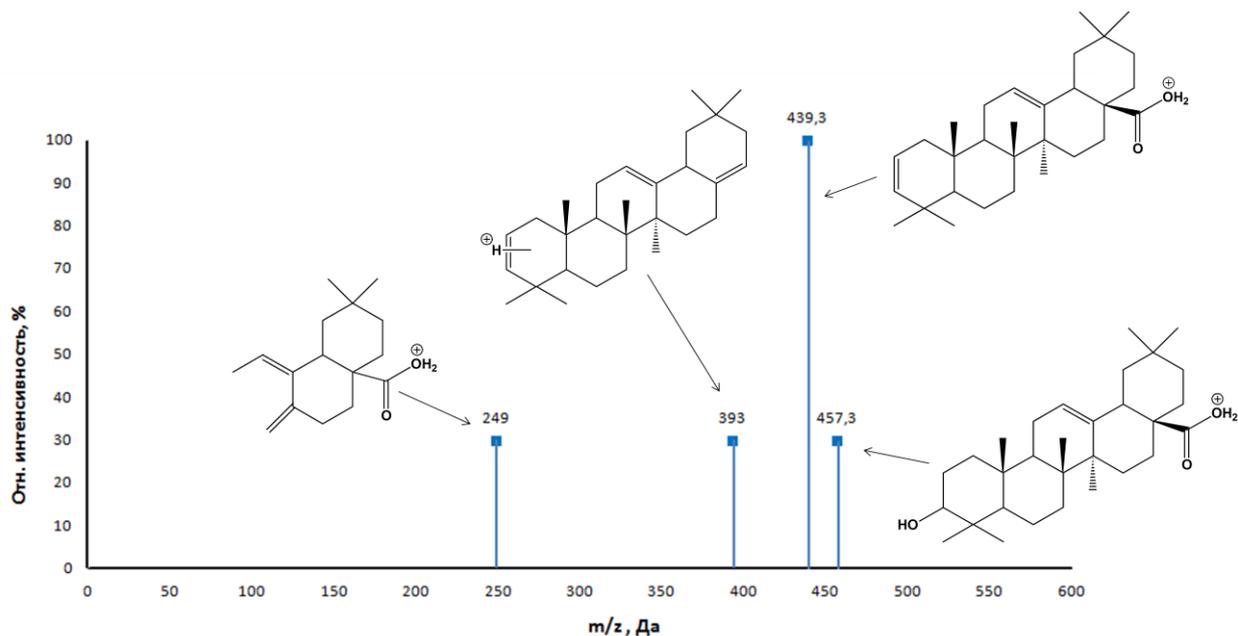
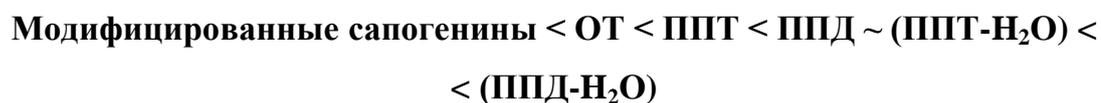


Рис. 50. Паттерн фрагментации ОАК сапогенина.

Пятым этапом уточнения структуры гинсенозида может быть использование рядов удерживания для, например, установления типа ксилозного заместителя для каждого гинсенозида, пики которых разделены на хроматограмме, но масс-спектры которых неотличимы друг от друга (раздел 4.1.2). Рассмотрим закономерности удерживания гинсенозидов в ОФ ВЭЖХ на примере 17 используемых стандартных растворов аналитов. Отсутствие компактной упаковки незамещенных гидроксильных групп вблизи C20 снижают гидрофобность молекулы гинсенозида, поэтому гинсенозид Rh1 (ППТ-6-Glc) намного слабее удерживается на колонке, чем гинсенозид F1 (ППТ-20-Glc). Впрочем, уже на примере гинсенозидов С-К (ППД-20-Glc) и Rh2 (ППД-6-Glc), имеющих близкие времена удерживания, видно, что следует обращать внимание, в основном, на другие факторы, отвечающие за полярные свойства гинсенозидов. Так, вклад сахаридных заместителей не является однозначным, с одной стороны, циклические части этих заместителей увеличивают

гидрофобность молекулы, но с другой стороны добавление нескольких гидроксильных групп, обладающих кислотными свойствами, усиливает полярность гинсенозида. Так, добавление одного моносахарида, чаще всего, уменьшает время выхода соединения, например, в случае гинсенозида Rf (ППТ-6-GlcGlc), по сравнению с Rh1 (ППТ-6-Glc), или гинсенозида R1 (ППТ-20-Glc-6-GlcXyl), по сравнению с Rg1 (ППТ-20-Glc-6-Glc). Однако сама по себе цепочка из двух моносахаридов является достаточно гидрофобным фрагментом, и, несмотря на наличие в структуре гинсенозида Rf (ППТ-6-GlcGlc) свободной гидроксильной группы в положении C20 он дольше удерживается на ОФ колонке, чем гинсенозид Rg1 (ППТ-20-Glc-6-Glc). Из-за метил-радикала в рамном остатке, его наличие в структуре гинсенозида вносит, практически, нулевой вклад в его гидрофобные взаимодействия. Это может быть проиллюстрировано близкими временами удерживания гинсенозидов Rg1 (ППТ-20-Glc-6-Glc) и Re (ППТ-20-Glc-6-GlcRha), Rg2 (ППТ-6-GlcRha) и Rh1(ППТ-6-Glc), а также псевдогинсенозидов F11 (ОТ-6-GlcRha) и RT5 (ОТ-6-Glc. Таким образом, учитывая информацию из раздела 4.1.2, можно сделать вывод, что полярность гинсенозидов зависит от типа сапогенина, а также числа, положения и структуры заместителей. В ряду сапогенинов удерживание на ОФ колонках увеличивается в ряду:



А в ряду заместителей следующая закономерность:



Предложенный алгоритм получения структурной информации о входящих в состав исследуемого образца гинсенозидов по масс-спектрам можно представить в виде схемы (рис. 51).

Важнейшим шагом при определении структуры гинсенозида служит выбор его сапогенина. Поскольку некоторые сапогенины, например В3-b и В4-b (рис. 46), являются изомерами, большая часть сигналов в их паттернах фрагментации будет одинаковой. Таким образом, достоверная идентификация сапогенина гинсенозида в МС детектировании не всегда бывает возможной.

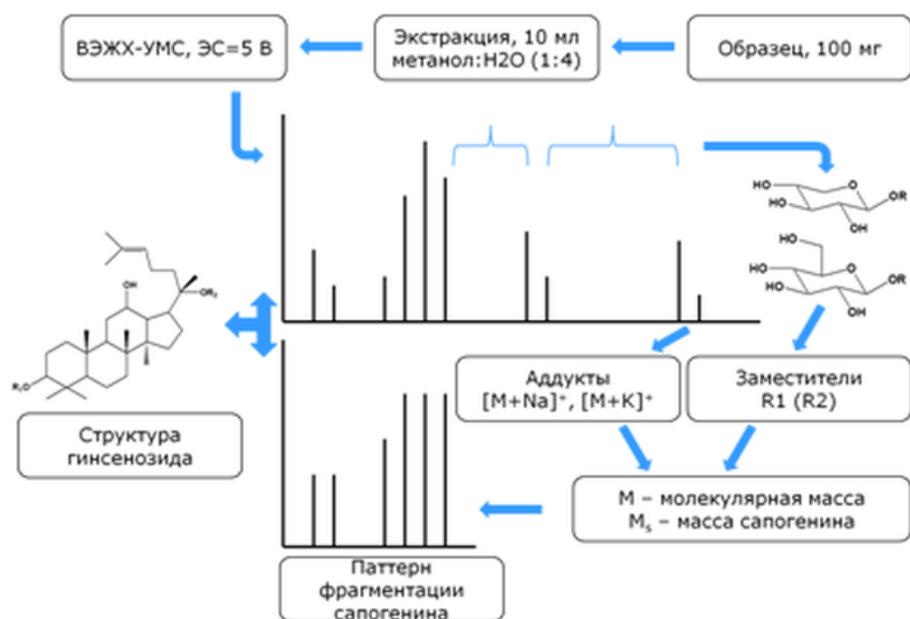


Рис. 51. Схема получения структурной информации о молекуле гинсенозида по его масс-спектру и времени удерживания на хроматограмме.

Для того чтобы, предложить наиболее вероятную структуру сапогенина, основываясь на полученных данных следует использовать дискриминантный анализ в варианте многономиальной логистической регрессии. Важнейшим этапом применения данного способа является выбор характерных переменных (признаков), по которым производится классификация на несколько групп (в данном случае - несколько сапогенинов). Вначале составляют тестовую (обучающую) выборку из данных, полученных при анализе заранее известных соединений, структура которых подтверждена референтным способом анализа или подтверждена паспортом стандартного образца. Затем, используя стандартную процедуру проведения логистической регрессии, устанавливают функциональные зависимости, с помощью которых можно провести наиболее правильную классификацию тестовой выборки по заранее заданным группам. Полученные при этом априорные вероятности ошибки первого и второго рода могут быть использованы, как показатели достоверности проводимой идентификации сапогенина.

Рассмотрим возможность проведения классификации гинсенозидов по типу сапогенина, выбрав в качестве трех переменных суммы относительных интенсивностей сигналов полученных паттернов фрагментации ППТ, ППД и ОТ сапогенинов (табл. 15).

Таблица 15. Характеристические сигналы из паттернов фрагментации сапогенинов.

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

В таком случае тестовая выборка из 17 масс-спектров стандартных гинсенозидов будет выглядеть следующим образом (рис. 52):

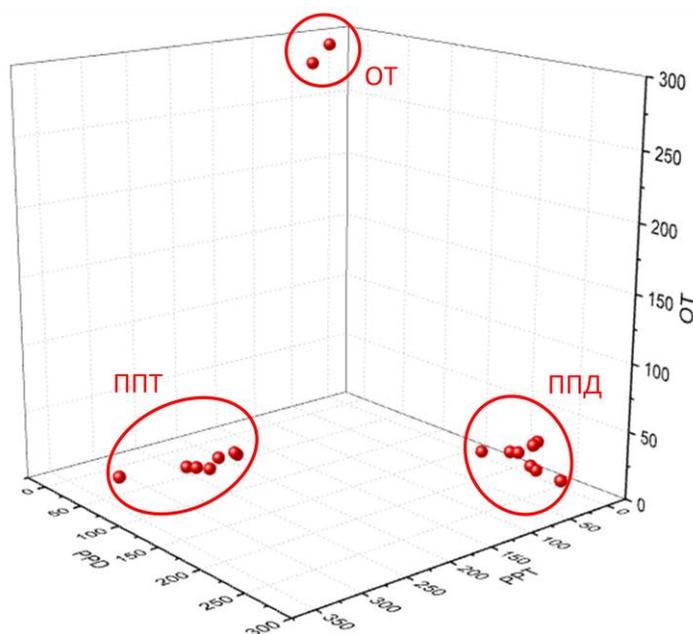


Рис. 52. Тестовая выборка из 17 стандартных гинсенозидов.

Обширные возможности изомерии и большое разнообразие обнаруженных в природе гинсенозидов не позволяет полностью избежать ложной идентификации этих веществ методом тандемной МС. Для уточнения структуры, например в случае изомерных сапогенинов, следует использовать референтные методы химического анализа, такие как ЯМР.

ГЛАВА 5 АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОГО ПОДХОДА ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ

5.1 Анализ объектов с использованием разработанного способа ВЭЖХ-МС/МС детектирования в режиме сканирования с использованием ЛИЛ

5.1.1 Анализ корней женьшеня

Корни женьшеня являются основным сырьем при производстве настоек, чаев, косметических и лекарственных средств, а также других продуктов на основе этого растения. Однако химический состав женьшеня до сих пор полностью не изучен. В работе [8] из корней трех видов женьшеня (*P. ginseng*, *P. notoginseng* и *P. quinquefolius*) было выделено более 620 гинсенозидов. Различный гинсенозидный состав имеют основные корни, их отростки, стебли, листья, цветы и ягоды разных растений из рода *Panax*. Кроме того, различные гинсенозидные профили имеют растения, достигшие разных возрастов и выращенные в разных условиях. Таким образом, получение гинсенозидного профиля является важной задачей в процессе контроля качества и изучения лекарственного потенциала того или иного женьшеневого сырья. Известно например, что гинсенозиды Rf, нотогинсенозид R1 и псевдогинсенозид F11 можно использовать в качестве биомаркеров корней *P. ginseng*, *P. notoginseng* и *P. quinquefolius*, соответственно [143]. Однако в большинстве лабораторий для подтверждения качественной принадлежности исследуемого образца используют так много гинсенозидов, как могут определять. В настоящее время широкое распространение получил метод ВЭЖХ-ДАД, применяемый для получения гинсенозидного профиля образца [225]. В разделе 3.1.3 был описан используемый нами подход, пригодный для получения такого профиля с МС детектированием. По схеме, изложенной в разделе 2.2.2 были проанализированы 6 экстрактов из образцов корня женьшеня и. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 53-58.

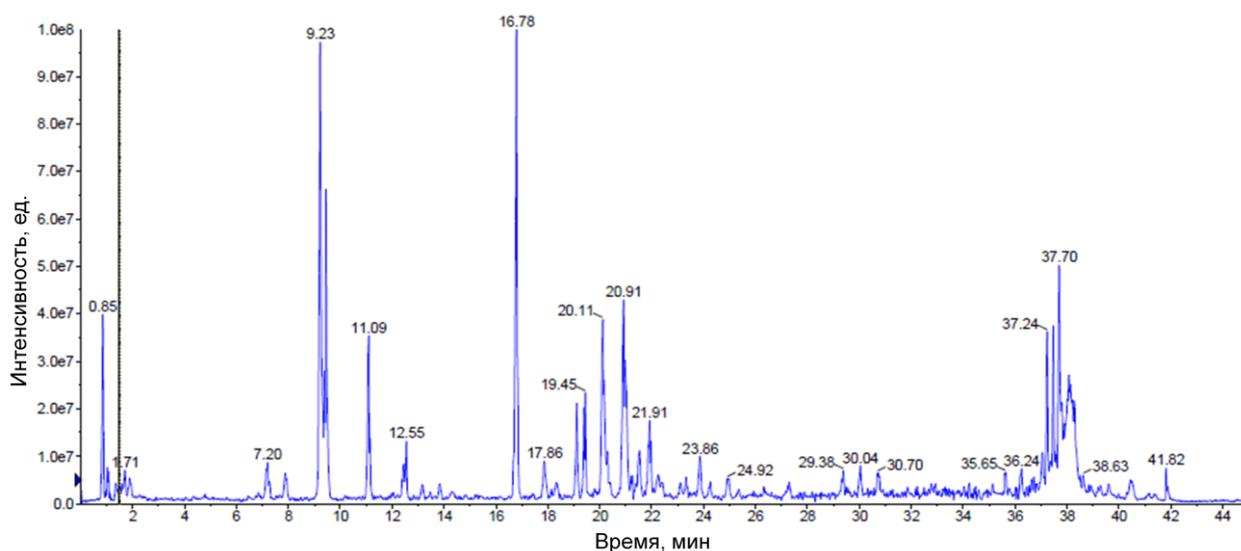


Рис. 53. Хроматограмма экстракта из корней женьшеня, собранных и высушенных на Дальнем Востоке (Россия).

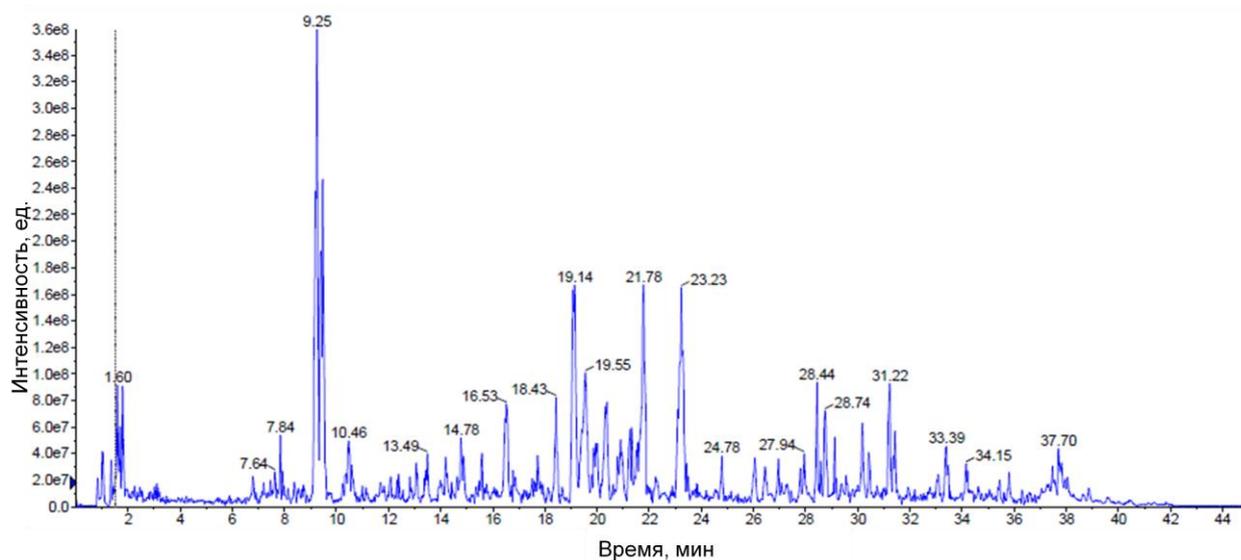


Рис. 54. Хроматограмма сконцентрированного экстракта из корней женьшеня, собранных и высушенных на Дальнем Востоке (Россия)

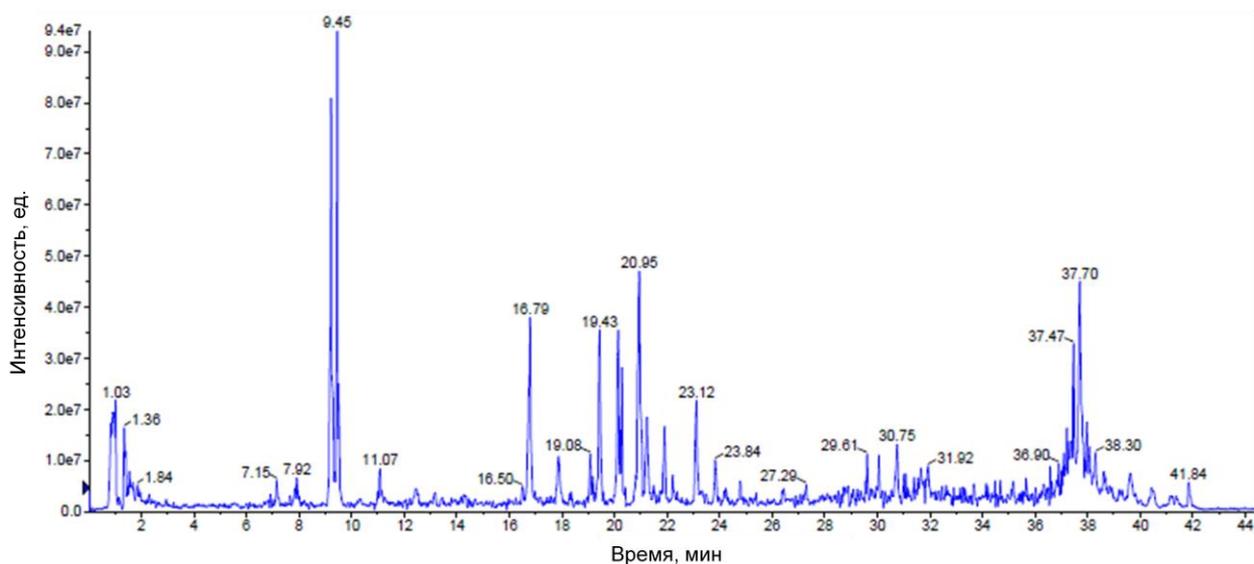


Рис. 55. Хроматограмма экстракта из корней женьшеня, собранных и высушенных в Брянской области (Россия).

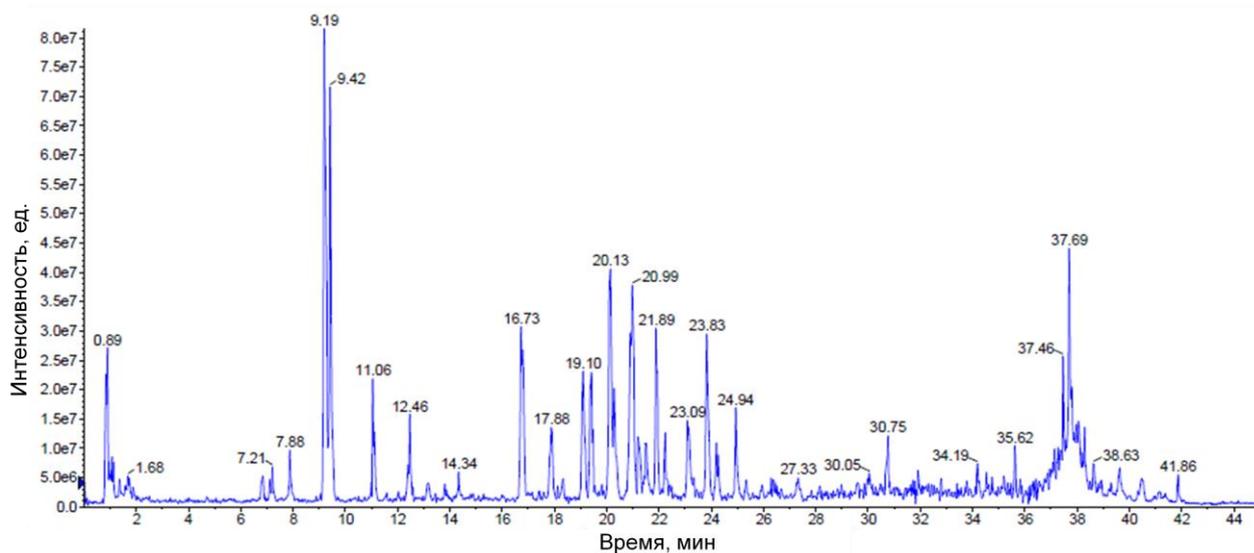


Рис. 56. Хроматограмма экстракта из корней женьшеня, собранных и высушенных в г. Владивосток (Россия).

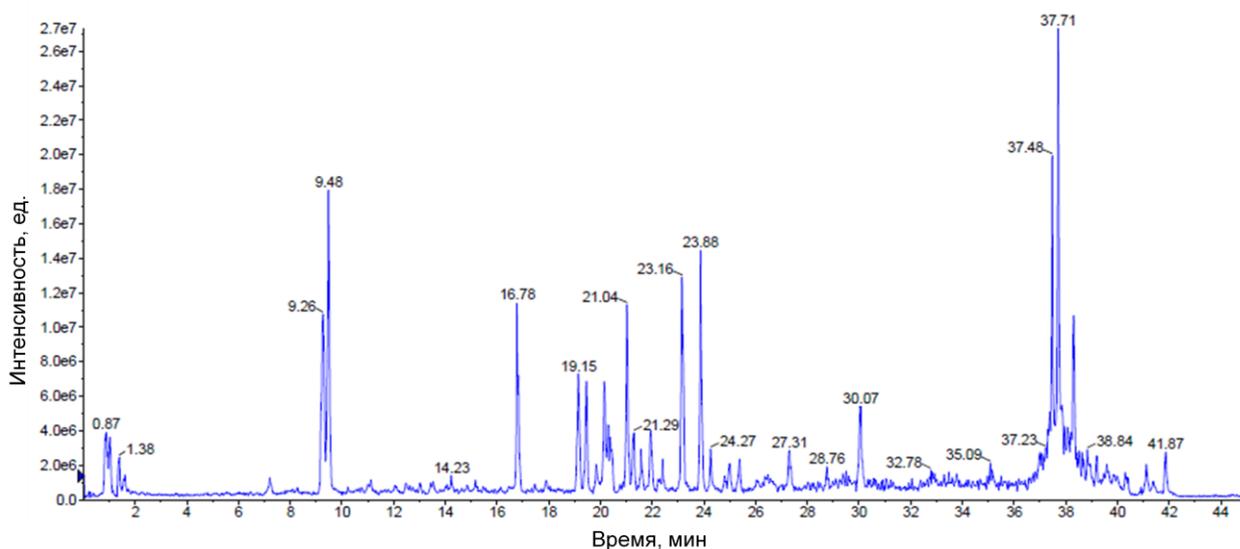


Рис. 57. Хроматограмма экстракта из свежих корней женьшеня, собранных на Дальнем Востоке (Россия)

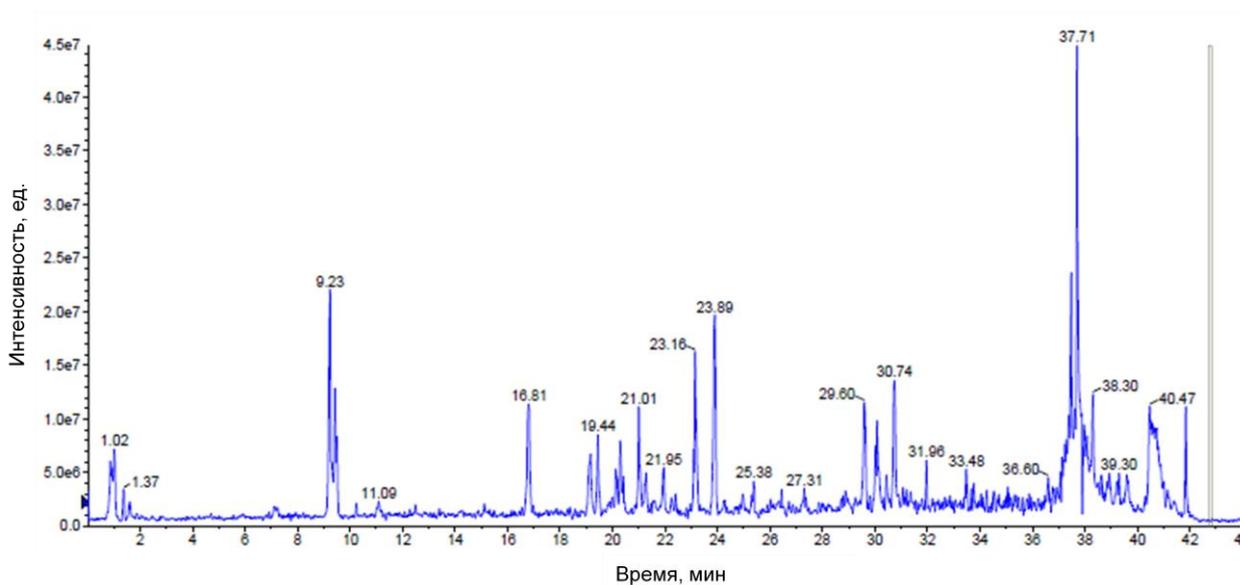


Рис. 58. Хроматограмма экстракта из измельченных свежих корней женьшеня, собранных на Дальнем Востоке (Россия).

Из рисунков видно, что ультразвуковая экстракция менее эффективна для извлечения женьшеневых сапонинов из образцов свежего корня женьшеня, по сравнению с извлечением из образцов высушенных корней женьшеня. Отдельного рассмотрения заслуживает хроматограмма сконцентрированного экстракта из образца корней *P. ginseng* (рис. 54). На ней присутствует множество пиков менее распространенных гинсенозидов, в тоже время некоторые пики, присутствовавшие на хроматограмме (рис. 53) экстракта из того же образца корня, проведенная в выбранных условиях экстракции (раздел 2.2.2), имеют площадь значительно

меньшую, что может быть объяснено частичным разложением и трансформацией основных гинсенозидов с образованием менее распространенных сапонинов в процессе концентрирования экстракта (или во время самой экстракции при нагревании). Отмеченные точками на градиентном хроматографическом профиле гинсенозиды, содержащиеся в исследованных экстрактах представлены на рисунке 59.

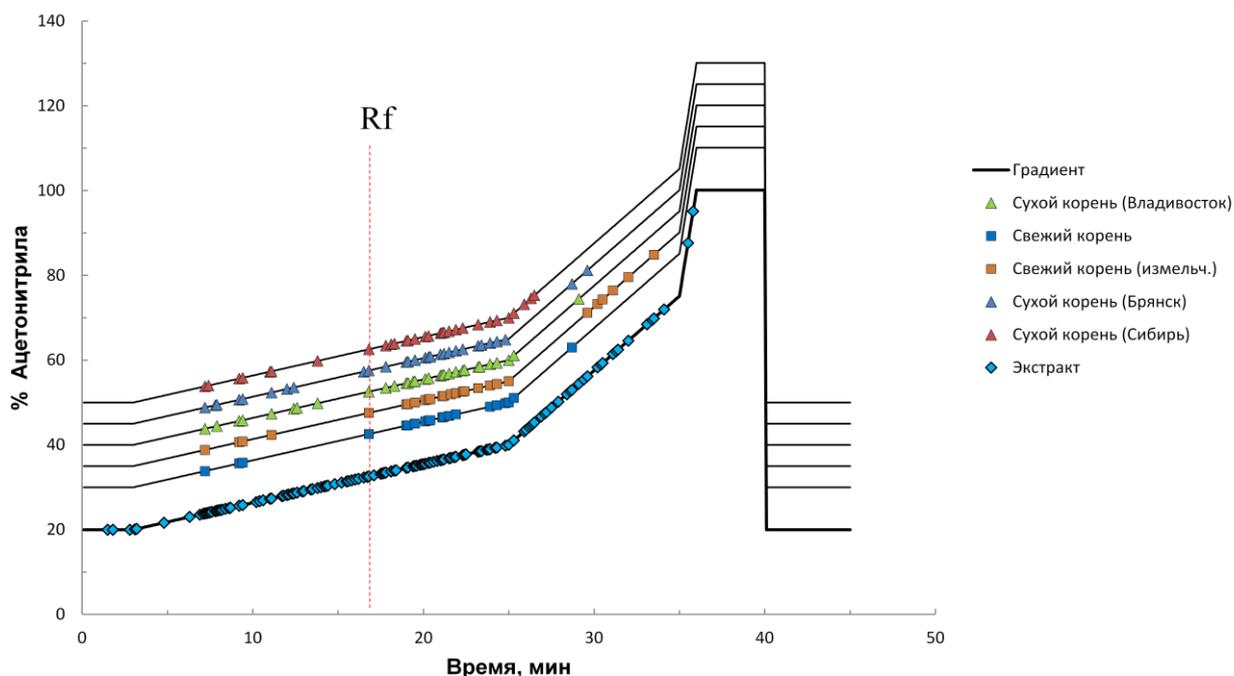


Рис. 59. Хроматографический профиль градиентного элюирования, на котором отмечены точками времена удерживания сапонинов, содержащихся в различных образцах корней женьшеня.

Определение структуры сахаридных заместителей и сапогенинов по масс-спектрам и временам удерживания проводилось в соответствии с алгоритмом, рассмотренным в разделе 4.2. Гинсенозиды, основанные на измененных сапогенинах, были обнаружены и идентифицированы по совпадению молекулярных масс с известными из литературных данных значениями [8, 143]. В приложении (табл. П1) приведены сокращенные формулы обнаруженных соединений, составленные из идентифицированных по масс-спектрам структурных элементов. В экстракте из сухого корня женьшеня (Брянск) был обнаружен гинсенозид Rf и следы псевдогинсенозида F11, являющегося биомаркером другого вида женьшеня (*P. quinquefolius*) [15]. В таблице 16 приведены суммарные данные по составу женьшеневых сапонинов в исследованных образцах корней.

Таблица 16. Химический состав сапонинов в исследованных образцах корня женьшеня.

Образцы	Гинсенозиды					
	ППТ	ППД	ОАК	ОТ	Измененный сапогенин	Всего
Сухой корень (Дальний Восток)	12	16	1	0	1	30
Свежий корень (Дальний Восток)	5	15	0	0	0	20
Свежий корень (Дальний Восток, измельч.)	6	18	2	0	0	24
Сухой корень (Сибирь)	10	14	3	1	1	29
Сухой корень (Брянская обл.)	9	19	1	0	1	30
Сконцентрированный экстракт корня женьшеня (Дальний Восток)	29	22	3	3	41	98

Количественный состав сапонинов был определен с использованием гардуировочных зависимостей (раздел 3.3). Наибольшие концентрации гинсенозидов Rg1 и Rf – основных маркеров *P. ginseng* были определены в экстракте из корня женьшеня, собранного и высушенного на Дальнем Востоке (табл. 17). Кроме того, экстракт измельченного свежего корня женьшеня (рис. 58) содержит большие количества (и большее число) гинсенозидов, чем экстракт из крупно нарезанного свежего корня.

Таблица 17. Содержание гинсенозидов в исследованных образцах корня женьшеня.

Образцы	Гинсенозиды, мг г ⁻¹						
	Rg1	Rf	F11	R1	Rd	Rb1	Rb2
Сухой корень (Дальний Восток)	1.7	1.5	Менее 0.005	0.2	0.2	0.3	0.4
Свежий корень (Дальний Восток)	0.2	0.2	Менее 0.005	Менее 0.005	Менее 0.005	0.1	0.1
Свежий корень (Дальний Восток, измельч.)	0.4	0.2	Менее 0.005	Менее 0.005	0.5	0.1	0.2
Сухой корень (Сибирь)	1.4	0.6	0.1	0.3	0.7	0.5	0.5
Сухой корень (Брянская обл.)	1.4	0.5	Менее 0.005	Менее 0.005	0.4	0.3	0.3
Сконцентрирован- ный экстракт корня женьшеня (Дальний Восток)	6.4	0.5	Менее 0.005	Менее 0.005	Менее 0.005	0.1	1.4

5.1.2 Анализ коммерческих продуктов на основе женьшеня

Помимо корней женьшеня были проанализированы экстракты из коммерческих продуктов, а именно: корейского женьшеневого чая, высушенных колец корня американского женьшеня и фитопродукта, состоящего из смеси высушенных экстрактов из корней женьшеня. Была использована универсальная разработанная процедура ультразвуковой экстракции (раздел 2.2.2) и те же условия хроматографического разделения, что и в случае анализа корней женьшеня. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 60-62.

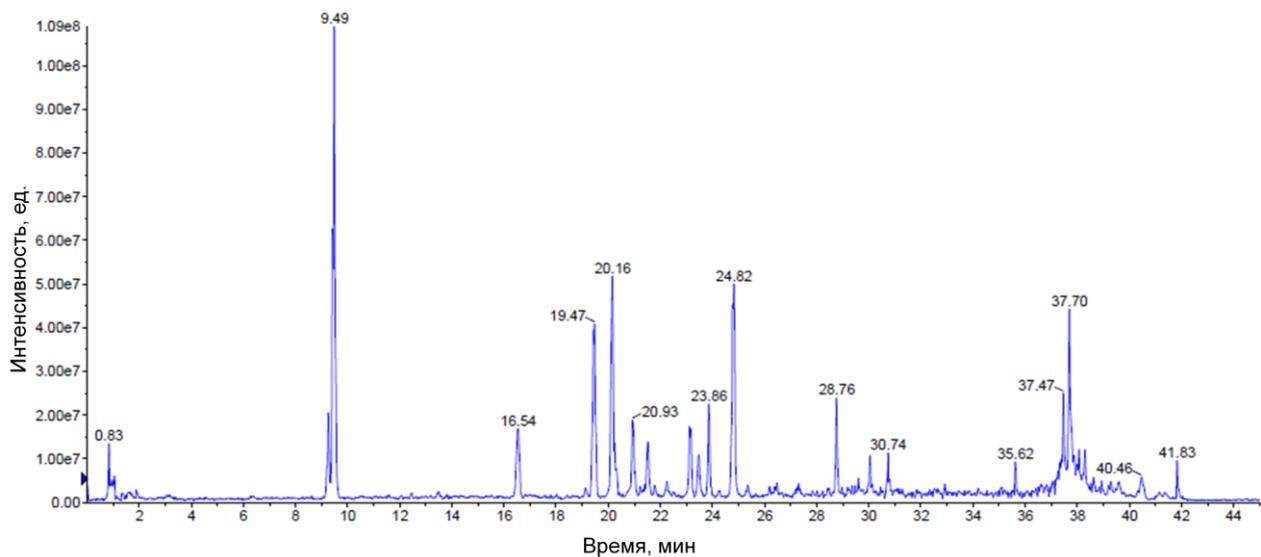


Рис. 60. Хроматограмма экстракта из высушенных колец американского женьшеня, Leiyunshang (Шанхай, Китай).

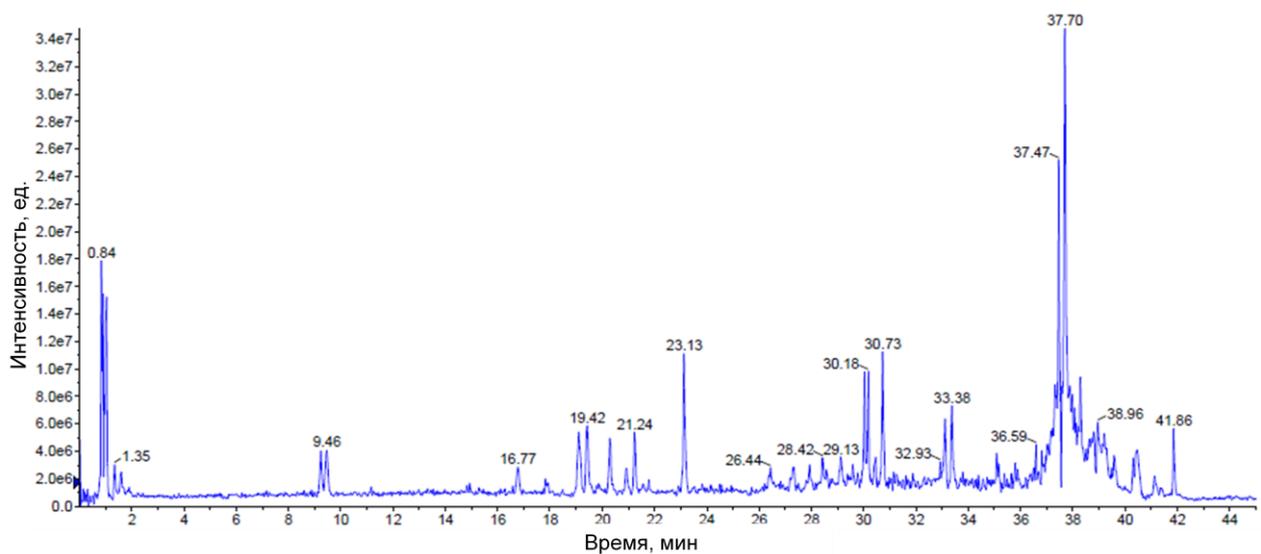


Рис. 61. Хроматограмма экстракта из корейского женьшеневого чая, Korea Ginseng Industrial co., ltd. (Корея).

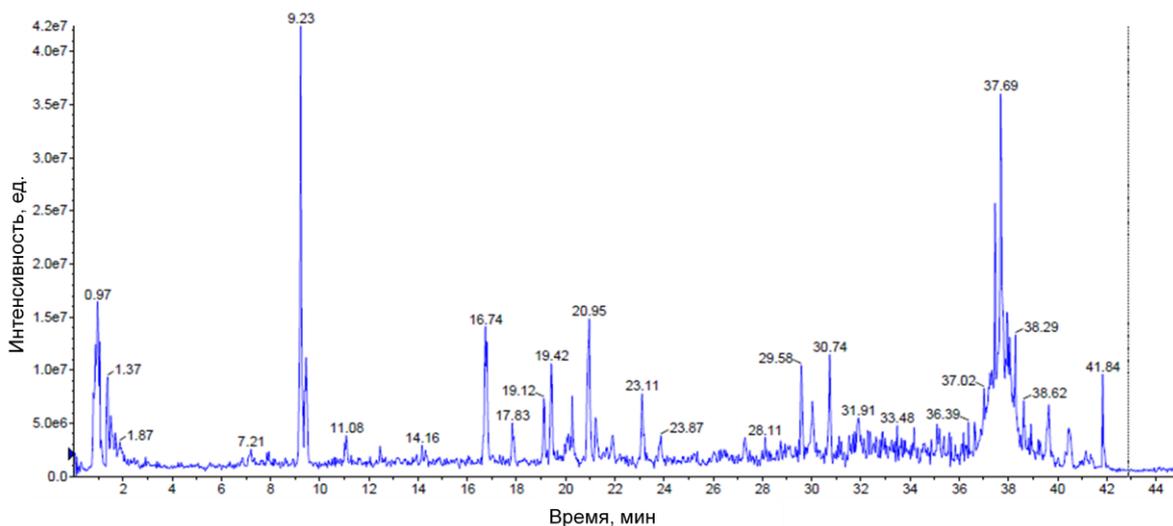


Рис. 62. Хроматограмма экстракта из фитопродукта на основе экстрактов из корня женьшеня.

Следует отметить низкие значения высот пиков на хроматограммах фитопродукта и женьшеневого чая, что, с учетом их практически полного растворения в экстрагенте, свидетельствует о том, что валовое содержание в них женьшеневых сапонинов меньше, чем в сухом корне женьшеня, являющегося исходным сырьем для их производства. Отмеченные точками на градиентном хроматографическом профиле гинсенозиды, содержащиеся в исследованных экстрактах представлены на рисунке 63.

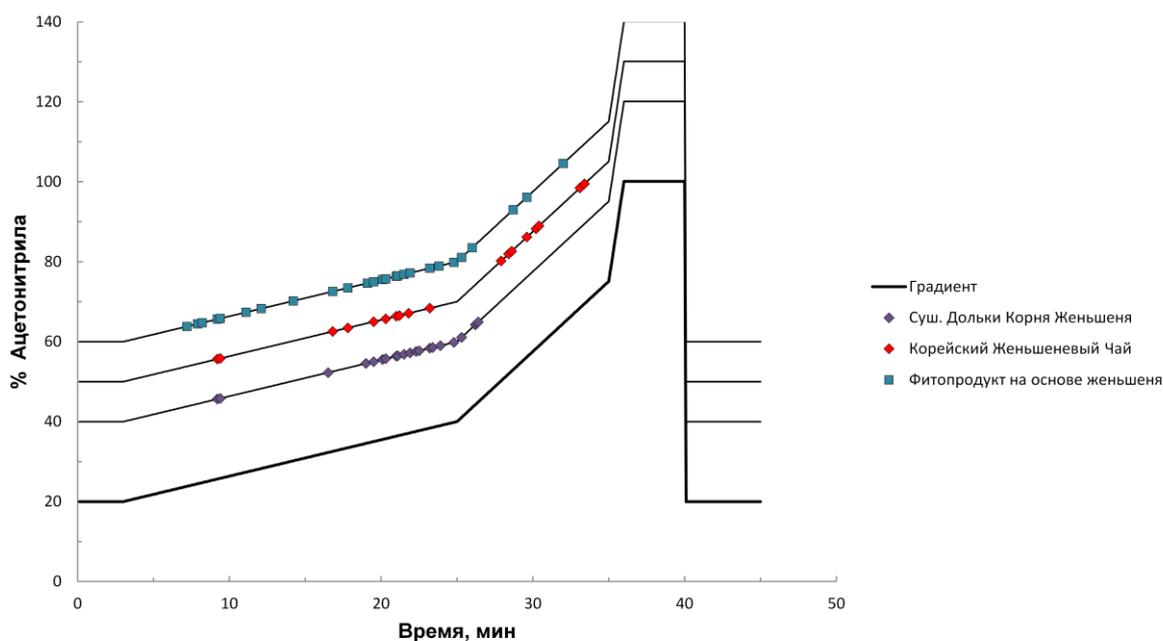


Рис. 63. Хроматографический профиль градиентного элюирования, на котором отмечены точками времена удерживания сапонинов, содержащихся в образцах коммерческих продуктов.

В таблице П1 приведены сокращенные формулы обнаруженных соединений, составленные из идентифицированных по масс-спектрам структурных элементов. Содержания основных гинсенозидов в коммерческих продуктах оказалось меньше (табл. 18), по сравнению с экстрактами из растительного материала (табл. 16).

Таблица 18. Содержание гинсенозидов в исследованных образцах коммерческих продуктов.

Образцы	Гинсенозиды, мг г ⁻¹						
	Rg1	Rf	F11	R1	Rd	Rb1	Rb2
Суш. Кольца Корня Женьшеня	0.4	Менее 0.005	0.3	Менее 0.005	0.4	0.6	Менее 0.005
Корейский Женьшеневый Чай	0.1	0.05	Менее 0.005	Менее 0.005	Менее 0.005	0.1	0.05
Фитопродукт на основе Женьшеня	0.8	0.2	Менее 0.005	Менее 0.005	Менее 0.005	0.2	Менее 0.005

В экстракте из высушенных колец корня американского женьшеня был обнаружен псевдогинсенозида F11, что в совокупности с отсутствием пика гинсенозида Rf подтверждает заявленный состав продукта (корни *P. quinquefolius*) [15]. В таблице 19 приведены суммарные данные по составу женьшеневых сапонинов в исследованных образцах корней.

Таблица 19. Химический состав сапонинов в исследованных коммерческих продуктах на основе женьшеня

Образцы	Гинсенозиды					
	ППТ	ППД	ОАК	ОТ	Измененный сапогенин	Всего
Суш. Кольца Корня Женьшеня	3	14	3	1	0	21
Корейский Женьшеневый Чай	5	6	2	0	5	18
Фитопродукт на основе Женьшеня	7	13	3	0	4	27

5.1.3 Классификация обнаруженных гинсенозидов по типу сапогенина

В таблице П1 приведены сокращенные формулы обнаруженных соединений составленные из идентифицированных по масс-спектрам структурных элементов, сапонины, имеющие измененные сапогенины были идентифицированы по совпадению молекулярных масс с известными из литературных данных значениями [8, 143]. Предложенная в разделе 4.2 система классификации по паттернам фрагментации ППТ, ППД и ОТ сапогенина, при использовании тестового набора данных, состоящего из масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в тестовой смеси и масс-спектров тех же (имеющих одинаковое время удерживания и совпадающие сигналы в масс-спектрах) гинсенозидов, обнаруженных в экстрактах, позволяет правильно классифицировать ППТ, ППД и ОТ гинсенозиды (рис. 64).

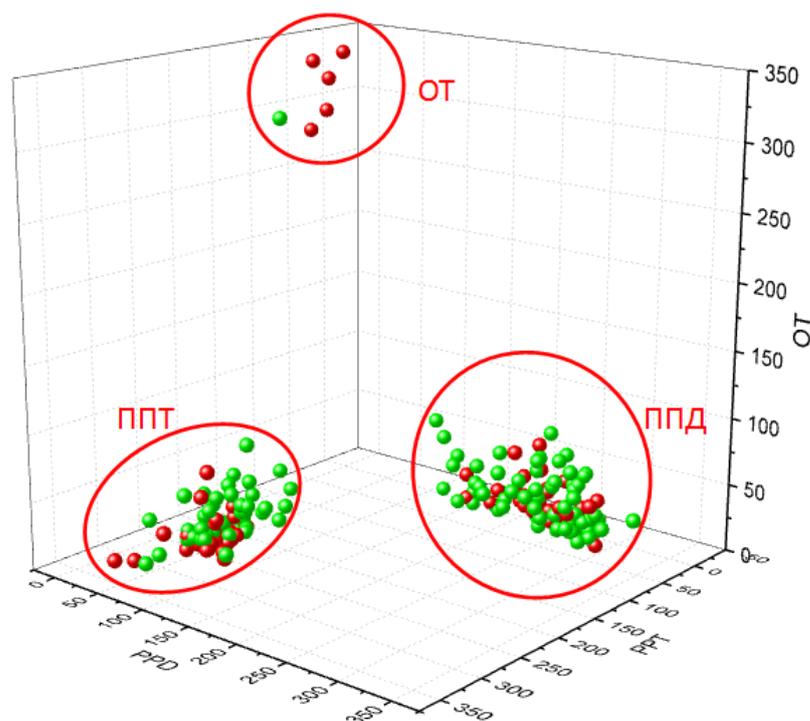


Рис. 64. Тестовая выборка масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в пространстве трех заданных координат*; обнаруженные в экстрактах гинсенозиды с ППТ, ППД и ОТ сапогенинами.

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

Однако, имеющие некоторые измененные сапогенины, например, обнаруженные в Корейском женьшеневом чае дегидратированные в положении С20 ППТ и ППД гинсенозиды, будут давать те же фрагментные ионы в масс-спектрах, что и простые ППТ и ППД гинсенозиды, вследствие того, что гидроксильная группа в положении С20 легко отщепляется от остова молекулы. Это приводит к тому, что гинсенозиды с дегидратированными сапогенинами будут ошибочно классифицированы как обычные (рис. 65). Для гинсенозидов, имеющих ОАК сапогенин, паттерн фрагментации будет сильно отличаться (раздел 4.2), поэтому такие гинсенозиды не будут ложно классифицированы в выбранной системе переменных (рис. 66).

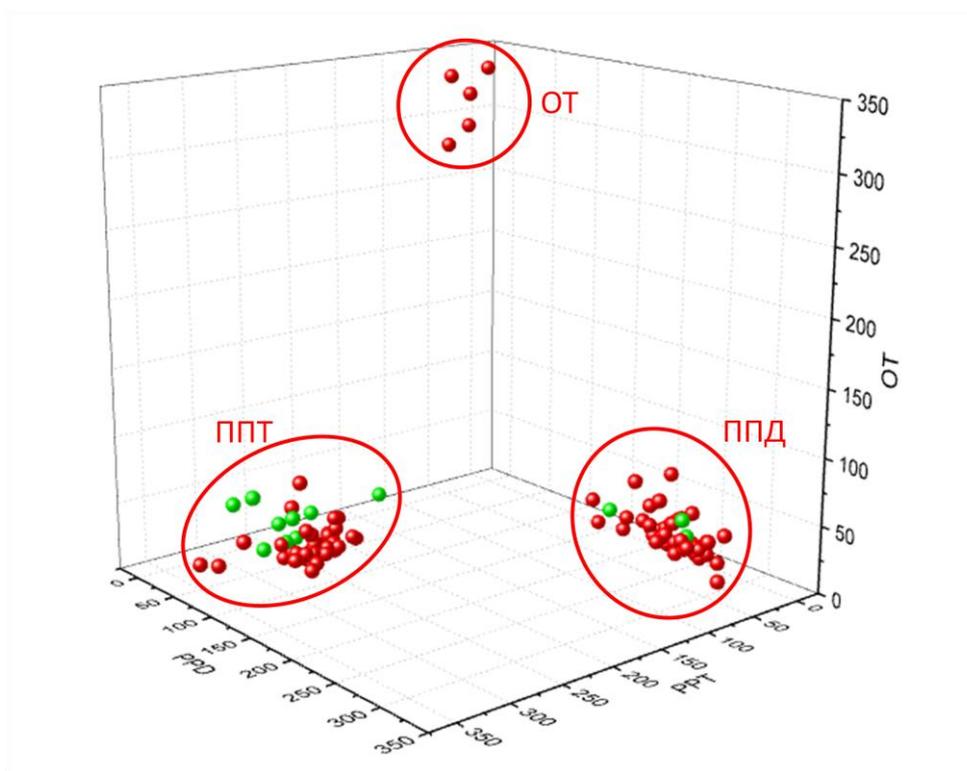


Рис. 65. Тестовая выборка масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в пространстве трех заданных координат*; обнаруженные в экстрактах гинсенозиды с дегидратированными ППТ и ППД сапогенинами.

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

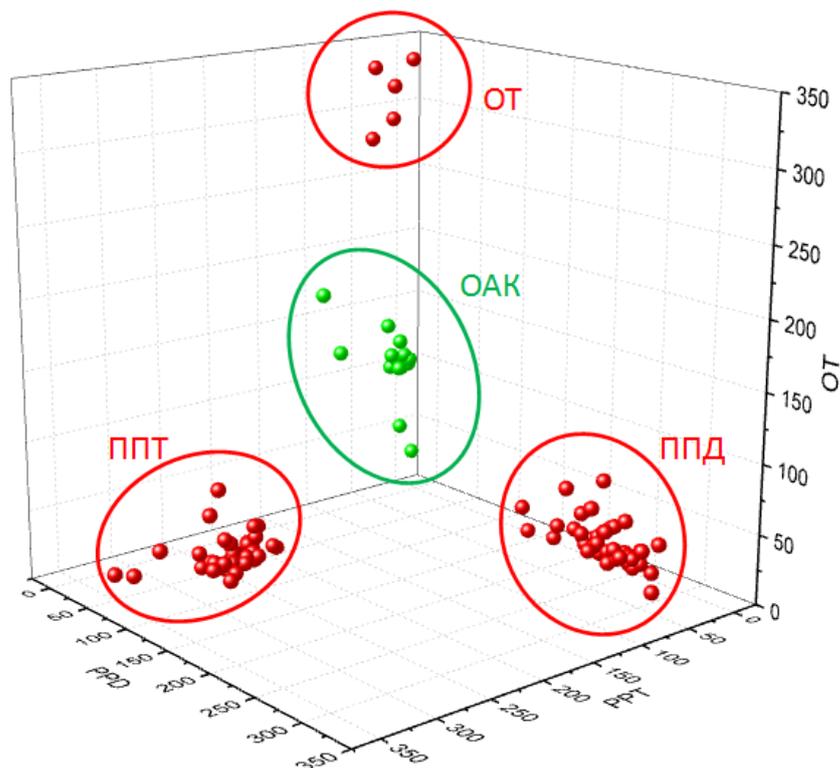


Рис. 66. Тестовая выборка масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в пространстве трех заданных координат*; обнаруженные в экстрактах гинсенозиды с ОАК сапогенином.

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

Гинсенозиды, имеющие B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , B_8 и A_2 сапогенин, обнаруженные на низких уровнях содержания в исследованных экстрактах могут быть ошибочно классифицированы как ППТ и ОТ гинсенозиды (рис. 67). Использование разработанного алгоритма получения структурной информации (раздел 4.2) и представительной выборки из стандартных образцов гинсенозидов всех известных классов (по типу сапогенина) может позволить провести более достоверную классификацию.

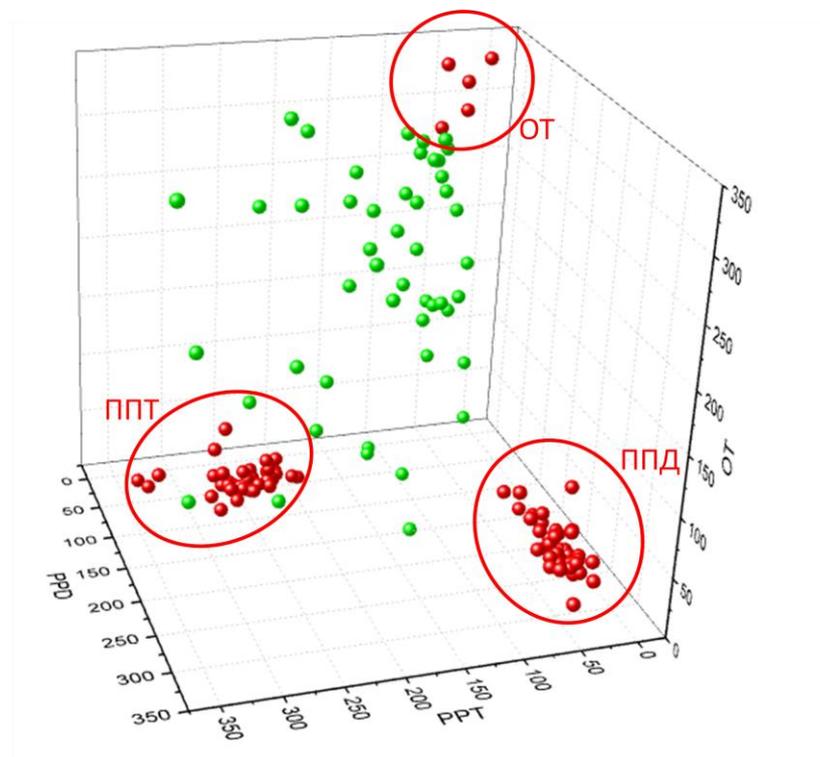


Рис. 67. Тестовая выборка масс-спектров 17 стандартных гинсенозидов в пространстве трех заданных координат*; обнаруженные в экстрактах гинсенозиды с измененными сапогенином.

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

5.3 Определение псевдогинсенозидов в режиме регистрации выбранных ионных переходов

Для апробации разработанного способа определения псевдогинсенозидов детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов были проанализированы образцы экстрактов из высушенного корня растения *P. ginseng* и коммерчески доступного образца сушеных долек корня *P. quinquefolius*. Экстракцию проводили 20% раствором метанола в воде (рис. 64).

В одном из образцов сухого корня азиатского женьшеня была обнаружена примесь псевдогинсенозида F11. Этот факт был подтвержден с применением ранее разработанного подхода детектирования гинсенозидов в режиме сканирования на линейной ионной ловушке (рис. 65).

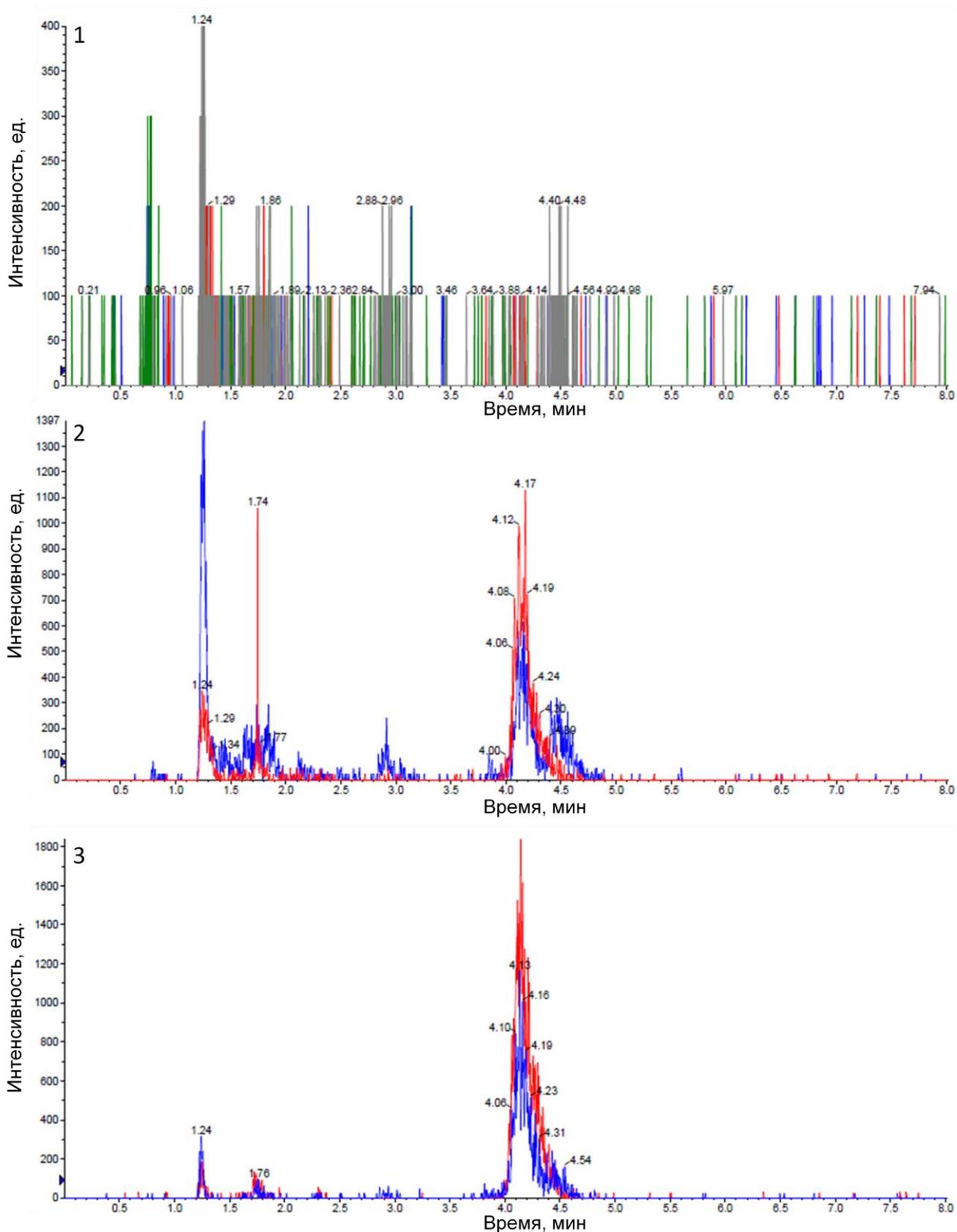


Рис. 64. Хроматограммы экстрактов из образцов сухого корня азиатского женьшеня из Брянской области (1), Сибири (2) и коммерческого образца сухих долек американского женьшеня (3), полученные в режиме регистрации выбранных ионных переходов.

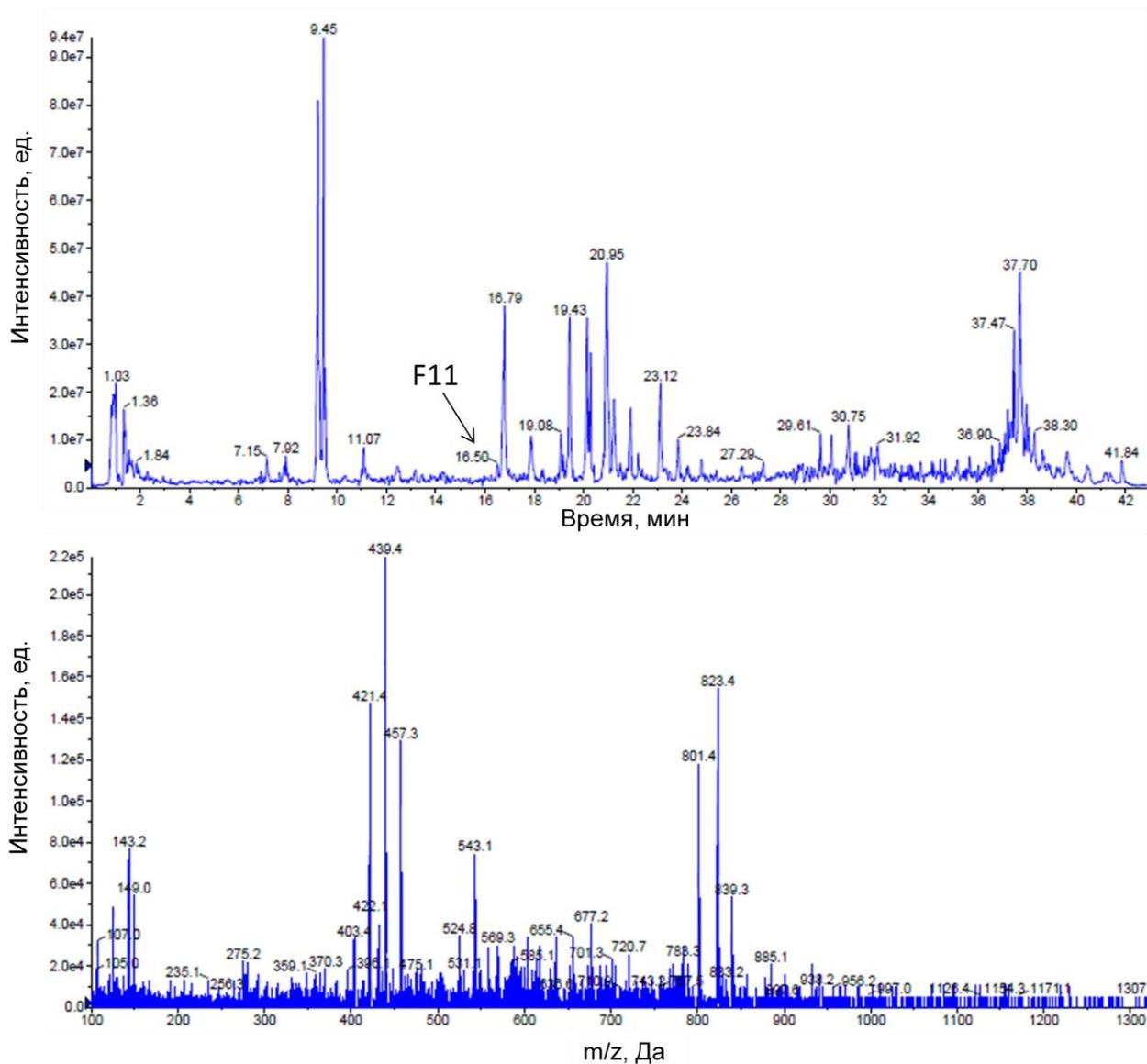


Рис. 65. Хроматограмма экстракта из образца сухого корня женьшеня (Сибирь), полученная в режиме градиентного элюирования на колонке Acclaim RSLC 120 C18 при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл мин^{-1} . Масс-спектр пика псевдогинсенозида F11, полученный в режиме сканирования на гибридной линейной ионной ловушке.

Расчет содержаний определяемых компонентов (табл. 20) проводили согласно построенным уравнениям градуировочной зависимости (раздел 3.1.2). Пределы обнаружения разработанного способа находили как минимальные содержания веществ в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика не меньше 3). Пределы обнаружения псевдогинсенозидов F11 и RT5 в исследованных образцах в режиме регистрации выбранных ионных переходов составили 20 и 10 нг мл^{-1} соответственно.

Таблица 20. Содержания псевдогинсенозидов F11 и RT5 в образцах корня женьшеня ($N=3$, $P=0.95$)

Образец	Содержание F11, мкг г ⁻¹	Содержание RT5, мкг г ⁻¹
Кольца корня <i>P. quinquefolius</i>	200±20	< 1
Женьшень сух. «Сибирь»	76±7	На уровне 1
Женьшень сух. «Брянская обл.»	< 2	< 1

5.4 Исследование состава женьшеневого улуна

Отдельно были исследованы образцы женьшеневого чая (улуна). В состав этого объекта входит чайный лист и экстракт из корня женьшеня. Получаемые в ходе процесса ферментации чая соединения могут отличаться от исходных женьшеневых сапонинов. На сегодняшний день в литературе отсутствуют упоминания о структуре сапонинов, входящих в состав женьшеневого улуна, поэтому в целях уточнения структуры этих соединений было решено применить метод ЯМР.

5.4.1 МС анализ женьшеневого улуна

Для исследования состава женьшеневого чая была использована разработанная универсальная процедура ультразвуковой экстракции (раздел 2.4) и те же условия хроматографического разделения, что и в случае анализа остальных объектов (раздел 3.3). Полученные хроматограммы представлены на рисунках 66 и 68.

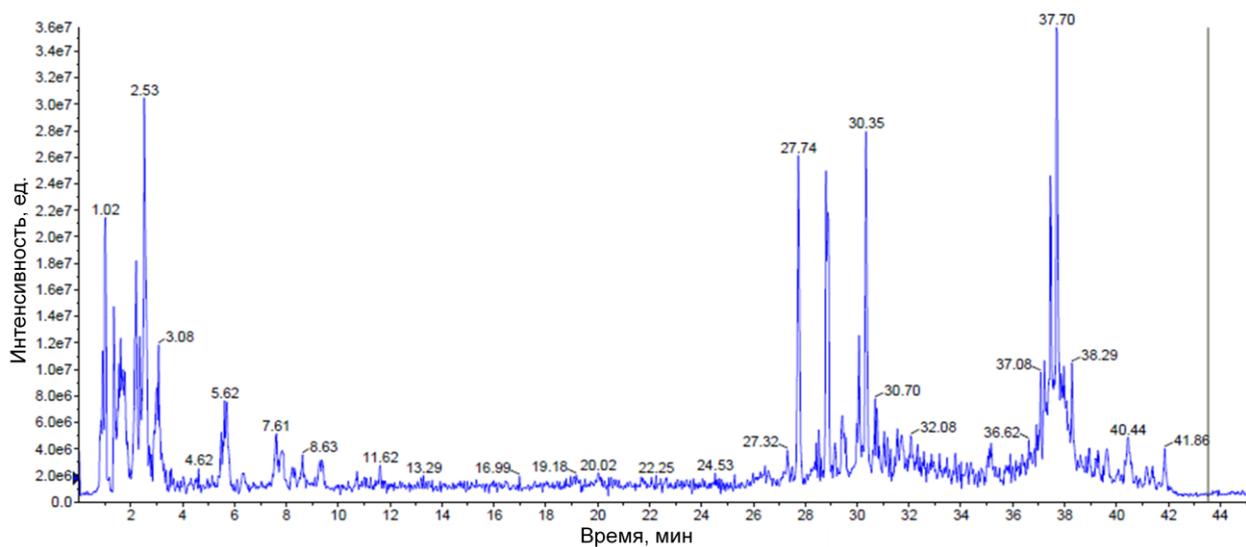


Рис. 66. Хроматограмма экстракта из женьшеневого чая (Леаланис, Россия).

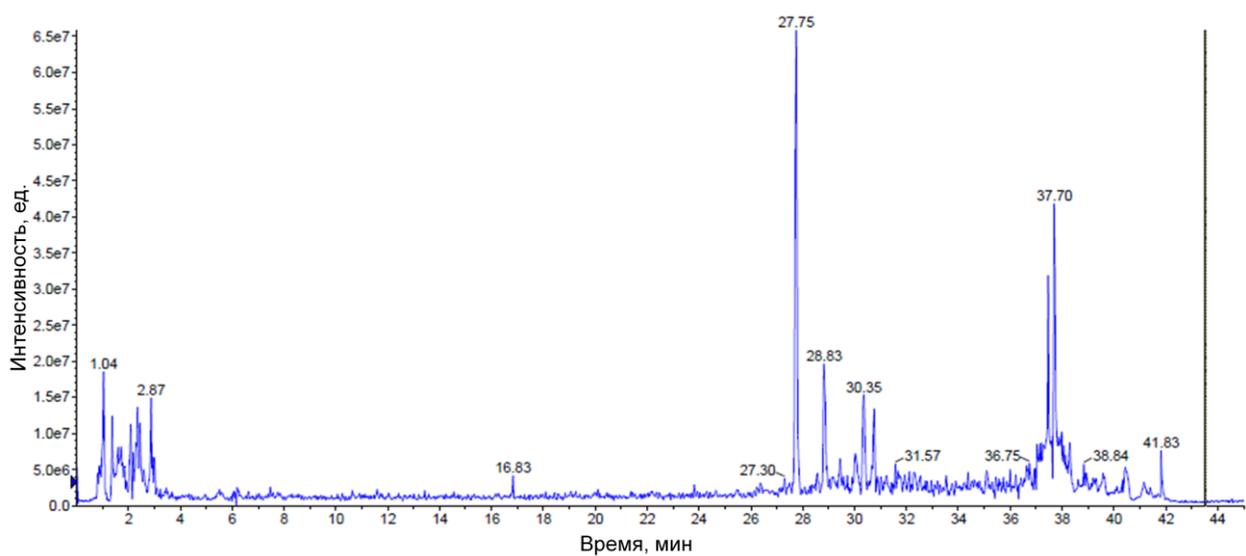


Рис. 67. Хроматограмма экстракта из женьшеневого чая (Huanglongtai tea co., ltd., Китай).

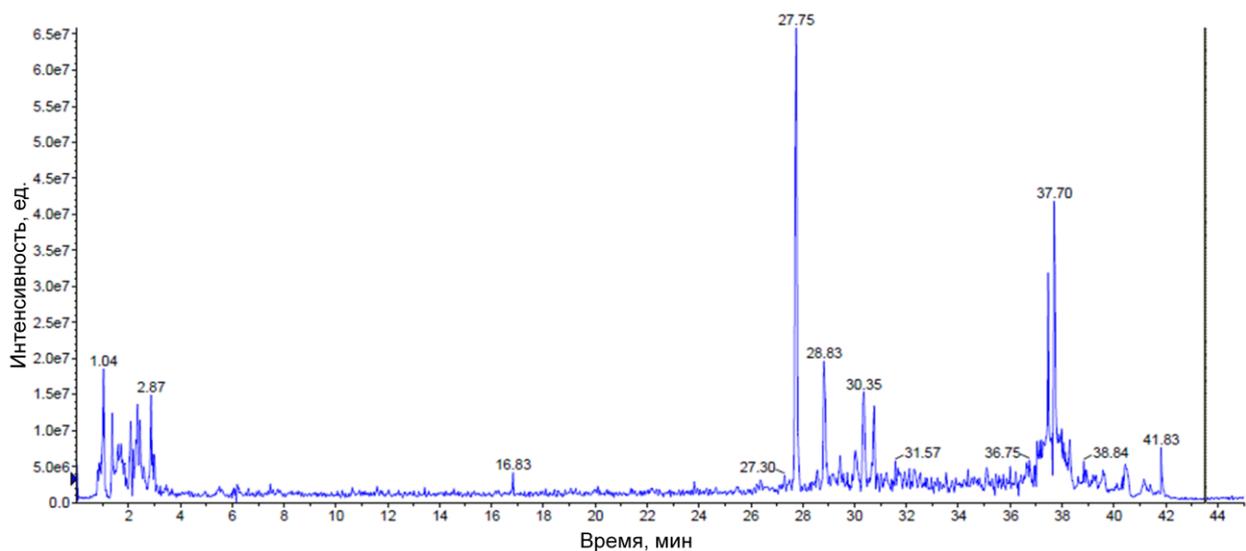


Рис. 68. Хроматограмма экстракта из женьшеневого чая (Niktea, Россия).

Оба исследованных образца женьшеневого улуна характеризуются присутствием интенсивных пиков с временами выхода в диапазоне от 27 до 33 минут, отсутствующих на хроматограммах обычного улуна (рис. 69).

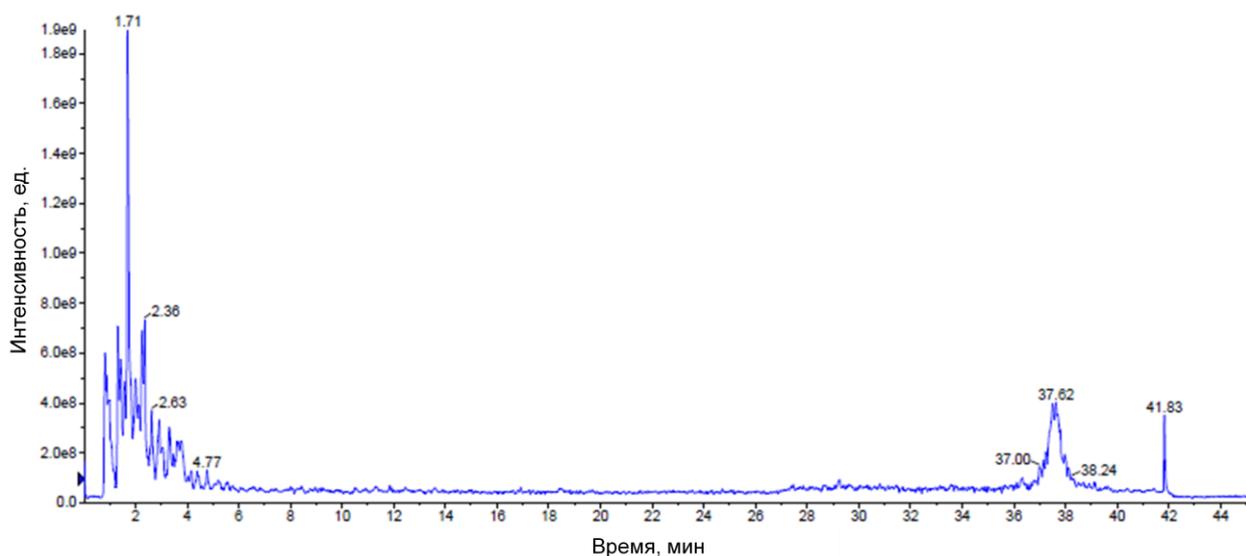


Рис. 69. Хроматограмма экстракта из зеленого чая (улуна) (Zhejiang Tea Company, Китай).

Масс-спектры этих пиков женьшеневых сапонинов (27 – 33 мин) содержали одинаковую группу сигналов во второй области, соответствующую фрагментам, отвечающим строению сапогенина (рис. 70).

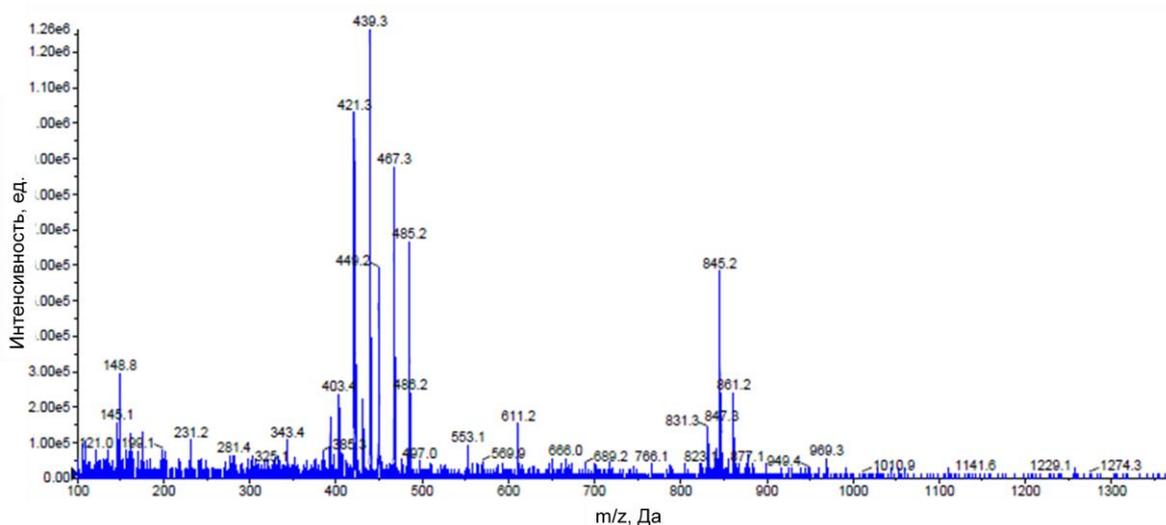


Рис. 70. Масс-спектр пика ($t_R = 27.75$), присутствующего на хроматограммах женьшеневого чая.

Паттерн фрагментации этого сапогенина (**X**) не совпадает ни с одним из рассмотренных ранее. Времена удерживания в тех же хроматографических условиях, что и при анализе корней на содержание обычных гинсенозидов, достаточно велики и соответствуют протопанаксадиольным сапонинам с небольшим числом заместителей. Наличие двух серий сигналов (с m/z $439 \rightarrow 421 \rightarrow 403$ и m/z $485 \rightarrow 467 \rightarrow 449 \rightarrow 431$) с последовательным отщеплением молекул воды от исходного сапогенина, дает возможность предположить наличие небольшого по молекулярной массе формил-заместителя, вероятно, появившегося в процессе ферментации и термической обработки чая, с добавкой настойки женьшеня (рис. 71).

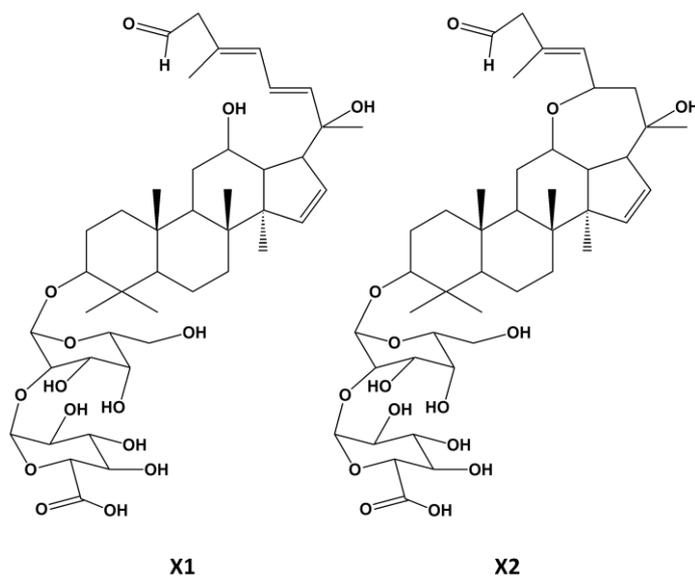


Рис. 71. Возможные структуры сапогенина **X**, входящего в состав основных сапонинов женьшеневого чая.

Появление двойных связей и заместителей в боковой цепи гинсенозидов характерно для биотрансформации этих веществ [227]. Структура сапогенина обнаруженных соединений может быть уточнена с помощью референтных методов анализа, например, ЯМР. По наличию в масс-спектрах (рис. П18-П25) сигналов, соответствующих последовательному отщеплению сахаридных остатков и других заместителей можно выделить различные компоненты женьшеневого улуна (табл. 21).

Таблица 21. Сокращенные структурные формулы неизвестных компонентов чая на основе женьшеня.

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

5.4.2 Разработка способа полупрепаративного ВЭЖХ выделения компонентов женьшеневого чая

Поскольку отсутствие в коммерческом доступе стандартных образцов большинства известных, на сегодняшний день, гинсенозидов не позволяет проводить достоверную их идентификацию методом ВЭЖХ-МС/МС. Необходимо использовать другие методы (например, ЯМР) для подтверждения и уточнения их структуры. Особенно это важно в анализе женьшеневого чая (улуна), так как в доступной литературе нет информации о женьшеневых сапонилах, содержащихся в этом продукте, а структура их масс-спектров сильно отличается от известной из экспериментов со стандартными растворами самых распространенных гинсенозидов. Таким образом, по причине того, что в твердом образце женьшеневого чая содержится большое число, как целевых аналитов, так и других компонентов, следует провести предварительное разделение и сбор фракции,

содержащей, по-возможности, один из определяемых аналитов. Это позволит наиболее достоверно определить его структуру методом ЯМР.

Еще одной задачей в данном исследовании стало получение достаточных количеств выбранного аналита, поскольку ЯМР намного менее чувствительный метод анализа. На первой стадии экспериментов была использована колонка Kromasil 100 C18 (4.0×100 мм, 5 мкм) для успешного разделения пробы при ее вводимом объеме 100 мкл (максимальный объем вводимой пробы для используемой хроматографической системы; раздел 2.1). На рисунке 72 представлена хроматограмма экстракта (полученного способом, описанным в разделе 2.2.4) в выбранных условиях хроматографического разделения.

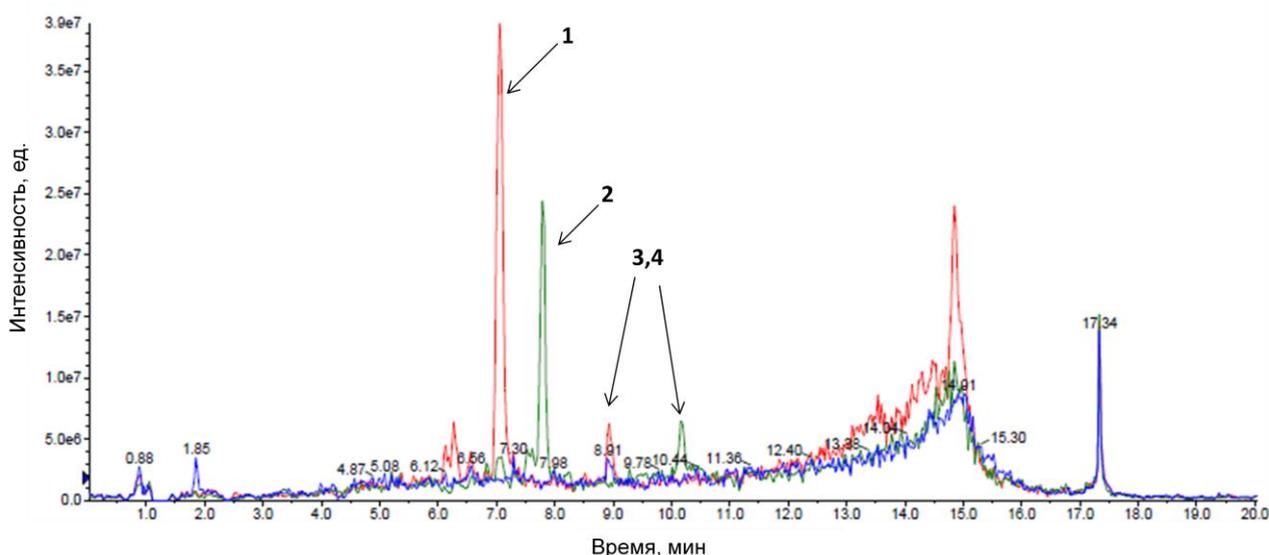


Рис. 72. Хроматограмма экстракта из женьшеневого чая (Леаланис, Россия) в режиме регистрации выделенных ионов. (1 – m/z 845 (X-3-GlcGluA), 2- m/z 269, m/z 887, 4 – m/z 909).

Для определения структуры сапогенина было решено осуществить сбор фракции, содержащей X-3-GlcGluA (1). Далее исследовали возможность получения наиболее концентрированного экстракта, поскольку высокое содержание аналита в пробе позволяет уменьшить число актов отбора фракции, а следовательно, и время эксперимента. Факторами, влияющими на эффективность извлечения являются: состав экстрагента, время экстракции и соотношение фаз при экстракции. Зависимость извлечения от состава экстрагента уже была рассмотрена в разделе 3.4 для обычных гинсенозидов. В случае экстракции аналитов из женьшеневого чая наблюдается аналогичная зависимость (рис. 73). Независимо следует отметить, что

экстракция водой при температуре кипения намного менее эффективна, по сравнению с экстракцией водой при 30 °С на ультразвуковой бане.

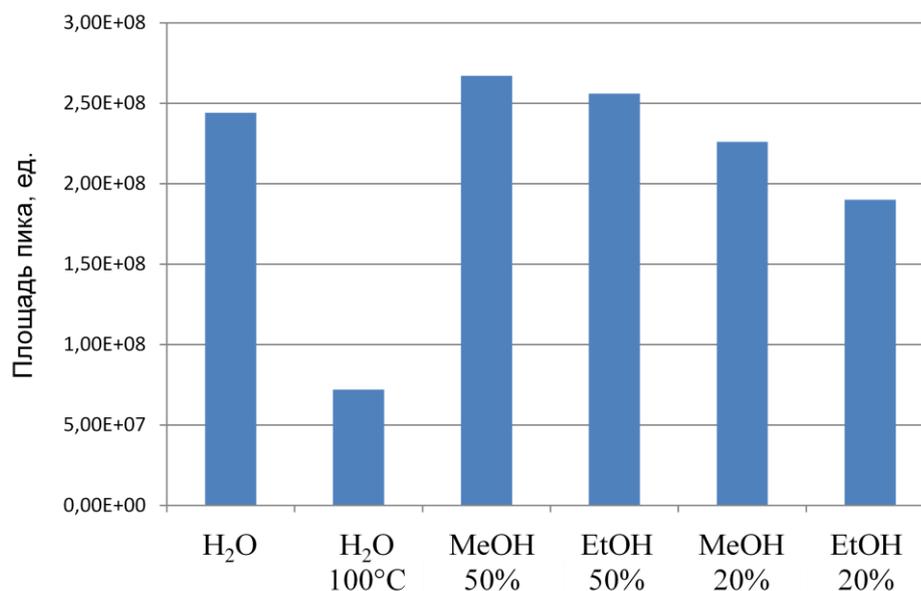


Рис. 73. Зависимость извлечения сапонинов из женьшеневого чая от состава экстрагента.

Далее использовали экстракцию 50% метанолом для получения наиболее концентрированного раствора компонентов чая, для этого сухой образец порошка чая в разных массовых соотношениях смешивали с раствором экстрагента. Полученные на ультразвуковой бане экстракты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (рис. 74). Для экстракции решено было использовать 5 мл 50% водного метанола на 1 г образца.

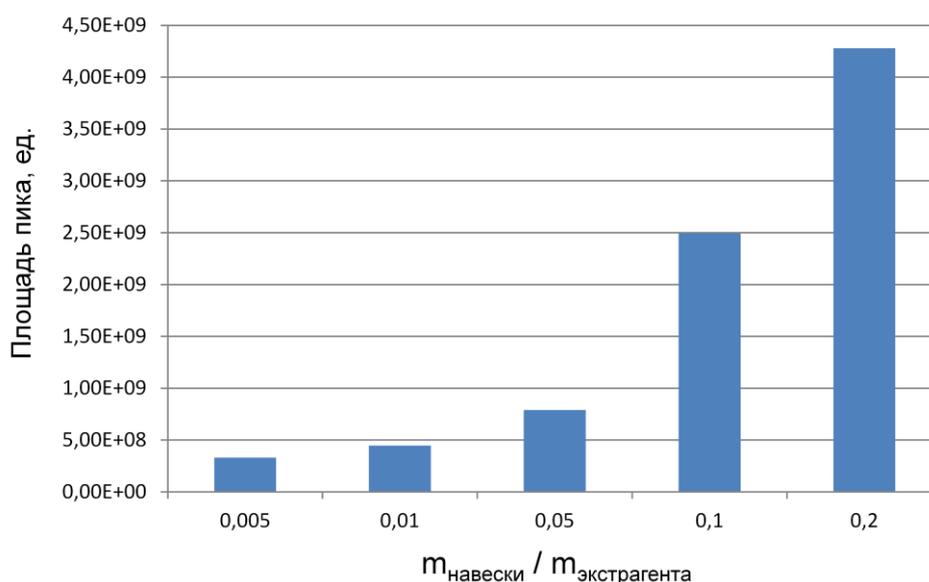


Рис. 74. Зависимость извлечения сапонинов из женьшеневого чая от соотношения масс навески и раствора экстрагента.

Оптимальное время экстракции определяли, проводя ультразвуковую экстракцию в выбранных условиях в течении разного временного интервала. Для установления доверительного интервала экстракцию в течении 30 минут проводили для трех образцов порошка чая. Доверительный интервал ($P=0.95$) оказался равным 11%. С учетом погрешности видно, что оптимальное извлечение достигается уже через 40 минут экстракции (рис. 75).

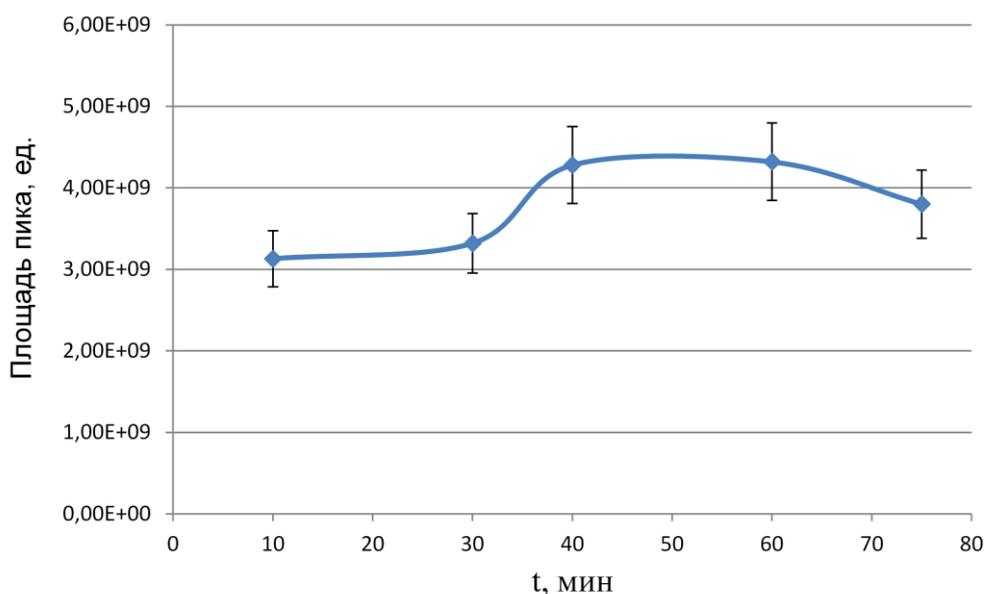


Рис. 75. Зависимость извлечения сапонинов из женьшеневого чая от продолжительности ультразвуковой экстракции.

В выбранных условиях была проведена экстракция из 3 г образца. Отбор фракции осуществляли переключением крана-дозатора на входе в масс-спектрометр. Для обеспечения чистоты фракции отбор проводили в центре хроматографической зоны (рис. 76).

После накопления 44 мл (110 циклов разделения и отбора), фракцию №1 осушали на ротационном испарителе при 0.8 КПа. Затем коричневый осадок растворяли в 700 мкл дейтерированного ДМСО и анализировали методом ЯМР. Собранную фракцию анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС на колонке Acclaim RSLC C18 (раздел 2.2.1) для того, чтобы проверить ее чистоту (рис. 77).

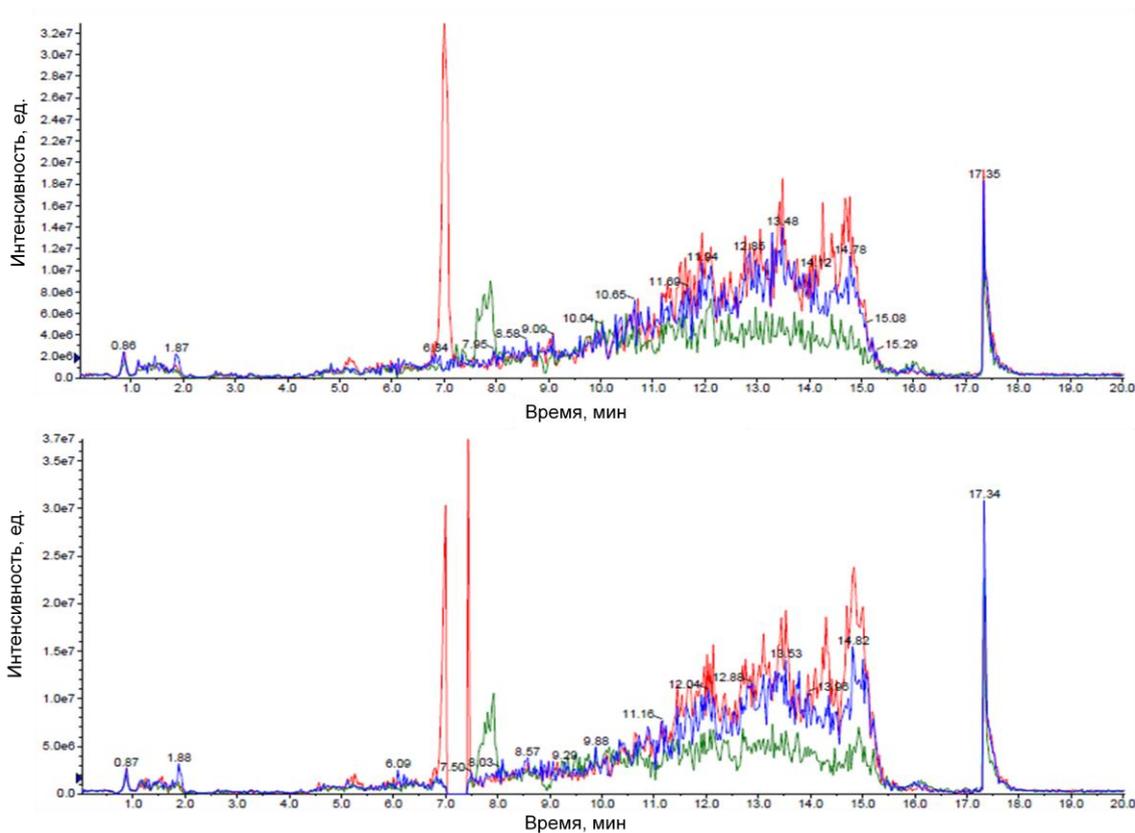


Рис. 76. Отбор фракции №1 с помощью переключения крана-дозатора на 7 мин хроматографического анализа.

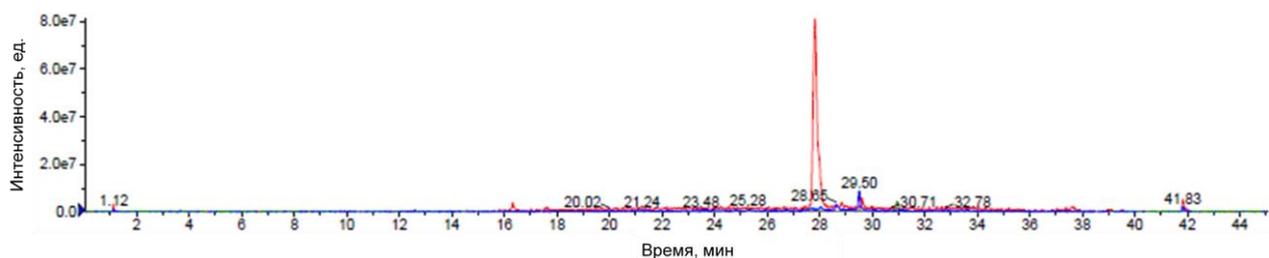


Рис. 77. Хроматограмма фракции №1 на колонке Asclaim RSLC C18 в режиме регистрации выбранных ионов.

На втором этапе было решено провести сбор фракции в экстракте из 7 г образца. Программа градиента отличалась от использованной на первой стадии экспериментов (рис. 78).

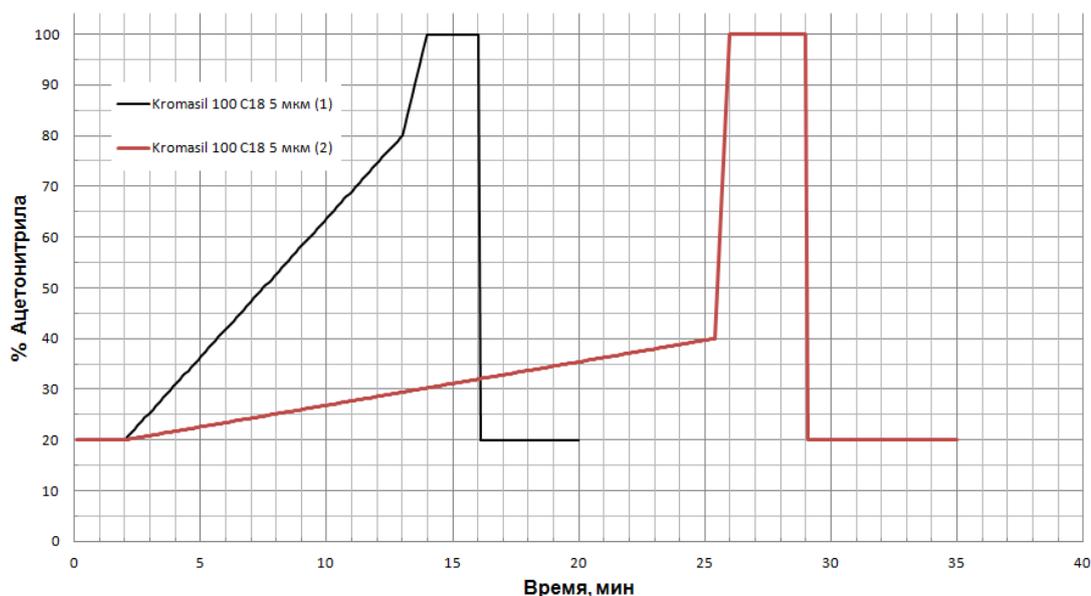


Рис. 78. Программы градиентного элюирования на колонках Kromasil 100 C18 с диаметром зерна сорбента 5 мкм для сбора фракций № 1, 2.

Отбор фракции осуществляли переключением крана-дозатора на входе в масс-спектрометр. Для обеспечения чистоты фракции отбор проводили в центре хроматографической зоны между двумя соседними пиками (рис. 79).

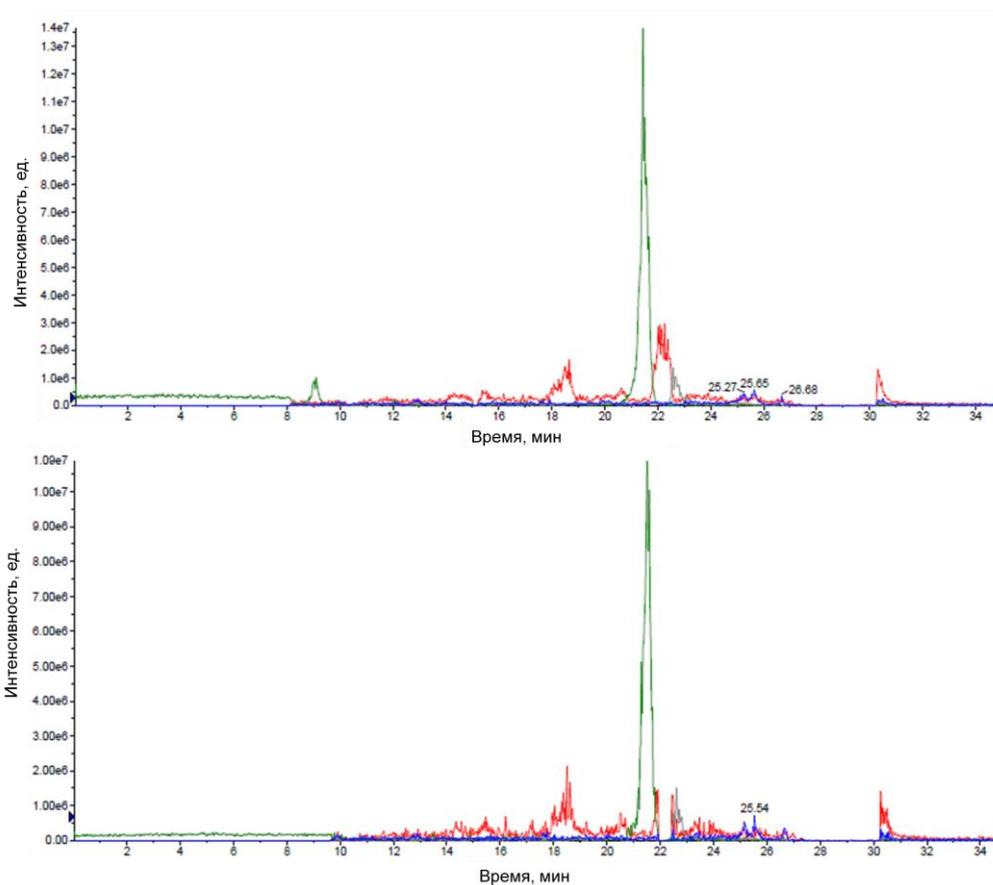


Рис. 79. Отбор фракции №2 с помощью переключения крана-дозатора на 22 мин хроматографического анализа.

После накопления 84 мл (210 циклов разделения и отбора), фракцию №2 подвергли лиофильной сушке (раздел 2.2.5). Полученное вещество представляло собой белое аморфное тело (массой 8.3 мг). После растворения в 350 мкл смеси пиридина-d5 и D₂O (7:1) проводили его анализ методом ЯМР. Остаток вещества (менее 0.1 мг) в бюксах для лиофильной сушки растворили в 1 мл смеси ацетонитрил:вода (1:4) и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС на колонке Acclaim RSLC C18 (рис. 80). На хроматограмме, зарегистрированной в режиме регистрации выбранных ионов, не наблюдалось характерных пиков сопутствующих сапонинов и других примесей.

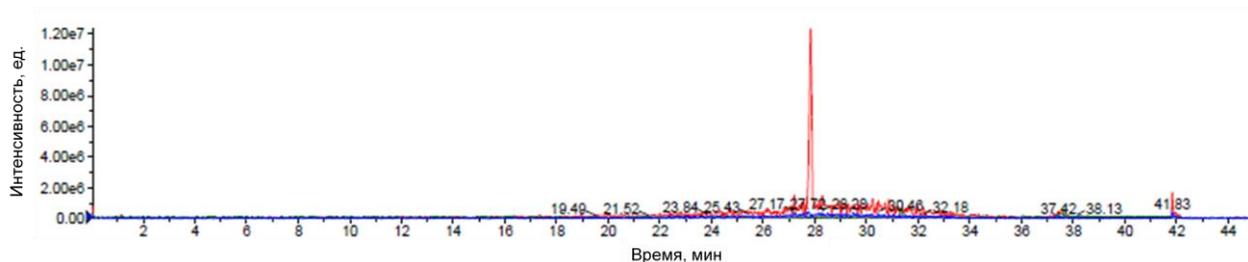


Рис. 80. Хроматограмма фракции №3 на колонке Acclaim RSLC C18 в режиме регистрации выбранных ионов.

5.4.3 ЯМР анализ фракций, содержащих биоактивные компоненты женьшеневого улуна

Анализ методом ЯМР собранных фракций № 1 и 2 проводили путем растворения их в 300 мкл дейтерированного ДМСО и 350 мкл смеси дейтеропиридина и D₂O (7:1), соответственно. В первом случае также был проанализирован стандартный образец гинсенозида Rh2 (рис. 81, П26) (4.5 мг). Полученные сигналы (табл. 22) интерпретировали с учетом информации из литературных источников [228] и общих положений ЯМР спектроскопии [229].

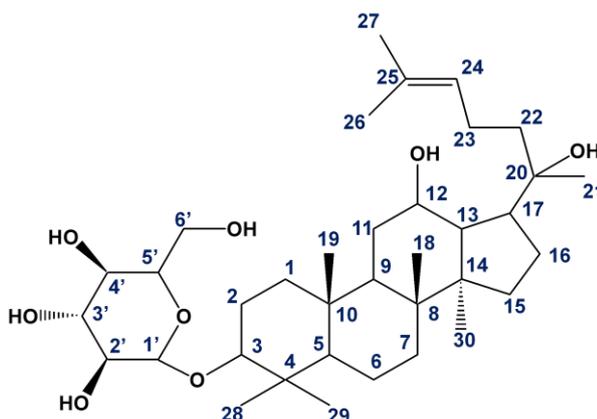


Рис. 81. Структура гинсенозида Rh2.

Таблица 22. Спектральные данные, полученные из ПМР (600 МГц) спектра гинсенозида Rh2 в гексадейтеро-ДМСО (δ в м.д.)

Положение	δ_{H}	Положение	δ_{H}
1	1.10-1.18 (1H, м)	17	1.84-1.92 (1H, м)
	1.35-1.45 (1H, перекр.)	18	0.84 (3H, с)
2	2.07-2.13 (1H, ушир.)	19	0.89 (3H, с)
	1.65-1.71 (1H, м)	20	-
3	3.09-3.14 (1H, м)	21	0.92 (3H, с)
4	-	22	1.35-1.45 (2H, перекр.)
5	0.92-1.01 (1H, перекр.)	23	1.92-1.96 (2H, м)
6	1.35-1.45 (1H, перекр.)	24	5.11 (1H, т)
	1.19-1.26 (1H, ушир.)	25	-
7	1.35-1.45 (1H, перекр.)	26	1.63 (3H, с)
	1.19-1.26 (1H, ушир.)	27	1.58 (3H, с)
8	-	28	1.03 (3H, с)
9	0.92-1.01 (1H, перекр.)	29	0.97 (3H, с)
10	-	30	0.76 (3H, с)
11	1.71-1.79 (1H, м)	1'	4.93 (1H, д)
	1.35-1.45 (1H, перекр.)	2'	4.39 (1H, м)
12	2.74-2.79 (1H, м)	3'	3.42 (1H, м)
13	1.52-1.61 (1H, перекр.)	4'	3.0-3.08 (1H, перекр.)
14	-	5'	3.0-3.08 (1H, перекр.)
15	0.72-0.78 (1H, перекр.)	6'	3.62 (1H, м)
16	1.26-1.35 (1H, м)		4.12 (1H, м)
	1.52-1.61 (1H, перекр.)		

Полученный в идентичных условиях ПМР спектр фракции № 1 (рис. П27) оказался не пригодным для интерпретации из-за низкой концентрации определяемого вещества в растворе. Предположительно, большие потери вещества произошли на стадии удаления растворителя на ротационном испарителе. Кроме того большое число перекрывающихся сигналов свидетельствовало о недостаточной чистоте собранной фракции.

После лиофильной сушки образца, содержащего фракцию № 2, вещество растворяли в дейтеро-пририне и D₂O. Полученные спектры ПМР и ¹³C ЯМР, а также корреляции в режимах COSY, HMBSC и HMQC (рис. П28-П32)

представлены в приложении. В таблице 23 приведены сигналы в ПМР и ^{13}C ЯМР спектрах фракции № 2.

Таблица 23. Спектральные данные ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O (δ в м.д.)

Поло- жение	δ_{H}	δ_{C}	Поло- жение	δ_{H}	δ_{C}
1	1.74-1.82 (1H, м)	29.5	21	1.60 (3H, с.)	18.2
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		22	5.00-5.04 (1H, м.)	127.0
2	2.25-2.40 (1H, перекр.)	45.3	23	5.02-5.07 (1H, д.)	128.6
	1.79-1.91 (1H, м.)		24	5.30-5.38 (1H, д.)	132.2
3	3.92-4.01 (1H, м.)	77.4	25	-	126.1
4	-	48.1	26	1.94 (3H, с.)	19.4
5	0.80-0.95 (1H, перекр.)	33.1	27	2.41-2.54 (1H, перекр.)	52.9
6	1.60-1.69 (1H, перекр.)	27.4		2.02-2.10 (1H, перекр.)	
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		28	1.18 (3H, с.)	31.0
7	1.69-1.74 (1H, перекр.)	25.5	29	1.50 (3H, с.)	17.2
	1.10-1.42 (1H, перекр.)		30	1.03 (3H, с.)	14.8
8	-	41.5	31	-	160.1
9	0.80-0.95 (1H, перекр.)	32.2	1'	4.40-4.48 (1H, перекр.)	103.0
10	-	40.6	2'	4.28-4.34 (1H, перекр.)	80.3
11	2.25-2.40 (1H, перекр.)	35.5	3'	4.14-4.19 (1H, м.)	76.2
	1.82-1.93 (1H, м.)		4'	3.70-3.74 (1H, м.)	72.6
12	2.62-2.71 (1H, м.)	70.2	5'	3.61-3.70 (1H, перекр.)	70.8
13	2.21-2.25 (1H, м.)	44.1	6'	4.28-4.34 (1H, перекр.)	61.4
14	-	53.2		4.01-4.08 (1H, перекр.)	
15	4.72-4.80 (1H, перекр.)	124.1	1''	4.47-4.58 (1H, перекр.)	105.0
16	4.72-4.80 (1H, перекр.)	124.9	2''	4.34-4.40 (1H, м.)	76.7
17	2.41-2.54 (1H, перекр.)	49.1	3''	4.19-4.23 (1H, м.)	75.1
18	0.74 (3H, с.)	13.3	4''	4.01-4.08 (1H, перекр.)	71.8
19	0.92 (3H, с.)	14.6	5''	3.61-3.70 (1H, перекр.)	70.7
20	-	70.2	6''	-	175.0

Помимо указанных в таблице на ПМР спектре фракции № 2 присутствовали сигналы, предположительно, соответствующие протонам карбонильной и

карбоксильной групп с δ_{H} 9.1 и 9.6 м.д. соответственно. Основные COSY и HMBC корреляции показаны на рисунке 82.

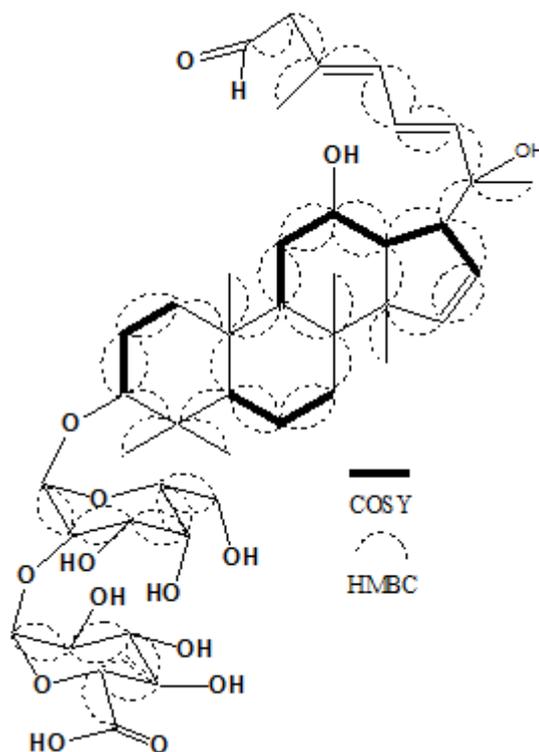


Рис. 82. ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^{13}C HMBC корреляции, полученные из ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) спектров фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

Из полученных методом ЯМР спектральных данных и масс-спектров обнаруженных в женьшеневом улуне сапонинов можно сделать вывод о структуре их сапогенина $\text{X} = \text{X1}$ (рис. 71). Информации по этим компонентам отсутствует в доступной литературе, и физиологический эффект таких соединений на организм человека на сегодняшний день не изучен.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. *Dharmananda S.* The nature of ginseng: traditional use, modern research and the question of dosage. // *HerbalGram*. 2002. V. 54. P. 34–51.
2. ESCOP Monographs. European Scientific Cooperative on Phytoterapy (second ed.) / D.: Exeter. 2003. P. 211.
3. *Kiefer D., Pantuso T.* *Panax ginseng*. // *Am. Family Phys.* 2003. V. 68. № 8. P. 1539-1542.
4. *Sticher O.* Getting to the root of ginseng. // *Chemtech*. 1998. V. 28. № 4. P. 26–32.
5. *Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker H.* The biological action of saponins in animal systems: a review. // *Brit. J. Nutr.* 2002. V. 88. № 6. P. 587–605.
6. *Kang J.H., Song K.H., Woo J.K., Park M.H., Rhee M.H., Choi C., Oh S.H.* Ginsenoside Rp1 from *Panax ginseng* exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the IGF-1R/Akt pathway in breast cancer cells. // *Plant Foods Hum. Nutr.* 2011. V. 66. № 3. P. 298-305.
7. *Nag S.A., Qin J.J., Wang W., Wang M.H., Wang H., Zhang R.* Ginsenosides as Anticancer Agents: *In vitro* and *in vivo* Activities, Structure–Activity Relationships, and Molecular Mechanisms of Action. // *Front Pharmacol.* 2012. V. 3. P. 25–33.
8. *Yang W.Z., Ye M., Qiao X., Liu C.F., Miao W.J., Bo T., Tao H.Y., Guo D.A.* A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 739. P. 56–66.
9. *Kitagawa I., Taniyama T., Yoshikawa M., Ikennishi Y., Nakagawa Y.* Chemical Studies on Crude Drug Processing. IV. Chemical Structures of Malonyl-ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, and Rd Isolated From The Root of *Panax ginseng* C. A. Meyer. // *Chem. Pharm. Bull.* 1989. V. 37. № 11. P. 2961-2970.
10. *Fuzzati N.* Analysis methods of ginsenosides. // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 812. № 1-2. P. 119–133.
11. *Zhang J., Zhou F., Niu F., Lu M., Wu X., Sun J., Wang G.* Stereoselective Regulations of P-Glycoprotein by Ginsenoside Rh2 Epimers and the Potential

- Mechanisms From the View of Pharmacokinetics. // PLoS One. 2012. V. 7. № 4. e35768.
12. *Leung K.W., Sze-Tsai A., Wong R.* Pharmacology of ginsenosides: a literature review. // *Chin. Med.* 2010. V. 5. P. 20–26.
 13. *Xiao G.* Modern Chinese Materia Medica / V. 1. Beijing: Chemical Industry Press. 2002. P. 877.
 14. *Jia W., Gao W.Y.* Therapeutic transdermal agents for pain containing Chinese medicinal herbs. // *J. Plant Biotechnol.* 2003. V. 5. P. 7–11.
 15. *Chan T.W., But P.Ph., Cheng S.W., Kwok I.M., Law F.W., Xu H.X.* Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* and ginseng products by the use of HPLC/MS. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 6. P. 1281–1287.
 16. *Li W.K., Gu C.G., Zhang H.J., Awang D.V.C., Fitzloff J.F., Fong H.H.S., van Breemen R.B.* Use of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to distinguish *Panax ginseng* C. A. Meyer (Asian ginseng) and *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng). // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 21. P. 5417–5422.
 17. *Hon C.C., Chow Y.C., Zeng F.Y., Leung F.C.C.* Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. // *Acta Pharm. Sin.* 2003. V. 24. № 9. P. 841–846.
 18. *Cutler S.J., Cutler H.G.* Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. / NY.: CRC Press. 2000. P. 59.
 19. *Hall T., Lu Z.Z., Yat P.N., Fitzloff J.F., Arnason J.T., Awang D.V.C., Fong H.H.S., Blumenthal M.* Evaluation of consistency of standardized Asian ginseng products in the ginseng evaluation program. // *HerbalGram.* 2001. V. 52. P. 31–45.
 20. *Chang T.K.H., Chen J., Benetton S.A.* *In vitro* effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. // *Drug Metab. Dispos.* 2002. V. 30. № 4. P. 378–384.
 21. *Wu J., Zhong J.J.* Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. // *J. Biotechnol.* 1999. V. 68. № 2-3. P. 89–99.
 22. *Anderson M.L., Burney D.P.* Validation of Sample Preparation Procedures for Botanical Analysis. // *J. AOAC Int.* 1998. V. 81. № 5. P. 1005–1010.

23. *Park M.K., Park J.H., Han S.B., Shin Y.G., Park I.H.* High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 736. № 1-2. P. 77–81.
24. *Kim W.K., Kim J.M., Han S.B., Lee S.K., Kim N.D., Park M.K., Kim C.K., Park J.H.* Steaming of ginseng at High Temperature Enhances Biological Activity. // *J. Nat. Prod.* 2000. V. 63. № 12. P. 1702–1704.
25. *Kwon S.W., Han S.B., Park I.H., Kim J.M., Park M.K., Park J.H.* Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 921. № 2. P. 335–339.
26. *Harkey M.R., Henderson G.L., Gershwin M.E., Stern J.S., Hackman R.M.* Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. V. 73. № 6. P. 1101–1106.
27. *Court W.A., Hendel J.G., Elmi J.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of ginsenosides of *Panax quinquefolium*. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 755. № 1. P. 11–17.
28. *Fuzzati N., Gabetta B., Jayakar K., Pace R., Ramaschi G., Villa F.* Determination of Ginsenosides in *Panax ginseng* Roots by Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection. // *J. AOAC Int.* 2000. V. 83. № 4. P. 820–829.
29. *Li W., Fitzloff J.F.* HPLC Analysis of Ginsenosides in the Roots of Asian ginseng (*Panax ginseng*) and North American ginseng (*Panax quinquefolius*) with In-line Photo Diode Array and Evaporative Light Scattering Detection. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2002. V. 25. № 1. P. 29–41.
30. *Li W., Fitzloff J.F.* HPLC Determination of Ginsenoside Content in Dietary Supplements using Ultraviolet Detection. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2002. V. 25. № 16. P. 2485–2500.
31. *Suh H.J., Shin K.S., Oh S.H., Yoon B.K.* Processing of extraction from ginseng using high hydrostatic pressure extraction. / Korea Pat. № 10–0970455. 2009.
32. *Liu S., Zhong J.J.* Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. // *Process Biochem.* 1998. V. 33. № 1. P. 69–74.
33. *Corbit R.M., Ferreira J.F.S., Ebbs S.D., Murphy L.L.* Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for high-

- performance liquid chromatography–ultraviolet analysis. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. № 26. P. 9867–9873.
34. *Wu J., Lin L., Chau F.T.* Ultrasound-assisted extraction of ginseng roots and cultured ginseng cells. // *Ultrasonics Sonochem.* 2001. V. 8. № 4. P. 347–352.
 35. *Popovich D.G., Kitts D.D.* Generation of ginsenosides Rg3 and Rh2 from North American ginseng. // *Phytochemistry.* 2004. V. 65. № 3. P. 337–344.
 36. *Shu Y.Y., Ko M.Y., Chang Y.S.* Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. // *Microchem. J.* 2002. V. 74. №2. P. 131–139.
 37. *Kwon J.H., Belanger J.M.R., Pare J.R.J., Yaylayan V.A.* Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins. // *Food Res. Int.* 2002. V. 36. № 5. P. 491–498.
 38. *Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Karim A.A., Abbas K.A., Norulaini N.A.N.* Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. // *J. Food Eng.* 2009. V. 95. № 2. P. 240–253.
 39. *Wang H.C., Chen C.R., Chang C.M.J.* Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. // *Food Chem.* 2001. V. 72. № 4. P. 505–509.
 40. *Wood J.A., Bernards M.A., Wan W.K., Charpentier P.A.* Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. // *J. Supercrit. Fluid.* 2006. V. 39. № 1. P. 40–47.
 41. *Choi M.P.K., Chan K.K.C., Leung H.W., Huie C.W.* Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 983. N. 1-2. P. 153–162.
 42. *Fang Q., Yeung H.W., Leung H.W., Huie C.W.* Micelle-mediated extraction and preconcentration of ginsenosides from Chinese herbal medicine. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 904. № 1. P. 47–55.
 43. *Lin H., Zhang Y., Han M., Yang L.* Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of eight ginsenosides from ginseng root. // *Ultrasonics Sonochem.* 2013. 20. № 2. P. 680–684.
 44. *Shehzad O., Kim H.P., Kim Y.S.* State-of-the-art separation of ginsenosides from Korean white and red ginseng by countercurrent chromatography. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 13. P. 4523–4530.

45. *Li P., Qi L.W., Liu E.H., Zhou J.L., Wen X.D.* Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models. // *Trends Anal. Chem.* 2008. V. 27. № 1. P. 66–77.
46. *Liu Y., Zhou J.L., Liu P., Sun S., Li P.* Chemical markers' fishing and knockout for holistic activity and interaction evaluation of the components in herbal medicines. // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 32. P. 5239–5245.
47. *Hui D.Y.* Utility and Importance of Gene Knockout Animals For Nutritional and Metabolic Research. // *J. Nutr.* 1998. V. 128. № 11. P. 2052–2057.
48. *Xie J.T., Aung H.H., Wu J.A., Attele A.S., Yuan C.S.* Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in *ob/ob* mice. // *Am. J. Chin. Med.* 2002. V. 30. № 2-3. P. 187–194.
49. *Wang A.B., Wang C.Z., Wu J.A., Osinski J., Yuan C.S.* Determination of major ginsenosides in *Panax quinquefolius* (American ginseng) using high-performance liquid chromatography. // *Phytochem. Anal.* 2005. V. 16. № 4. P. 272–277.
50. *Zhang X.H., Liu H.L., Chen J.M.* Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Aflatoxins in Medicinal Herbs and Plant Extracts. // *J. Chromatogr. Sci.* 2005. V. 43. № 1. P. 47–51.
51. *Ip S.P., Che C.T.* Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup: Improvement of recovery. // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1135. № 2. P. 241–244.
52. *Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y.* Western Blotting for ginseng Saponins, Ginsenosides Using Anti-ginsenoside Rb1 Monoclonal Antibody. // *Biol. Pharm. Bull.* 1999. V. 22. № 2. P. 219–220.
53. *Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y.* Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. Monoclonal antibody for a ginseng saponin. // *Cytotechnology.* 2000. V. 34. № 3. P. 197–204.
54. *Morinaga O., Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y.* Chromatographic resolution of glucosidic compounds, ginsenosides on polyethersulphone membrane, and its application to the quantitative immunoassay for ginseng saponins. // *Glycobiology.* 2005. V. 15. № 10. P. 1061–1066.
55. *Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y.* Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using

- monoclonal antibody against ginsenoside Re. // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 830. № 1. P. 100–104.
56. *Shan S.J., Tanaka H., Shoyama Y.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Glycyrrhizin Using Anti-Glycyrrhizin Monoclonal Antibody and an Eastern Blotting Technique for Glucuronides of Glycyrrhetic Acid. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 24. P. 5784–5790.
57. *Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y.* Applications of ELISA, Western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of *Panax* species and traditional Chinese herbal medicines. // *Analyst.* 2000. V. 125. № 8. P. 1425–1429.
58. *Tanaka H., Fukuda N., Shoyama Y.* Identification and differentiation of *Panax* species using ELISA, RAPD and eastern blotting. // *Phytochem. Anal.* 2006. V. 17. № 1. P. 46–55.
59. *Tanaka H., Fukuda N., Shoyama Y.* Eastern Blotting and Immunoaffinity Concentration Using Monoclonal Antibody for ginseng Saponins in the Field of Traditional Chinese Medicines. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 10. P. 3783–3787.
60. *Tanaka H., Fukuda N., Yahara S., Isoda S., Yuan C.S., Shoyama Y.* Isolation of ginsenoside Rb1 from *Kalopanax pictus* by eastern blotting using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody. // *Phytother. Res.* 2005. V. 19. № 3. P. 255–258.
61. *Putalun W., Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y.* A One-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb1 and Rg1. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. № 5. P. 1338–1341.
62. *Ludwiczuk A., Nyireddy S., Wolski T.* Separation of the ginsenosides fraction obtained from the roots of *Panax quinquefolium* L. cultivated in Poland. // *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC.* 2000. V. 18. № 102. P. 104–107.
63. *Reich E., Schibli A., DeBatt A.* Supplemental Information for: Validation of High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods for the Identification of Botanicals in a cGMP Environment. // *J. AOAC Int.* 2008. V. 91. № 1. P. 13–20.
64. *Xie P., Chen S., Liang Y.Z., Wang X., Tian R., Upton R.* Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1112. № 1-2. P. 171–180.

65. *Ohno T., Mikami E., Oka H.* Analysis of crude drugs using reversed-phase TLC/scanning densitometry. (II) Identification of ginseng, red ginseng, gentian, Japanese gentian, pueraria root, gardenia fruit, schisandra fruit and ginger. // *J. Nat. Med.* 2006. V. 60. № 2. P. 141–145.
66. *Vanhaelen-Fastre R.J., Faes M.L., Vanhaelen M.H.* High-performance thin-layer chromatographic determination of six major ginsenosides in *Panax ginseng*. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 868. № 2. P. 269–276.
67. *Kevers C., Jacques P., Gaspar T., Thonart P., Dommes J.* Comparative Titration of Ginsenosides by Different Techniques in Commercial ginseng Products and Callus Cultures. // *J. Chromatogr. Sci.* 2004. V. 42. № 10. P. 554–558.
68. *Christensen L.P.* Chapter 1 Ginsenosides: Chemistry, Biosynthesis, Analysis, and Potential Health Effects. // *Adv. Food Nutr. Res.* 2008. V. 55. P. 1–99.
69. *Di X., Shellie R.A., Marriott P.J., Huie C.W.* Application of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) for the chemical profiling of volatile oils in complex herbal mixtures. // *J. Sep. Sci.* 2004. V. 27. № 5-6. P. 451–458.
70. *El-Aty A.M.A., Kim I.K., Kim M.R., Lee C., Shim J.H.* Determination of volatile organic compounds generated from fresh, white and red *Panax ginseng* (C. A. Meyer) using a direct sample injection technique. // *Biomed. Chromatogr.* 2008. V. 22. № 5. P. 556–562.
71. *Cao J., Yi L., Li P., Chang Y.X.* On-line concentration of neutral analytes by complexation and acetonitrile sweeping in nonionic microemulsion electrokinetic chromatography with direct ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 29. P. 5608–5613.
72. *Wong J.W., Zhang K., Tech K., Hayward D.G., Krynetsky A.J., Cassias I., Schenck F.J., Banerjee K., Dasgupta S., Brown D.* Multiresidue Pesticide Analysis of ginseng Powders Using Acetonitrile- or Acetone-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup, and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Selective Ion Monitoring (GC-MS/SIM) or –Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. № 10. P. 5884–5896.
73. *Hayward D.G., Wong J.W.* Organohalogen and Organophosphorous Pesticide Method for ginseng Root — A Comparison of Gas Chromatography-Single

- Quadrupole Mass Spectrometry with High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 14. P. 5716–5723.
74. *Liu J.H., Lee C.S., Leung K.M., Yan Z.K., Shen B.H., Zhao Z.Z., Jiang Z.H.* Quantification of Two Polyacetylenes in Radix ginseng and Roots of Related *Panax* Species Using a Gas Chromatography–Mass Spectrometric Method. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 22. P. 8830–8835.
75. *Shellie R.A., Marriott P.J., Huie C.W.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and GC×GC-quadrupole MS analysis of Asian and American ginseng. // *J. Sep. Sci.* 2003. V. 26. № 12-13. P. 1185–1192.
76. *Sun X.Y., Zheng Y.P., Lin D.H., Zhang H., Zhao F., Yuan C.S.* Potential Anti-Cancer Activities of Furanodiene, A Sesquiterpene from *Curcuma wenyujin*. // *Am. J. Chin. Med.* 2009. V. 37. № 3. P. 589–596.
77. *Wang X.Y., Su M.M., Qiu Y.P., Ni Y., Zhao T., Zhou M.M., Zhao A.H., Yang S.L., Zhao L.P., Jia W.* Metabolic Regulatory Network Alterations in Response to Acute Cold Stress and Ginsenoside Intervention. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 9. P. 3449–3455.
78. *Pappas T.J., Gayton-Ely M., Holland L.A.* Recent advances in micellar electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis* 2005. V. 26. № 4-5. P. 719–734.
79. *Huie C.W.*, Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography. // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. № 1. P. 60–75.
80. *Qin J.H., Leung F.C., Fung Y.S., Zhu D.R., Lin B.C.* Rapid authentication of ginseng species using microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. № 4. P. 812–819.
81. *Wang S.F., Ye S., Cheng Y.Y.* Separation and on-line concentration of saponins from *Panax notoginseng* by micellar electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1109. № 2. P. 279–284.
82. *Glockl I., Veit M., Blaschke G.* Determination of Ginsenosides from *Panax ginseng* using Micellar Electrokinetic Chromatography. // *Planta Med.* 2002. V. 68. № 2. P. 158–161.
83. *Cao J., Li B., Chang Y. X., Li P.* Direct on-line analysis of neutral analytes by dual sweeping *via* complexation and organic solvent field enhancement in nonionic MEKC. // *Electrophoresis*. 2009. V. 30. № 8. P. 1372–1379.

84. *Cao J., Qi L.W., Chen J., Li P.* Pressure and electrokinetic injections for on-line sample stacking neutral analytes in microemulsion electrokinetic chromatography with salt-containing matrixes. // *Electrophoresis*. 2008. V. 29. № 21. P. 4422–4430.
85. *Wang C.Z., Aung H.H., Ni M., Wu J.A., Tong R.B., Wicks S., He T.C., Yuan C.S.* Red American ginseng: Ginsenoside Constituents and Antiproliferative Activities of Heat-Processed *Panax quinquefolius* Roots. // *Planta Med.* 2007. V. 73. № 7. P. 669–674.
86. *Wang C.Z., Wu J.A., McEntee E., Yuan C.S.* Saponins Composition in American ginseng Leaf and Berry Assayed by High-Performance Liquid Chromatography. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 6. P. 2261–2266.
87. *Gilpin R.K., Gilpin C.S.* Pharmaceuticals and Related Drugs. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 12. P. 4679–4694.
88. *Wang C.Z., Zhang B., Song W.X., Wang A.B., Ni M., Luo X.J., Aung H.H., Xie J.T., Tong R., He T.C., Yuan C.S.* Steamed American ginseng Berry: Ginsenoside Analyses and Anticancer Activities. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 26. P. 9936–9942.
89. *Li W.K., Fitzloff J.F.* HPLC determination of flavonoids and terpene lactones in commercial Ginkgo biloba products. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002. V. 25. № 1. P. 17–27.
90. *Wan J.B., Li S.P., Chen J.M., Wang Y.T.* Chemical characteristics of three medicinal plants of the *Panax* genus determined by HPLC-ELSD. // *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. № 6. P. 825–832.
91. *Qi L.W., Yu Q.T., Li P., Li S.L., Wang Y.X., Sheng L.H., Yi L.* Quality evaluation of Radix Astragali through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1134. № 1-2. P. 162–169.
92. *Cao J., Wei Y.J., Qi L.W., Li P., Qian Z.M., Luo H.W., Chen J., Zhao J.* Determination of fifteen bioactive components in Radix et Rhizoma *Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection // *Biomed. Chromatogr.* 2008. V. 22. № 2. P. 164–172.

93. *Qu C.L., Bai Y.P., Jin X.Q., Wang Y.T., Zhang K., You J.Y., Zhang H.Q.* Study on ginsenosides in different parts and ages of *Panax quinquefolius* L. // *Food Chem.* 2009. V. 115. № 1. P. 340–346.
94. *Kim S.N., Ha Y.W., Shin H., Son S.H., Wu S.J., Kim Y.S.* Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 45. P. 1. P. 164–170.
95. *Sun B.S., Gu L.J., Fang Z.M., Wang C.Y., Wang Z., Lee M.R., Li Z., Li J.J., Sung C.K.* Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC–ELSD. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009. V. 50. № 1. P. 15–22.
96. *Shangguan D.H., Han H., Zhao R., Zhao Y.X., Xiong S.X., Liu G.Q.* New method for high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection of ginsenosides. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 910. № 2. P. 367–372.
97. *Lee S.I., Kwon H.J., Lee Y.M., Lee J.H., Hong S.P.* Simultaneous analysis method for polar and non-polar ginsenosides in red ginseng by reversed-phase HPLC-PAD. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 60. P. 80–85.
98. *Vehovec T., Obreza A.* Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 10. P. 1549–1556.
99. *Bai C.C., Han S.Y., Chai X.Y., Jiang Y., Li P., Tu P.F.* Sensitive Determination of Saponins in *Radix et Rhizoma Notoginseng* by Charged Aerosol Detector Coupled with HPLC. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2009. V. 32. № 2. P. 242–260.
100. *Wang L., He W.S., Yan H.X., Jiang Y., Bi K.S., Tu P.F.* Performance Evaluation of Charged Aerosol and Evaporative Light Scattering Detection for the Determination of Ginsenosides by LC. // *Chromatographia.* 2009. V. 70. № 3-4. P. 603–608.
101. *Ji H.Y., Lee H.W., Kim H.K., Kim H.H., Chang S.G., Sohn D.H., Kim J., Lee H.S.* Simultaneous determination of ginsenoside Rb1 and Rg1 in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. V. 35/ № 1. P. 207–212.
102. *Liu L., Huang J., Hu X., Li K., Sun C.* Simultaneous determination of ginsenoside (G-Re, G-Rg1, G-Rg2, G-F1, G-Rh1) and protopanaxatriol in human plasma and

- urine by LC–MS/MS and its application in a pharmacokinetics study of G-Re in volunteers. // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. № 22. P.2011–2017.
103. *Bae E.A., Han M.J., Kim E.J., Kim D.H.* Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. // *Arch. Pharm. Res.* 2004. V. 27 № 1. P. 61–67.
104. *Sun J., Wang G.J., Xie H.T., Li H., Pan G.Y., Tucker I.* Simultaneous rapid quantification of ginsenoside Rg(1) and its secondary glycoside Rh-1 and aglycone protopanaxatriol in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry after solid-phase extraction. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 38. № 1. P. 126–132.
105. *Patel D.N., Lin H.S., Koh H.L.* Quantification of ginsenosides Rh4 and Rk3 in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pre-clinical pharmacokinetic study. // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. № 11. P. 1510–1517.
106. *Kim U., Park M.H., Kim D.H., Yoo H.H.* Metabolite profiling of ginsenoside Re in rat urine and faeces after oral administration. // *Food Chem.* 2013. V. 136. № 3-4. P. 1364–1369.
107. *Perreault H., Costello C.E.* Liquid secondary ionization, tandem and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric characterization of glycosphingolipid derivatives. // *Org. Mass Spectrom.* 1994. V. 29. № 12. P. 720–735.
108. *Liu S.Y., Cui M., Liu Z.Q., Song F.R., Mo W.J.* Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. V. 15. № 2. P. 133–141.
109. *Song F.R., Liu Z.Q., Liu S.Y., Cai Z.W.* Differentiation and identification. of ginsenoside isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 531. № 1. P. 69–77.
110. *Wen X.D., Yang J., Ma R.H., Gao W., Qi L.W., Li P., Bauer B.A., Du G.J., Zhang Z., Somogyi J., Wang C.Z., Yuan C.S.* Analysis of *Panax notoginseng* metabolites in rat bile by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry with microdialysis sampling // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 895. P. 162–168.

111. *Jung D.W., Lee J.M., Sung C.K.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 20(*S*)-protopanaxatriol. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 462. № 2. P. 157–163.
112. *Ciesla L., Waksmundzka-Hajnos M.* Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 7. P. 1035–1052.
113. *Qiu Y.Q., Lu X., Pang T., Ma C. F., Li X., Xu G.W.* Determination of radix ginseng volatile oils at different ages by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. № 19. P. 3451–3457.
114. *European Pharmacopoeia / V. 2. (5th ed.).* Strasbourg: The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. 2004. P. 2739-2740.
115. *Pan J.Y., Cheng Y.Y., Wang Y., Xiao X.Y., Lin R.C.* A method of simultaneous determination of 9 ginsenosides for identifying the quality of ginseng. // *Chinese J. Anal. Chem.* 2005. V. 33. № 11. P. 1565–1568.
116. *Christensen L.P., Jensen M., Kidmose U.* Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium L.*) by high-performance liquid chromatography. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 24. P. 8995–9003.
117. *Fuzzati N., Gabetta B., Jayakar K., Pace R., Peterlongo F.* Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots. // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 854. № 1-2. P. 69–79.
118. *Ng K.M., Che C.M., Wo S.K., Tam P.K.H., Lau A.S.Y.* Analytical application of acetate anion in negative electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of triterpenoid saponins-ginsenosides. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. V. 20. № 10. P. 1545–1550.
119. *Sloley B.D., Lin Y.C.J., Ridgway D., Semple H.A., Tam Y.K., Coutts R.T., Lobenberg R., Tam-Zaman N.* A method for the analysis of ginsenosides, malonyl ginsenosides, and hydrolyzed ginsenosides using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and positive mode electrospray ionization mass spectrometric detection. // *J. AOAC Int.* 2006. V. 89. № 1. P. 16–21.

120. Zhang H.J., Wu Y.J., Cheng Y.Y. Analysis of 'Shenmai' injection by HPLC/MS/MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. V. 31. № 1. P. 175–183.
121. Liu Y., Yang J.S., Cai Z.W. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs *Panax ginseng* and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 41. № 5. P. 1642–1647.
122. Ma X.Q., Liang X.M., Xu Q., Zhang X.Z., Xiao H.B. Identification of ginsenosides in roots of *Panax ginseng* by HPLC-APCI/MS. // Phytochem. Anal. 2005. V. 16. № 3. P. 181–187.
123. Yu Z.G., Gao X.X., Zhao Y.L., Chen X.H., Bi K.S. Simultaneous determination of components in preparation Naodesheng injection by high performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-MS/APCI). // Chem. Pharm. Bull. 2006. V. 54. № 4. P. 588–590.
124. Beckwith-Hall B.M., Holmes E., Lindon J.C., Gournarides J., Vickers A., Shapiro M., Nicholson J.K. NMR-Based Metabonomic Studies on the Biochemical Effects of Commonly Used Drug Carrier Vehicles in the Rat. // Chem. Res. Toxicol. 2002. V. 15. № 9. P. 1136–1141.
125. Van der Kooy F., Maltese F., Choi Y.H., Kim H.K., Verpoorte R. Quality Control of Herbal Material and Phytopharmaceuticals with MS and NMR Based Metabolic Fingerprinting. // Planta Med. 2009. V. 75. № 7. P. 763–775.
126. Rasmussen B., Cloarec O., Tang H.R., Staerk D., Jaroszewski J.W. Multivariate Analysis of Integrated and Full-Resolution ¹H-NMR Spectral Data from Complex Pharmaceutical Preparations: St. John's Wort. // Planta Med. 2006. V. 72. № 6. P. 556–563.
127. Kang J., Lee S., Kang S., Kwon H.N., Park J.H., Kwon S.W., Park S. NMR-based metabolomics approach for the differentiation of ginseng (*Panax ginseng*) roots from different origins. // Arch. Pharmacol Res. 2008. V. 31. № 3. P. 330–336.
128. Lin W.N., Lu H.Y., Lee M.S., Yang S.Y., Chen H.J., Chang Y.S., Chang W.T. Evaluation of the Cultivation Age of Dried ginseng Radix and Its Commercial Products by Using ¹H-NMR Fingerprint Analysis. // Am. J. Chin. Med. 2010. V. 38. № 1. P. 205–218.
129. Yang S.Y., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Angelova N., Choi Y.H., Verpoorte R. Application of Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance

- Spectroscopy to Quality Control of ginseng Commercial Products. // *Planta Med.* 2006. V. 72. № 4. P. 364–369.
130. *Van der Greef J., van der Heijden R., Verheij E.R.* The role of mass spectrometry in systems biology: data processing and identification strategies in metabolomics. / *Adv. Mass Spectrom.* V. 16, Ashcroft AE, Brenton G, Monaghan JJ (eds). Amsterdam: Elsevier Science. 2004. P. 165.
 131. *Angelova N., Kong H.W., van der Heijden R., Yang S.Y., Choi Y.H., Kim H.K., Wang M., Hankemeier T., van der Greef J., Xu G., Verpoorte R.* Recent Methodology in the Phytochemical Analysis of ginseng. // *Phytochem. Anal.* 2008. V. 19. № 1. P. 2–16.
 132. *Dictionary of Natural Products.* / Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC Press. 2003. P. 874.
 133. *Park H., Cho B.G., Lee M.K.* Nitrogen compounds of Korea ginseng and their physiological significance. // *Korean J. ginseng. Sci.* 1990. V. 14. P. 317–331.
 134. *Hwang H.J., Kim E.H., Cho Y.D.* Isolation and properties of arginase from a shade plant, ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots. // *Phytochemistry.* 2001. V. 58. № 7. P. 1015–1024.
 135. *Ren G.X., Chen F.* Simultaneous quantification of ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) root powder by visible/near-infrared reflectance spectroscopy. // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V. 47. № 7. P. 2771–2775.
 136. *Lu Y.J., Qu Y.L., Cao Z.Q., Song M.* Near infrared determination of the total sugar in Chinese ginsengs. // *Spectrosc. Spectrom. Anal.* 2006. V. 26. № 8. P. 1457–1459.
 137. *Baranska M., Schulz H., Christensen L.P.* Structural changes of polyacetylenes in American ginseng root can be observed *in situ* using Raman spectroscopy. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 10. P. 3629–3635.
 138. *Campanella L., Bonanni A., Tomassetti M.* Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. V. 32. № 4-5. P. 725–736.
 139. *Yap K.Y., Chan S.Y., Chan Y.W., Lim C.S.* Overview on the analytical tools for quality control of natural product-based supplements: a case study of ginseng. // *Assay. Drug Dev. Technol.* 2005. V. 3. № 6. P. 683–699.

140. *Van der Greef J., Davidov E., Verheij E.R., Vogels J., van der Heijden R., Adourian A.S., Oresic M., Marple E.W., Naylor S.* The role of metabolomics in systems biology. / Chapt. 10 in book *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis* Harrigan GG, Goodacre R (eds). Dordrecht: Kluwer Academic. 2003. P. 335.
141. *Hall R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L., Bino R.* Plant metabolomics as the missing link in functional genomics strategies. // *Plant Cell*. 2002. V. 14. № 7. P. 1437–1440.
142. *Sumner L.W., Mendes P., Dixon R.A.* Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. // *Phytochemistry*. 2003. V. 62. № 6. P. 817–836.
143. *Qi L.W., Wang C.Z., Yuan C.S.* Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. // *Nat. Prod. Rep.* 2011. V. 28. № 3. P. 467–495.
144. *Kong H., Wang M., Venema K., Maathuis A., van der Heijden R., van der Greef J., Xu G., Hankemeier T.* Bioconversion of red ginseng saponins in the gastro-intestinal tract *in vitro* model studied by high-performance liquid chromatography–high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. № 11. P. 2195–2203.
145. *Ruan J.Q., Leong W.I., Yan R., Wang Y.T.* Characterization of Metabolism and *in Vitro* Permeability Study of Notoginsenoside R1 from Radix *Notoginseng*. // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. № 9. P. 5770–5776.
146. *Chen G.T., Yang M., Song Y., Lu Z.Q., Zhang J.Q., Huang H.L., Guan S.H., Wu L.J., Guo D.A.* Comparative analysis on microbial and rat metabolism of ginsenoside Rb₁ by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. // *Biomed. Chromatogr.* 2008. V. 22. № 7. P. 779–785.
147. *Liu H.F., Yang J.L., Du F.F., Gao X.M., Ma X.T., Huang Y.H., Xu F., Niu W., Wang F.Q., Mao Y., Sun Y., Lu T., Liu C.X., Zhang B.L., Li C.* Absorption and Disposition of Ginsenosides after Oral Administration of *Panax notoginseng* Extract to Rats. // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 12. P. 2290–2298.
148. *Hasegawa H.* Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: metabolic activation of ginsenoside: deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid. // *J. Pharmacol. Sci.* 2004. V. 95. №. 2. P. 153–157.

149. *Tawab M.A., Bahr U., Karas M., Wurglics M., Schubert-Zsilavec M.* Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. // *Drug Metab. Dispos.* 2003. V. 31. № 8. P. 1065–1071.
150. *Lai L., Hao H.P., Liu Y.T., Zheng C.N., Wang Q., Wang G.J., Chen X.J.* Characterization of Pharmacokinetic Profiles and Metabolic Pathways of 20(S)-Ginsenoside Rh1 *in vivo* and *in vitro*. // *Planta Med.* 2009. V. 75. № 8. P. 797–802.
151. *Qian T.X., Cai Z.W., Wong R.N.S., Mak N.K., Jiang Z.H.* *In vivo* rat metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg₃. // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 816. № 1-2. P. 223–232.
152. *Yang L., Xu S.J., Liu C.J., Su Z.J.* *In vivo* metabolism study of ginsenoside Re in rat using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. № 5. P. 1441–1451.
153. *Oian T.X., Cai Z.W., Wong R.N.S., Jiang Z.H.* Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of rat samples for *in vivo* metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rh2. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. № 23. P. 3549–3554.
154. *Hasegawa H., Suzuki R., Nagaoka T., Tezuka Y., Kadota S., Saiki I.* Prevention of Growth and Metastasis of Murine Melanoma through Enhanced Natural-Killer Cytotoxicity by Fatty Acid-Conjugate of Protopanaxatriol. // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. V. 25. № 7. P. 861–866.
155. *Xie H.T., Wang G.J., Sun J.G., Tucker I., Zhao X.C., Xie Y.Y., Li H., Jiang X.L., Wang R., Xu M.J. Wang W.* High performance liquid chromatographic–mass spectrometric determination of ginsenoside Rg₃ and its metabolites in rat plasma using solid-phase extraction for pharmacokinetic studies. // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 818. № 2. P. 167–173.
156. *Cai Z.W., Qian T.X., Wong R.N.S., Jiang Z.H.* Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg₃. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 492. № 1-2. P. 283–293.
157. *Zhao Q.A., Zheng X., Jiang J., Zhou H., Hu P.* Determination of ginsenoside Rg₃ in human plasma and urine by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 24. P. 2266–2273.

158. *Gui F.J., Yang X.W., Li L.Y., Tian J.M.* Simultaneous enantiomer determination of 20 (*R*)- and 20 (*S*)-ginsenoside-Rg₂ in rat plasma after intravenous administration using HPLC method. // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 850. № 1-2. P. 1–6.
159. *Yang L., Deng Y.H., Xu S.J., Zeng X.* *In vivo* pharmacokinetic and metabolism studies of ginsenoside Rd. // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 854. № 1-2. P. 77–84.
160. *Chen M.J., Su M.M., Zhao L.P., Jiang J., Liu P., Cheng J.Y., Lai Y.J., Liu Y.M., Jia W.* Metabonomic Study of Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity in Rats. // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 995–1002.
161. *Chen M.J., Zhao L.P., Jia W.* Metabonomic Study on the Biochemical Profiles of A Hydrocortisone-Induced Animal Model. // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 6. P. 2391–2396.
162. *Xie G.X., Zheng X.J., Qi X., Cao Y., Chi Y., Su M.M., Ni Y., Qiu Y.P., Liu Y.M., Li H.K., Zhao A.H., Jia W.* Metabonomic Evaluation of Melamine-Induced Acute Renal Toxicity in Rats. // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. № 1. P. 125–133.
163. *Wang Y., Wang J., Yao M., Zhao X., Fritsche J., Schmitt-Kopplin P., Cai Z., Wan D., Lu X., Yang S., Gu J., Haring H.U., Schleicher E.D., Lehmann R., Xu G.* Metabonomics Study on the Effects of the Ginsenoside Rg₃ in a β -Cyclodextrin-Based Formulation on Tumor-Bearing Rats by a Fully Automatic Hydrophilic Interaction/Reversed-Phase Column-Switching HPLC–ESI-MS Approach. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. № 12. P. 4680–4688.
164. *Tian R.J., Xu S.Y., Lei X.Y., Jin W.H., Ye M.L., Zou H.F.* Characterization of small-molecule–biomacromolecule interactions: From simple to complex. // *Trends Anal. Chem.* 2005. V. 24. № 9. P. 810–825.
165. *Zhou J.L., An J.J., Li P., Li H.J., Jiang Y., Cheng J.F.* Two-dimensional turbulent flow chromatography coupled on-line to liquid chromatography–mass spectrometry for solution-based ligand screening against multiple proteins. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 12. P. 2394–2403.
166. *Duan Y., Zheng J., Law V., Nicholson R.* Natural products from ginseng inhibit [³H]batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding to Na⁺ channels in mammalian brain. // *Eur. J. Pharmacol.* 2006. V. 530. № 1-2. P. 9–14.
167. *Su X.Y., Kong L., Lei X.Y., Hu L.H., Ye M.L., Zou H.F.* Biological fingerprinting analysis of traditional Chinese medicines with targeting ADME/Tox property for

- screening of bioactive compounds by chromatographic and MS methods. // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2007. V. 7. P. 87–98.
168. *Huang X.D., Kong L.A., Li X., Chen X.G., Guo M., Zou H.F.* Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 812. № 1-2. P. 71–84.
169. *Wang J., Huang Z.G., Cao H., Wang Y.T., Hui P., Hoo C., Li S.P.* Screening of anti-platelet aggregation agents from *Panax notoginseng* using human platelet extraction and HPLC–DAD–ESI-MS/MS. // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. № 6-7. P. 1173–1180.
170. *Liu Y., Xie M.X., Kang J., Zheng D.* Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by Fourier transform infrared spectroscopy. // *Spectrochim. Acta Part A.* 2003. V. 59. № 12. P. 2747–2758.
171. *Dasgupta A., Reyes M. A.* Effect of Brazilian, Indian, Siberian, Asian, and North American ginseng on Serum Digoxin Measurement by Immunoassays and Binding of Digoxin-like Immunoreactive Components of ginseng With Fab Fragment of Antidigoxin Antibody (Digibind). // *Am. J. Clin. Pathol.* 2005. V. 124. № 2. P. 229–236.
172. *Lu G.H., Zhou Q., Sun S.Q., Leung K.S.Y., Zhang H., Zhao Z.Z.* Differentiation of Asian ginseng, American ginseng and Notoginseng by Fourier transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. // *J. Mol. Struct.* 2008. V. 883-884. P. 91–98.
173. *Wang C.Z., Ni M., Sun S., Li X.L., He H., Mehendale S.R., Yuan C.S.* Detection of Adulteration of Notoginseng Root Extract with Other Panax Species by Quantitative HPLC Coupled with PCA. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 6. P. 2363–2367.
174. *Xie P.S., Leung A.Y.* Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 11. P. 1933–1940.
175. *Xie G.X., Ni Y., Su M.M., Zhang Y.Y., Zhao A.H., Gao X.F., Liu Z., Xiao P.G., Jia W.* Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal *Panax* herbs. // *Metabolomics.* 2008. V. 4. № 3. P. 248–260.

176. Xie G.X., Plumb R., Su M.M., Xu Z.H., Zhao A.H., Qiu M.F., Long X.B., Liu Z., Jia W. Ultra-performance LC/TOF MS analysis of medicinal *Panax* herbs for metabolomic research. // J. Sep. Sci. 2008. V. 31. № 6-7. P. 1015–1026.
177. Lee E.J., Shaykhutdinov R., Weljie A.M., Vogel H.J., Facchini P.J., Park S.U., Kim Y.K., Yang T.J. Quality Assessment of ginseng by ¹H NMR Metabolite Fingerprinting and Profiling Analysis. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 16. P. 7513–7522.
178. Li L., Luo G.A., Liang Q.L., Hu P., Wang Y.M. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 52. P. 66–72.
179. Schlag E.M., McIntosh M.S. Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations. // Phytochemistry. 2006. V. 67. № 14. P. 1510–1519.
180. Health Canada - Monograph: Ginseng, Panax. <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhp/id-bdipsn/monoReq.do?id=146>.
181. Qian Z.M., Lu J., Gao Q.P., Li S.P. Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium ginseng and Radix ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 18. P. 3825–3830.
182. Lim W., Mudge K.W., Vermeulen F. Effects of Population, Age, and Cultivation Methods on Ginsenoside Content of Wild American ginseng (*Panax quinquefolium*). // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 22. P. 8498–8505.
183. Assinewe V.A., Baum B.R., Gagnon D., Arnason J.T. Phytochemistry of Wild Populations of *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng). // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 16. P. 4549–4553.
184. Wang Y., Pan J.Y., Xiao X.Y., Lin R.C., Cheng Y.Y. Simultaneous determination of ginsenosides in *Panax ginseng* with different growth ages using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. // Phytochem. Anal. 2006. V. 17. № 6. P. 424–430.
185. Zhou J.L., Li P., Li H.J., Jiang Y., Ren M.T., Liu Y. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry

- method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species. // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1177. № 1. P. 126–137.
186. Qi L.W., Chen C.Y., Li P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009. V. 23. № 19. P. 3227–3242.
187. Qi L.W., Wen X.D., Cao J., Li C.Y., Li P., Yi L., Wang Y.X., Cheng X.L., Ge X.X. Rapid and sensitive screening and characterization of phenolic acids, phthalides, saponins and isoflavonoids in Danggui Buxue Tang by rapid resolution liquid chromatography/diode-array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008. V. 22. № 16. P. 2493–2509.
188. Qi L.W., Cao J., Li P., Yu Q.T., Wen X.D., Wang Y.X., Li C.Y., Bao K.D., Ge X.X., Cheng X.L. Qualitative and quantitative analysis of Radix Astragali products by fast high-performance liquid chromatography-diode array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry through dynamic adjustment of fragmentor voltage. // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1203. № 1. P. 27–35.
189. Perez S., Barcelo D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. // Trends Anal. Chem. 2007. V. 26. № 6. P. 494–514.
190. Ma X., Xiao H.B., Liang X.M. Identification of Ginsenosides in *Panax quinquefolium* by LC-MS. // Chromatographia. 2006. V. 64. № 1-2. P. 31–36.
191. Qi L.W., Gu X.J., Li P., Liang Y., Hao H., Wang G. Structural characterization of pregnane glycosides from *Cynanchum auriculatum* by liquid chromatography on a hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometer. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009. V. 23. № 14. P. 2151–2160.
192. Liu Y., Li J., He J., Abliz Z., Qu J., Yu S., Ma S., Liu J., Du D. Identification of new trace triterpenoid saponins from the roots of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009. V. 23. № 5. P. 667–679.

193. *Kitagawa I., Taniyama T., Hayashi T., Yoshikawa M.* Malonil-ginsenosides Rb1, Rb2, Rc and Rd, four new malonylated dammaranetype triterpene oligoglycosides from ginseng radix. // *Chem. Pharm. Bull.* 1983. V. 31. № 8. P. 3353–3356.
194. *Yamaguchi H., Kasai R., Matsuura H., Tanaka O., Fuwa T.* High-performance liquid chromatographic analysis of acidic saponins of ginseng and related plants. // *Chem. Pharm. Bull.* 1988. V. 36. № 9. P. 3468–3473.
195. *Wang J.R., Yamasaki Y., Tanaka T., Kouno I., Jiang Z.H.* Dammarane-type Triterpene Saponins from the Flowers of *Panax notoginseng*. // *Molecules.* 2009. V. 14. № 6. P. 2087–2094.
196. *Qiu F., Ma Z.Z., Xu S.X., Yao X.S., Che C.T., Chen Y.J.* A Pair of 24-hydroperoxyl Epimeric Dammarane Saponins from Flower-buds of *Panax ginseng*. // *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2001. V. 3. P. 235–240.
197. *Kite G.C., Howes M.J.R., Leon C.J., Simmonds M.S.J.* Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. № 3. P. 238–244.
198. *Du X.W., Wills R.B.H., Stuart D.L.* Changes in neutral and malonyl ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) during drying, storage and ethanolic extraction. // *Food Chem.* 2004. V. 86. № 2. P. 155–159.
199. *Ren G.X., Chen F.* Degradation of Ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) Extracts during Microwave and Conventional Heating. // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V. 47. № 4. P. 1501–1505.
200. *Chang Y.H., Ng P.K.W.* Effects of Extrusion Process Variables on Extractable Ginsenosides in Wheat–ginseng Extrudates. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 6. P. 2356–2362.
201. *Chuang W.C., Wu H.K., Sheu S.J., Chiou S.H., Chang H.C., Chen Y.P.* A Comparative Study on Commercial Samples of ginseng Radix. // *Planta Med.* 1995. V. 61. № 5. P. 459–465.
202. *Ligor T., Ludwiczuk A., Wolski T., Buszewski B.* Isolation and determination of ginsenosides in *American ginseng* leaves and root extracts by LC-MS. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. № 7-8. P. 1098–1105.

203. Davidson V.J., Li X., Brown R.B. Forced-air drying of ginseng roots: 2. Control strategy for three-stage drying process. // J. Food Eng. 2004. V. 63. № 4. P. 369–373.
204. Sun S., Wang C.Z., Tong R., Li X.L., Fishbein A., Wang Q., He T.C., Du W., Yuan C.S. Effects of steaming the root of *Panax notoginseng* on chemical composition and anticancer activities. // Food Chem. 2010. V. 118. № 2. P. 307–314.
205. Lau A.J., Woo S.O., Koh H.L. Analysis of saponins in raw and steamed *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with diode array detection. // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1011. № 1-2. P. 77–87.
206. Lau A.J., Toh D.F., Chua T.K., Pang Y.K., Woo S.O., Koh H.L. Antiplatelet and anticoagulant effects of *Panax notoginseng*: Comparison of raw and steamed *Panax notoginseng* with *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. // J. Ethnopharmacol. 2009. V. 125. № 3. P. 380–386.
207. Lee Y.J., Kim H.Y., Kang K.S., Lee J.G., Yokozawa T., Park J.H. The chemical and hydroxyl radical scavenging activity changes of ginsenoside-Rb₁ by heat processing. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. № 16. P. 4515–4520.
208. Su S., Qi L.W., Du G.J., Mehendale S.R., Wang C.Z., Yuan C.S. Red notoginseng: Higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng. // Food Chem. 2011. V. 125. № 4. P. 1299–1305.
209. Liang Y., Kang A., Xie T., Zheng X., Dai C., Hao H., A J., Sheng L., Xie L., Wang G.J. Influence of segmental and selected ion monitoring on quantitation of multi-component using high-pressure liquid chromatography–quadrupole mass spectrometry: Simultaneous detection of 16 saponins in rat plasma as a case. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 26. P. 4501–4506.
210. Wang X., Zhao T., Gao X., Dan M., Zhou M., Jia W. Simultaneous determination of 17 ginsenosides in rat urine by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 594. № 2. P. 265–273.
211. Li X.Y., Wang G.J., Sun H.G., Hao H.P., Xiong Y.Q., Yan B., Zheng Y.T., Sheng L.S. Pharmacokinetic and Absolute Bioavailability Study of Total Panax Notoginsenoside, a Typical Multiple Constituent Traditional Chinese Medicine (TCM) in Rats. // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. № 5. P. 847–851.

212. Wang W., Wang G.J., Xie H.T., Sun J.G., Zhao S., Jiang X.L., Li H., Lv H., Xu M.J., Wang R. Determination of ginsenoside R_d in dog plasma by liquid chromatography–mass spectrometry after solid-phase extraction and its application in dog pharmacokinetics studies. // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 852. № 1-2. P. 8–14.
213. Joo K.M., Lee J.H., Jeon H.Y., Park C.W., Hong D.K., Jeong H.J., Lee S.J., Lee S.Y., Lim K.M. Pharmacokinetic study of ginsenoside R_e with pure ginsenoside R_e and ginseng berry extracts in mouse using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometric method. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 51. № 1. P. 278–283.
214. Cui J.F., Bjorkhem I., Eneroth P. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol for study on human urinary excretion of ginsenosides after ingestion of ginseng preparations. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 689. № 2. P. 349–355.
215. Gu Y., Wang G.J., Sun J.G., Jia Y.W., Wang W., Xu M.J., Lv T., Zheng Y.T., Sai Y. Pharmacokinetic characterization of ginsenoside R_{h2}, an anticancer nutrient from ginseng, in rats and dogs. // *Food Chem. Toxicol.* 2009. V. 47. № 9. P. 2257–2268.
216. Paek I.P., Moon Y., Kim J., Ji H.Y., Kim S.A., Sohn D.H., Kim J.B., Lee H.S. Pharmacokinetics of a ginseng saponin metabolite compound K in rats. // *Biopharm. Drug Dispos.* 2006. V. 27. № 1. P. 39–45.
217. Xu Q.F., Fang X.L., Chen D.F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside R_{b1} and R_{g1} from *Panax notoginseng* in rats. // *J. Ethnopharmacol.* 2003. V. 84. № 2-3. P. 187–192.
218. Lee P.S., Song T.W., Sung J.H., Moon D.C., Song S., Chung Y.B. Pharmacokinetic Characteristics and Hepatic Distribution of IH-901, a Novel Intestinal Metabolite of ginseng Saponin, in Rats. // *Planta Med.* 2006. V. 72. P. 204–210.
219. Lee P.S., Han J.Y., Song T.W., Sung J.H., Kwon O.S., Song S., Chung Y.B. Physicochemical characteristics and bioavailability of a novel intestinal metabolite of ginseng saponin (IH901) complexed with β -cyclodextrin. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 316. № 1-2. P. 29–36.
220. Ren H.C., Sun J.G., Wang G.J., A J.Y., Xie H.T., Zha W.B., Yan B., Sun F.Z., Hao H.P., Gu S.H., Sheng L.S., Shao F., Shi J., Zhou F. Sensitive determination of 20(S)-protopanaxadiol in rat plasma using HPLC–APCI-MS: Application of

- pharmacokinetic study in rats. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 48. № 5. P. 1476–1480.
221. Zhang D., Wang Y.W., Han J.B., Yu W.S., Deng L.L., Fawcett J.P., Liu Z.Y., Gu J.K. Rapid and sensitive LC–MS/MS assay for the quantitation of 20(S)-protopanaxadiol in human plasma. // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. № 5-6. P. 581–585.
222. Zhang X., Zhang D., Xu J., Gu J., Zhao Y. Determination of 25-OH-PPD in rat plasma by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry and its application in rat pharmacokinetic studies. // J. Chromatogr. B. 2007. V. 858. № 1-2. P. 65–70.
223. Li L., Sheng Y.X., Zhang J.L., Wang S.S., Guo D.A. High-performance liquid chromatographic assay for the active saponins from *Panax notoginseng* in rat tissues. // Biomed. Chromatogr. 2006. V. 20. № 4. P. 327–335.
224. Rodin I.A., Stavriani A.N., Braun A.V., Shpigun O.A., Popik M.V. Simultaneous Determination of Salidroside, Rosavin, and Rosarin in Extracts from *Rhodiola rosea* by High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection. // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 13. P. 60–64.
225. Shan S.M., Luo J.G., Huang F., Kong L.Y. Chemical characteristics combined with bioactivity for comprehensive evaluation of *Panax ginseng* C.A. Meyer in different ages and seasons based on HPLC-DAD and chemometric methods. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 89. P. 76–82.
226. Kang D.I., Lee J.Y., Yang J.Y., Jeong S.M., Lee J.H., Nah S.Y., Kim Y. Evidence that the tertiary structure of 20(S)-ginsenoside Rg(3) with tight hydrophobic packing near the chiral center is important for Na⁺ channel regulation. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 333. № 4. P. 1194–1201.
227. Qi L.W., Wang C.Z., Yuan C.S. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity. // Phytochemistry. 2011. V. 72. № 8. P. 689–699.
228. Lee S.M., Kim S.C., Oh J., Kim J.H., Na M.K. 20(R)-Ginsenoside Rf: A new ginsenoside from red ginseng extract. // Phytochem. Lett. 2013. V. 6. № 4. P. 620–624.
229. Каратаева Ф.Х., Клочков В.В. Общая теория ЯМР. Химические сдвиги ¹H и ¹³C. / Часть 1 книги Спектроскопия ЯМР в органической химии (под ред. И.С.

Антипина), Казань: ФГАОУВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”. 2012. 96 с.

230. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China / V. 1. (English Ed.). Chemical Industry Press: Chinese Pharmacopoeia Commission . 2010. 3382 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Предполагаемые сокращенные структурные формулы сапонинов, обнаруженных в экстрактах из растительного материала и продуктов на основе женьшеня.

Образцы	Обнаруженные гинсенозиды
Сухой корень (Дальний Восток)	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc-6-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcRha, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc(Mal)Rha, ППТ-20-Glc-6-Glc(Mal), ППТ-20-Glc(Mal)-6-Glc(Mal), ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, В _{7-б} -6-Glc
Свежий корень (Дальний Восток)	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-3-GlcGlcGlc, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-3-GlcGlc
Свежий корень (измельч.) (Дальний Восток)	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc, ОАК-20-Glc-3-GluA, ППД-3-GlcGlc, ППД-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Xyl, ОАК-20-GluA, ППД-20-Glc
Сухой корень (Сибирь)	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, А ₂ -20-GlcGlc-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc-6-Glc(Mal)Rha, ОТ-6-GlcRha, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-3-GlcGlcGlc, ППД-3-GlcGlc, ОАК-20-Glc-3-GluA

Таблица П1. Предполагаемые сокращенные структурные формулы сапонинов, обнаруженных в экстрактах из растительного материала и продуктов на основе женьшеня. (*Продолжение*)

Образцы	Обнаруженные гинсенозиды
Сухой корень (Брянская обл.)	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha, В _{1-b} -20-GlcGlc-6-Glc, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-20-Glc(Mal)-6-Glc(Mal), ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc(Mal)-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-6-Glc(Ac)Glc, ППД-20-GlcXyl-6-Glc(Ac)Glc
Сконцентрированный экстракт из корня женьшеня (Дальний Восток)	В _{3(4)-b} -20-Glc-6-Glc, В _{3(4)-b} -20-Glc-6-GlcRha, В _{8-b} -20-Glc-3-Glc, В _{8-b} -20-Glc-6-GlcRha, В _{2-b} -6-GlcRha, В _{2-b} -20-GlcXyl, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl-6-Rha, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl-6-Rha, ППТ-20-Glc-6-GlcRhaXyl, А ₂ -20-Glc-6-GlcRha, А ₂ -20-Glc-6-Glc, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl-6-Rha, А ₂ -20-Glc-6-GlcRha, А ₂ -20-Glc-6-GlcRha, ППТ-20-Glc-6-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-GlcRhaXyl, В _{3(4)-b} -20-GlcRha, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl, А ₂ -20-Glc-6-GlcRha, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-Glc-Rha, В _{1-b} -20-GlcXyl, В _{3(4)-b} -20-Glc, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl, В _{1-b} -20-GlcGlc-6-Glc, В _{3(4)-b} -20-Glc, А ₂ -20-GlcXyl, В _{3(4)-b} -20-Glc, ППТ-2-20-Glc-6-GlcGlc, В _{8-b} -20-GlcXyl, А ₂ -20-Glc-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcGlc-6-GlcGlc, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl-6-GlcRha, В _{3(4)-b} -20-GlcXyl-6-GlcRha, ППТ-20-Glc-6-Glc(Ac), ППТ-20-GlcXyl-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcGlc-6-Glc, ППТ-20-GlcGlcXyl-6-Glc, В _{8-b} -20-Glc, ППТ-20-GlcGlc-6-Glc, А ₂ -20-Glc-6-Rha, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcGlc-6-Glc, ППТ-20-GlcXyl-6-Glc, А ₂ -20-Glc-6-Glc, ОТ-6-GlcXylRha, ОТ-6-GlcXylRha, ОТ-6-GlcRha, В _{1-b} -20-Glc-3-Mal, ППТ-20-GlcXyl-6-Glc, А ₂ -20-GlcGlc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-GlcXyl, ППТ-20-Glc-6-GlcXyl, ППТ-20-GlcXyl, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППТ-6-GlcRha, ППТ-6-Glc, ППТ-20-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, А ₂ -20-GlcGlc, ППТ-20-GlcRhaGlc(Ac)-6-Glc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППТ-20-Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ОАК-20-GluAGlcXyl, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc, ППТ-20-GlcGlc, ППД-20-Glc(Mal)-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ППТ-20-GlcXyl, ППД-3-GlcGlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc, ППД-20-Glc-6-Glc(Ac)Glc, ППД-6-Glc(Ac)Rha, ППД-3-GlcXylGlc, В _{7-b} -6-GlcGluA(Mal), ППД-3-GlcXylGlc, В _{7-b} -6-GlcGlc, В _{7-b} -6-GlcRha, В _{7-b} -6-GlcRha, В _{7-b} -6-Glc, ППД-3-GlcGlc, В _{7-b} -6-Glc, ППД-20-Glc-6-Glc, ППД-3-GlcGlc, ППД-3-GlcGlc, В _{7-a} -3-GlcGlc, В _{7-a} -3-GlcGlc, ППД-20-Glc, ППД-3-Glc

Таблица П1. Предполагаемые сокращенные структурные формулы сапонинов, обнаруженных в экстрактах из растительного материала и продуктов на основе женьшеня. (*Продолжение*)

Образцы	Обнаруженные гинсенозиды
фитопрод	ППТ-20-Glc-6-GlcGlc, A ₂ -20-Glc-6-GlcRha, B _{2-b} -20-GlcGlc-6-GlcGlc, B _{1-b} -20-GlcGlc-6-GlcGlc, ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcRha, ППТ-20-Glc(Mal)Glc, ППТ-20-GlcGlcGlc-6-Glc, B _{3(4)-b} -20-GlcRha-6-Glc, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl, ППТ-6-GlcXyl, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ППД-20-Glc(Mal)-3-GlcGlc, ППД-3-GlcGlcGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc, ППД-3-GlcGlc, ОАК-20-Glc-3-GluA, ОАК-20-GluA
корки	ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcRha, ОТ-6-GlcRha, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXylXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcGlc-3-Glc(Ac)Glc, ОАК-20-GluAGlcXyl, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-3-GlcGlcGlc, ППД-20-Glc-3-Glc(Mal)Glc, ППД-20-GlcXyl-3-RhaXyl, ППД-20-Glc-6-Glc(Ac)Glc, ППД-20-Glc-6-Glc(Ac)Glc(Mal)
чай	ППТ-20-Glc-6-Glc, ППТ-20-Glc-6-GlcRha, ППТ-6-GlcGlc, ППТ-20-GlcXyl, ППД-20-GlcGlc-3-GlcGlc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ОАК-20-GluAGlc-3-Glc, ППД-20-GlcXyl-3-GlcGlc, ППТ-20-Glc, ППД-20-Glc-3-GlcGlc, B _{7-b} -6-GlcRha, B _{7-b} -6-GlcRha, ОАК-20-Glc-3-GluA, ППД-3-GlcGlc, ППД-3-GlcGlc, B _{7-a} -3-GlcGlc, B _{7-a} -3-GlcGlc

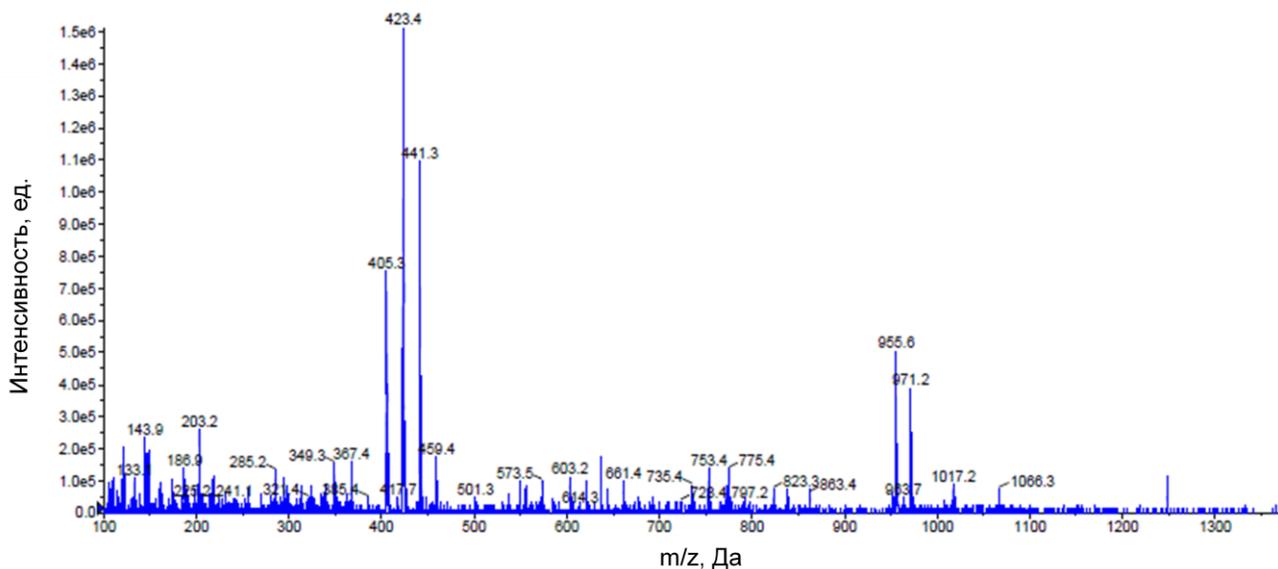


Рис. П1. Масс-спектр гинсенозида R1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

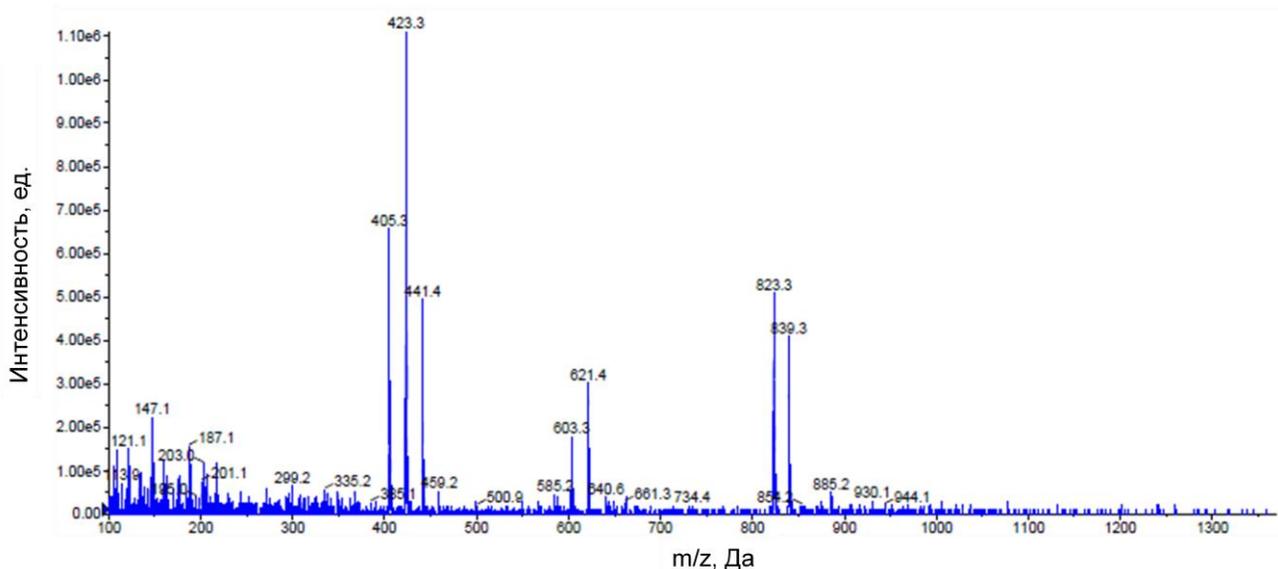


Рис. П2. Масс-спектр гинсенозида Rg1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

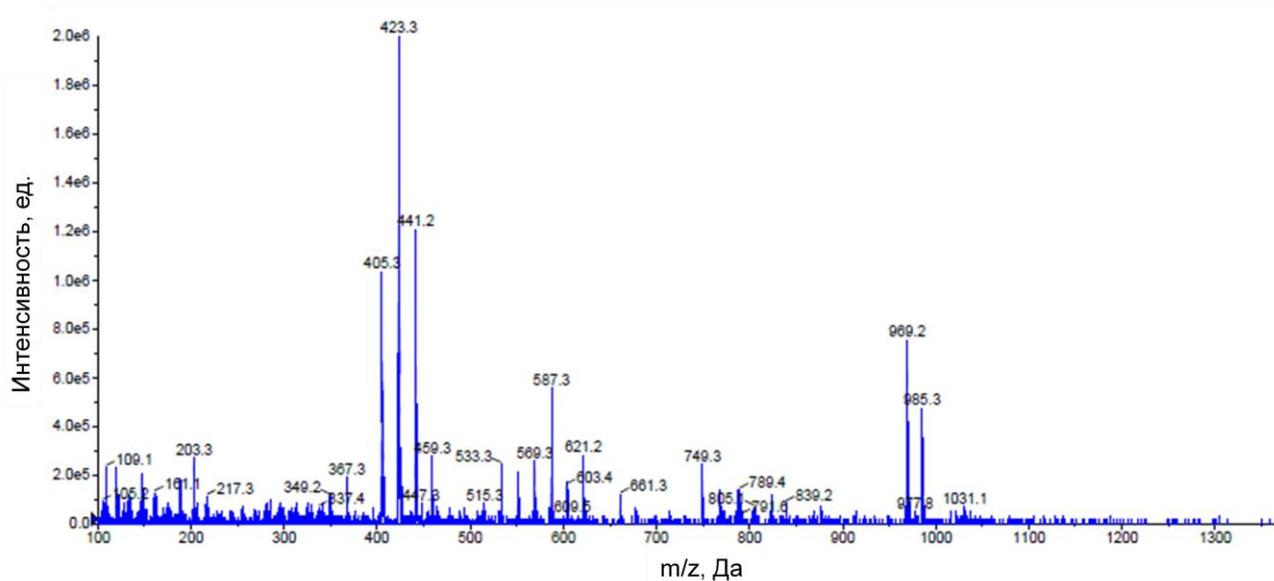


Рис. ПЗ. Масс-спектр гинсенозида Re в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

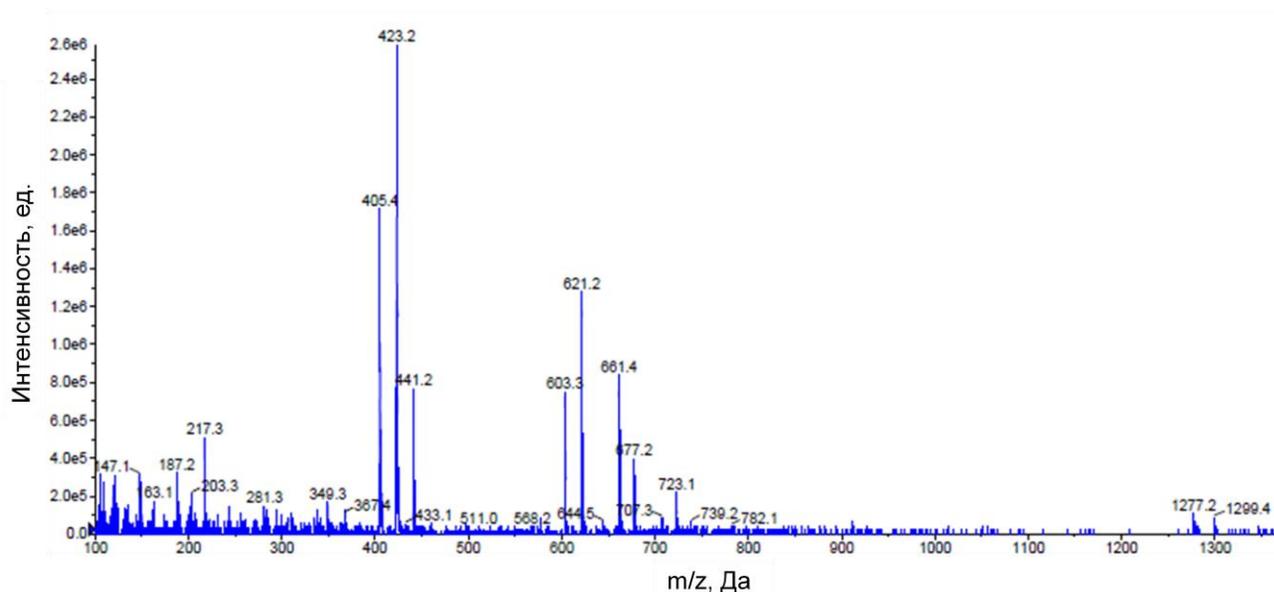


Рис. П4. Масс-спектр гинсенозида Rh1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

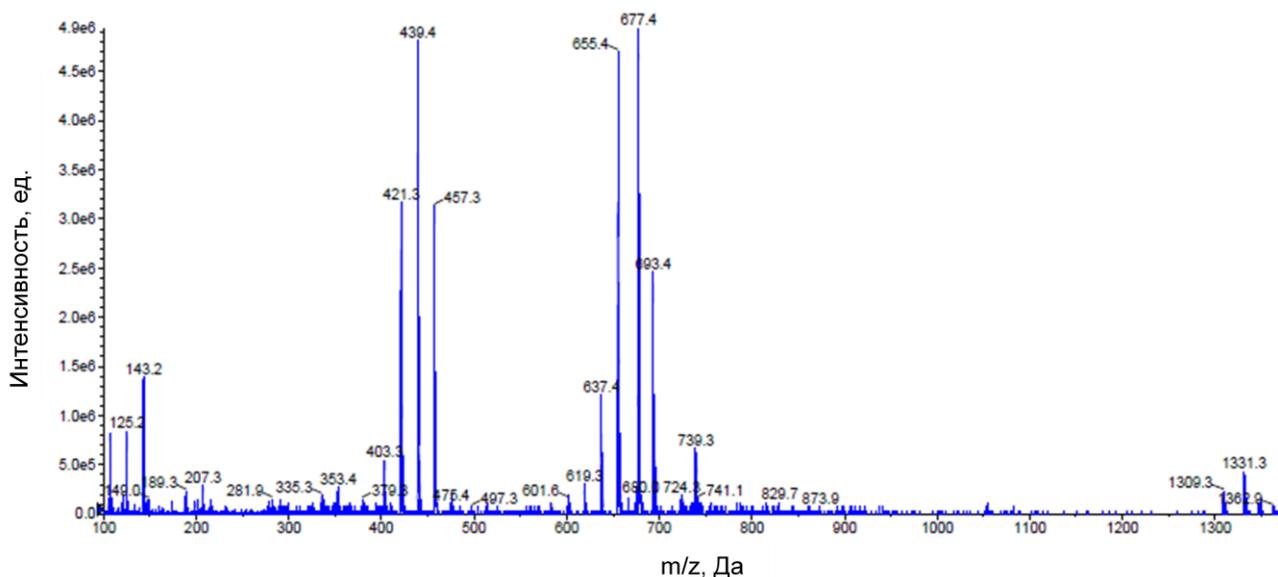


Рис. П5. Масс-спектр гинсенозида RT5 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

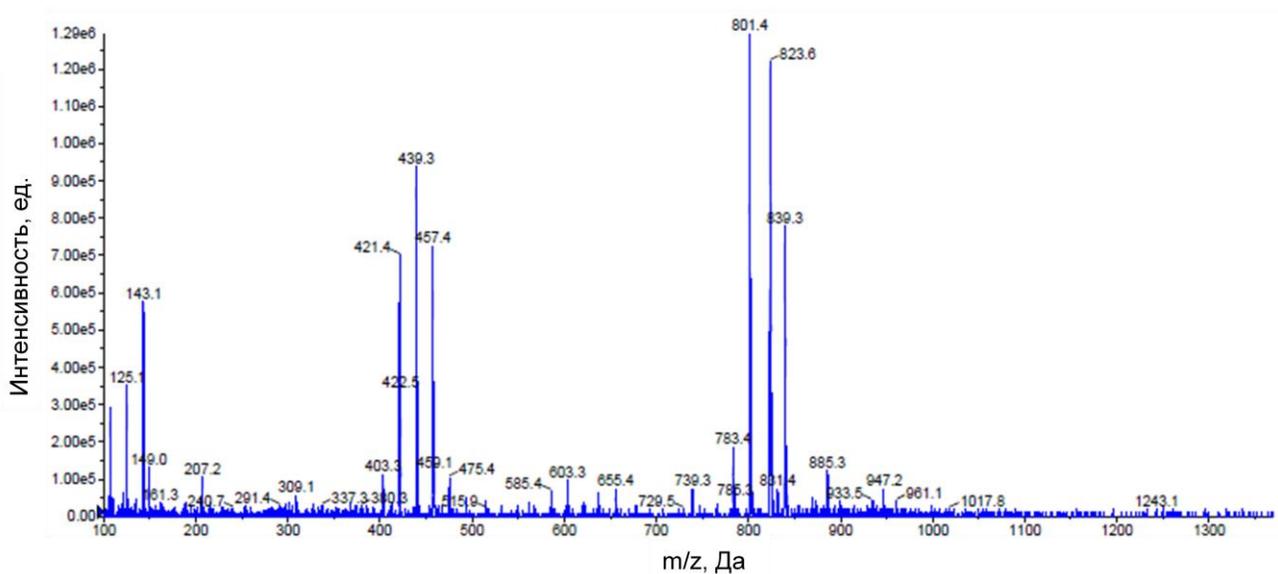


Рис. П6. Масс-спектр гинсенозида F11 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

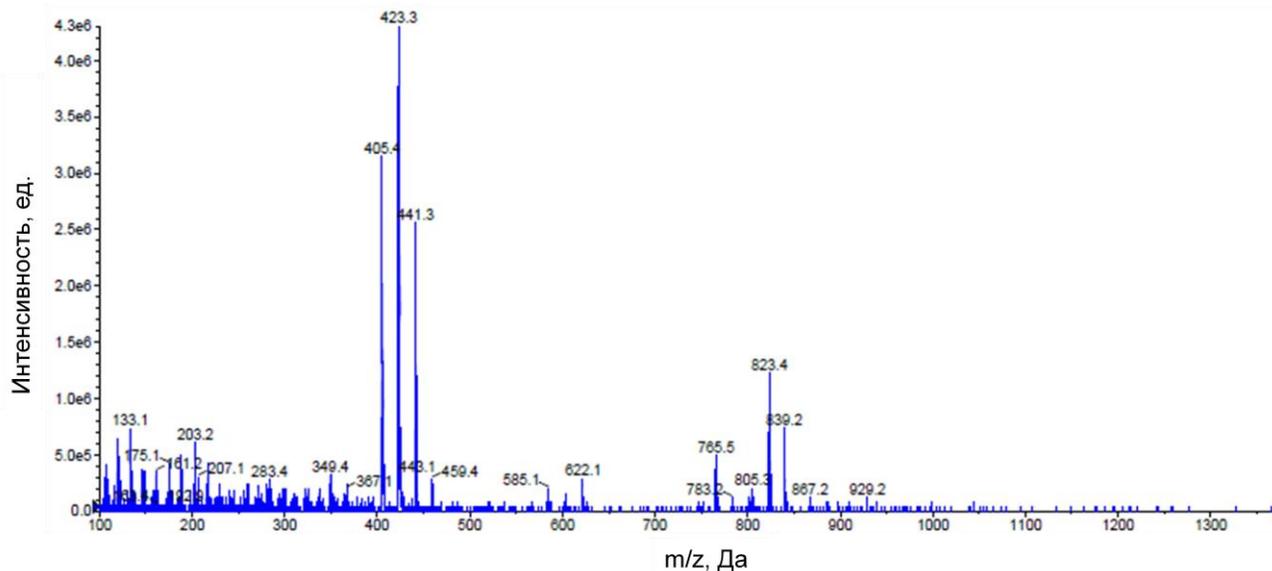


Рис. П7. Масс-спектр гинсенозида Rf в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

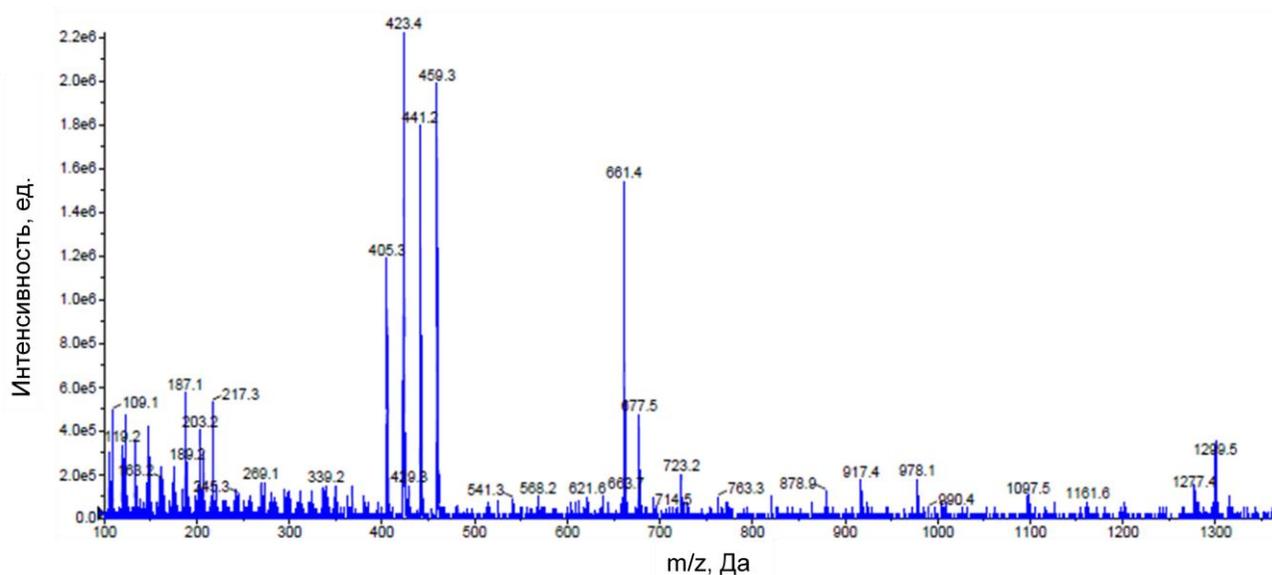


Рис. П8. Масс-спектр гинсенозида F1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

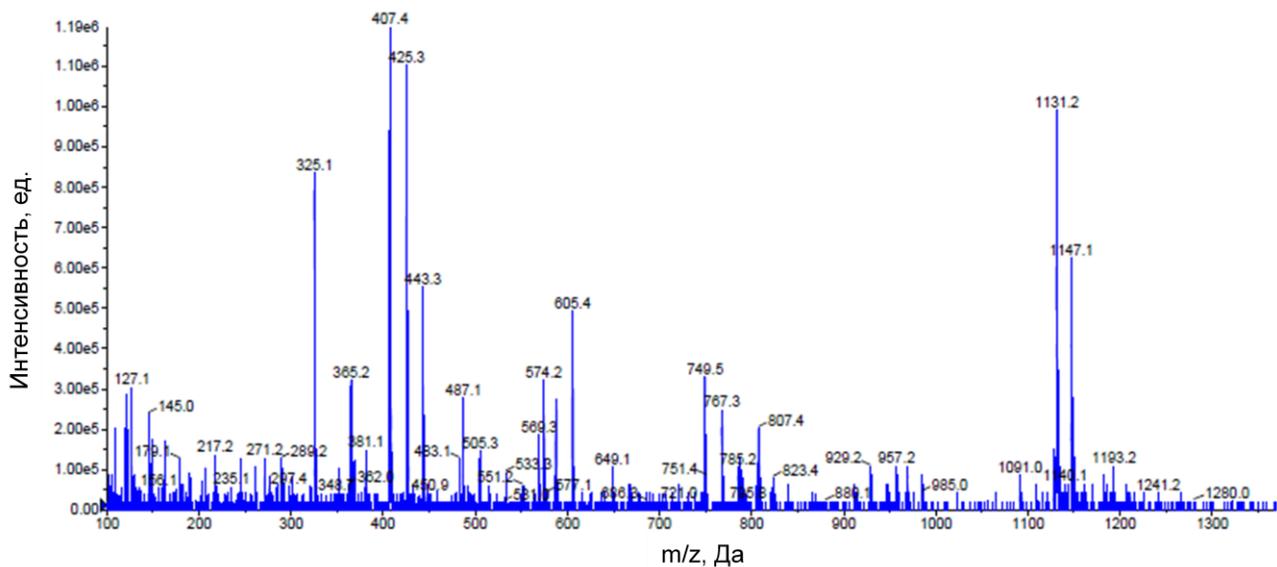


Рис. П9. Масс-спектр гинсенозида Rb1 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

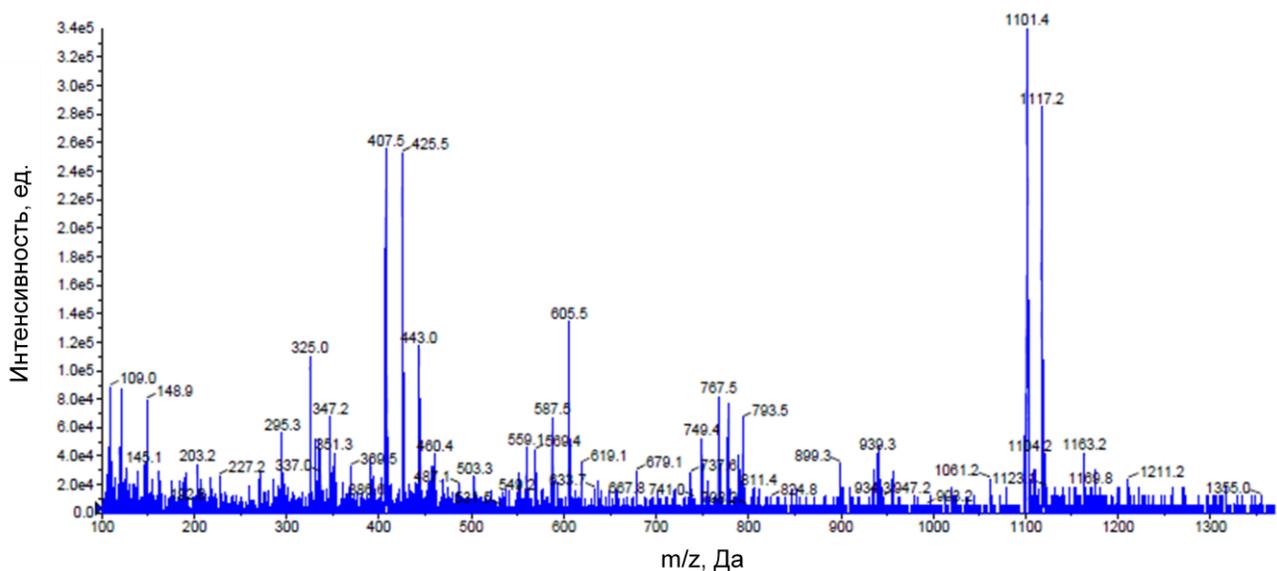


Рис. П10. Масс-спектр гинсенозида Rb3 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

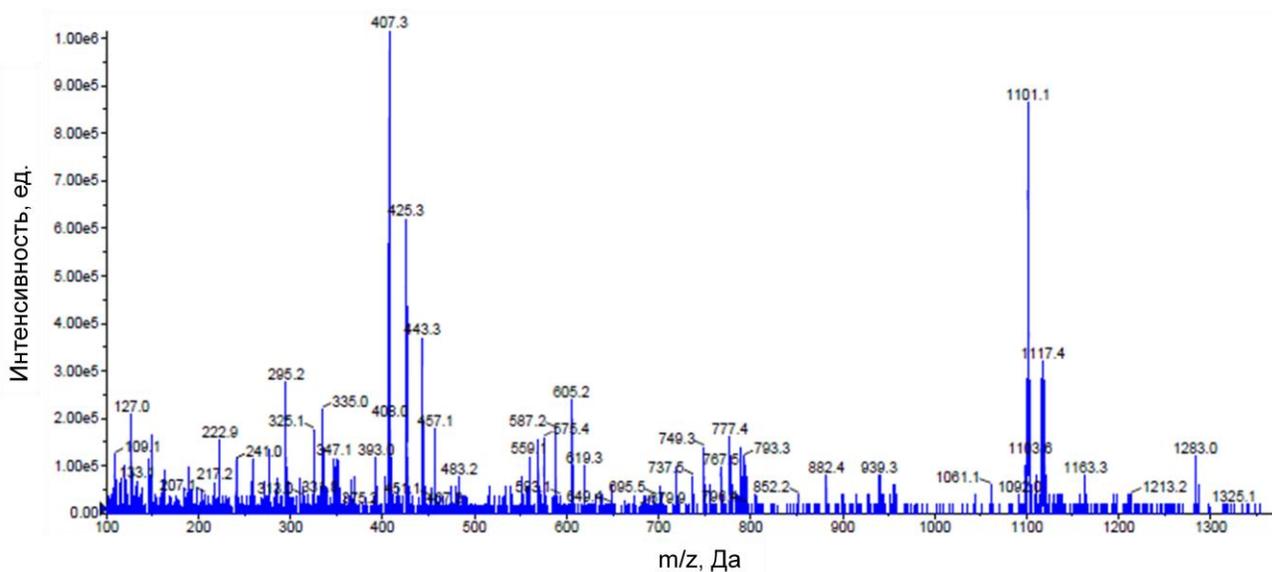


Рис. П11. Масс-спектр гинсенозида Rb2 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

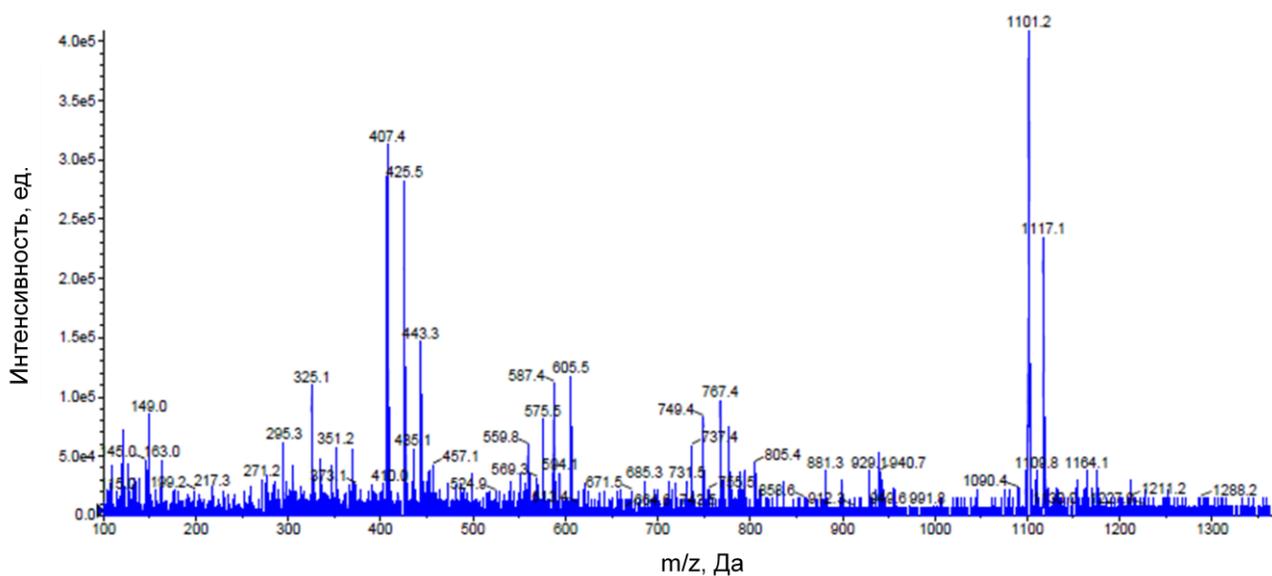


Рис. П12. Масс-спектр гинсенозида Rc в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

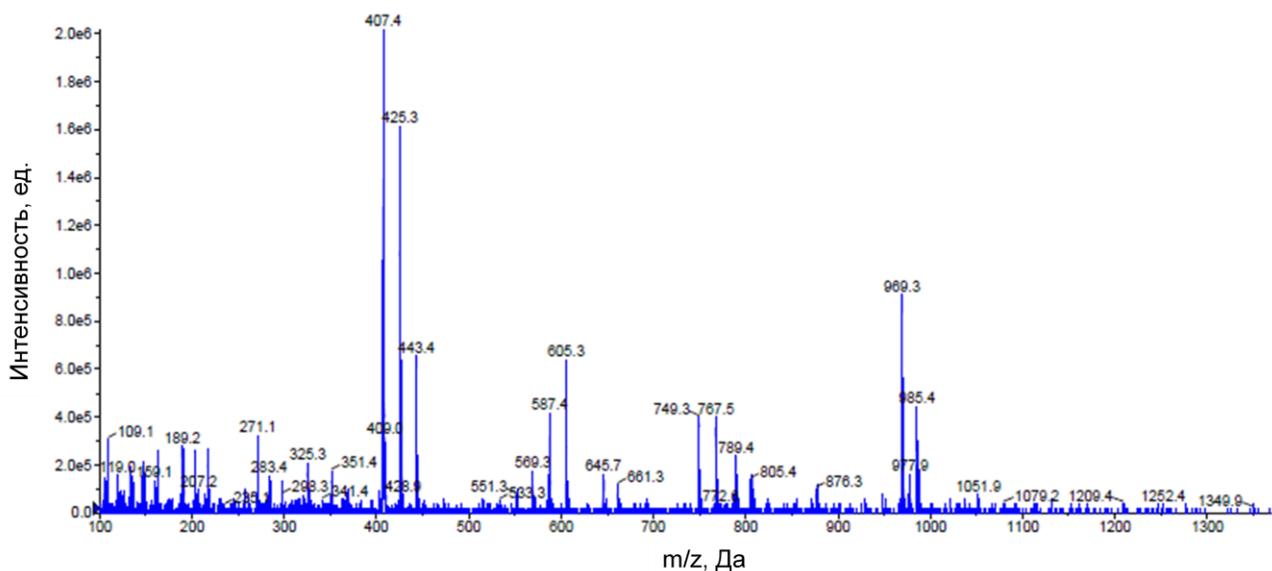


Рис. П13. Масс-спектр гинсенозида Rd в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

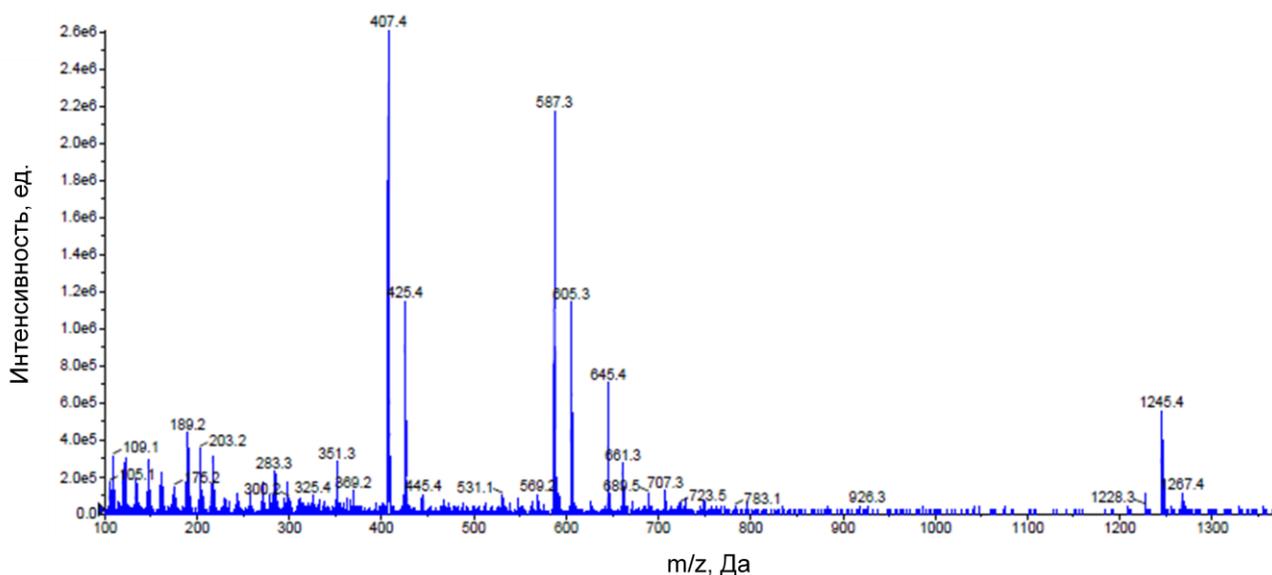


Рис. П14. Масс-спектр гинсенозида Rh2 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

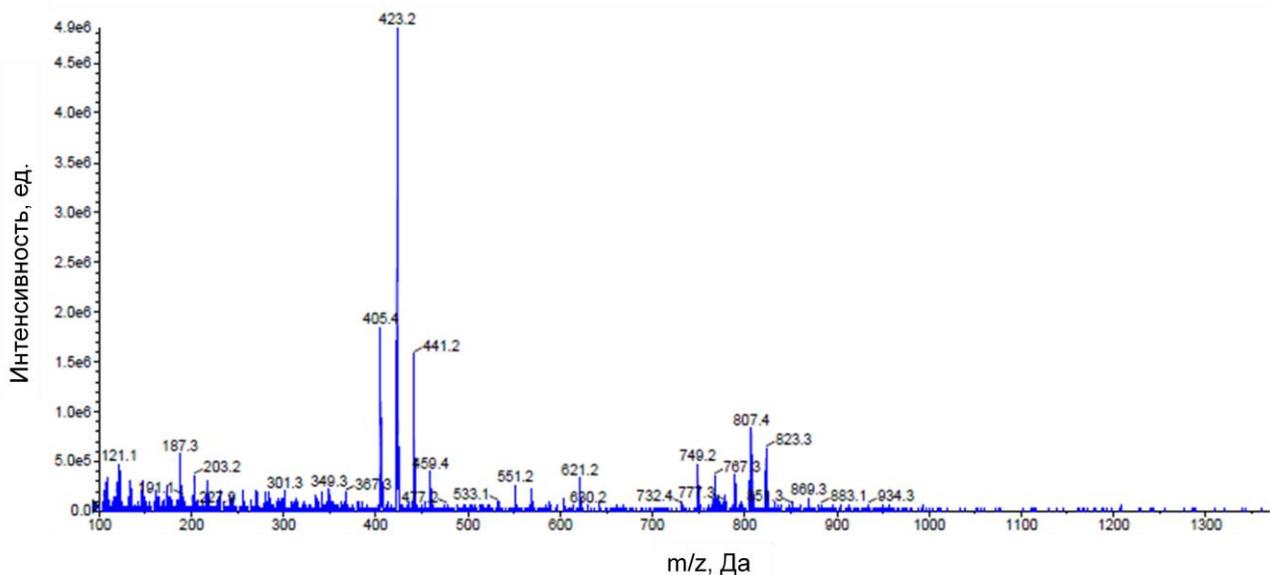


Рис. П15. Масс-спектр гинсенозида Rg2 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

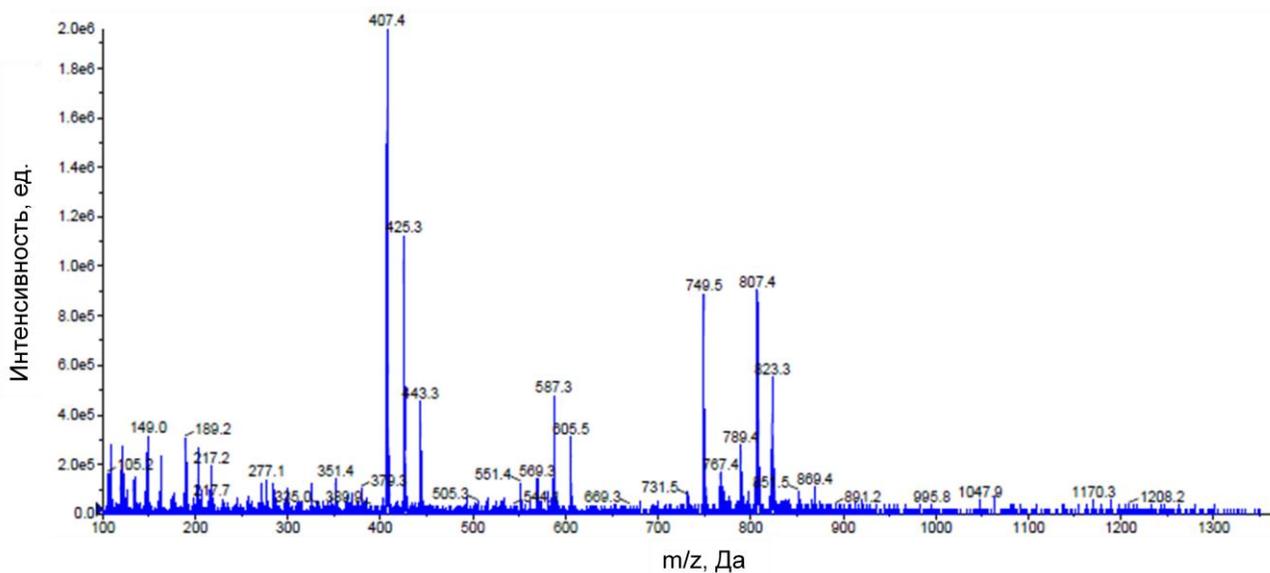


Рис. П16. Масс-спектр гинсенозида Rg3 в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

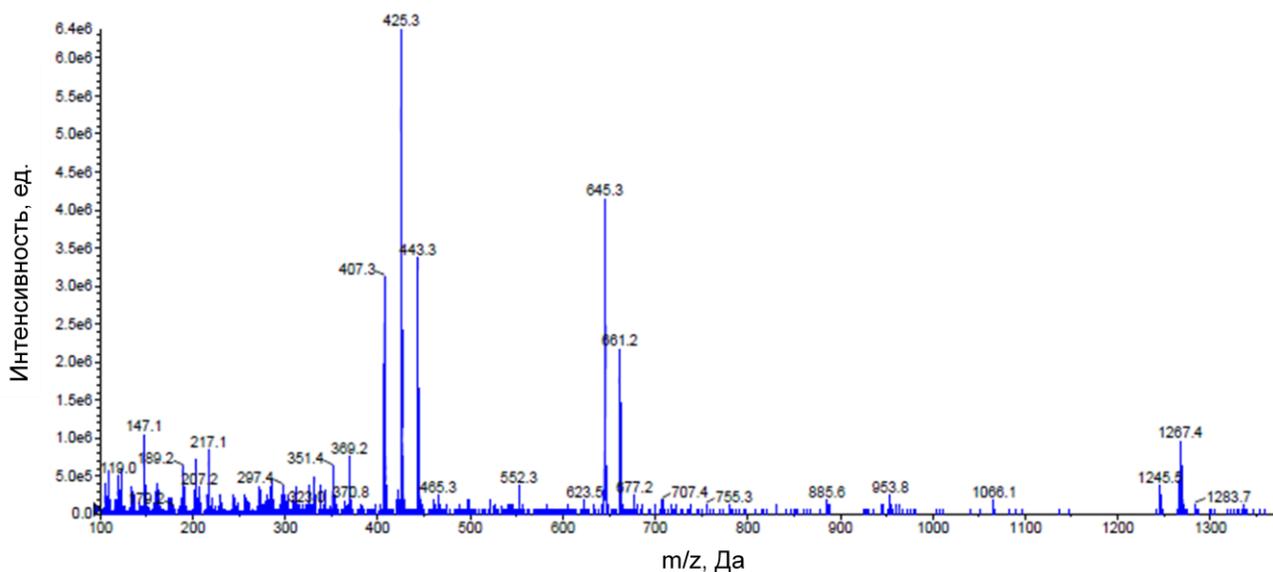


Рис. П17. Масс-спектр гинсенозида С-К в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

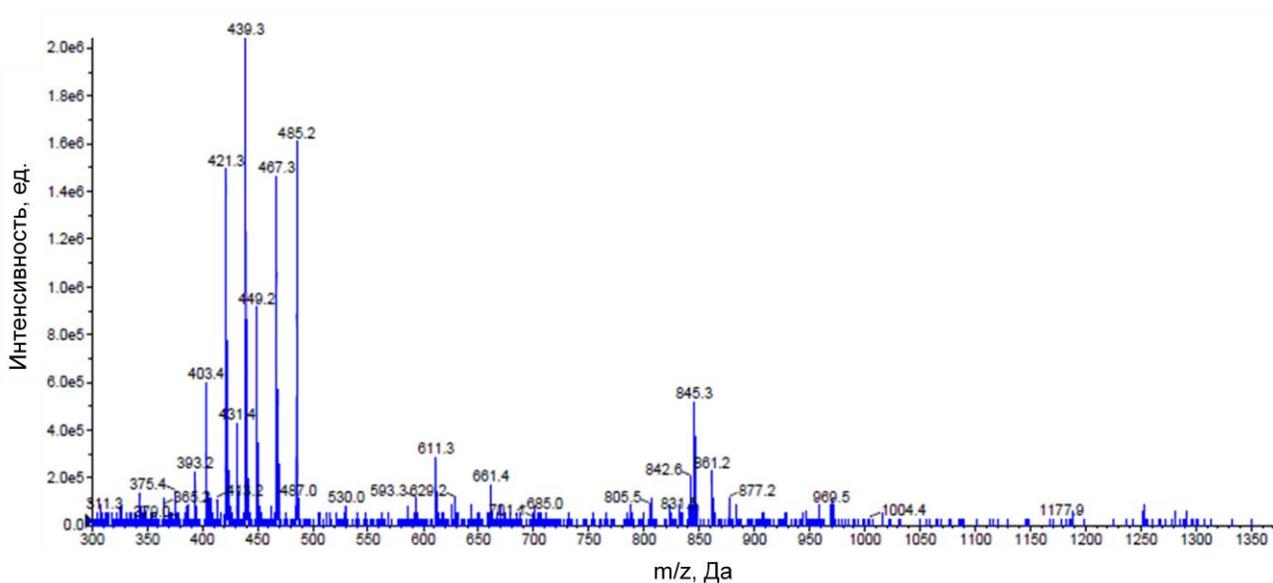


Рис. П18. Масс-спектр гинсенозида X-3-GlcGluA в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

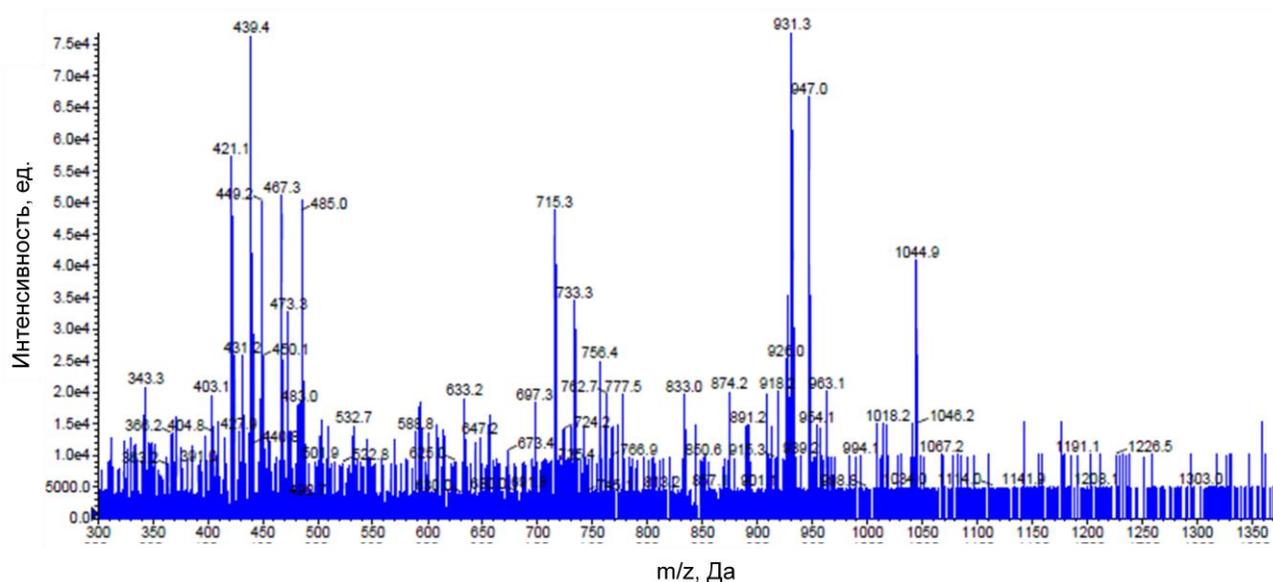


Рис. П19. Масс-спектр гинсенозида X-20-GluA-3-Glc(Mal) в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

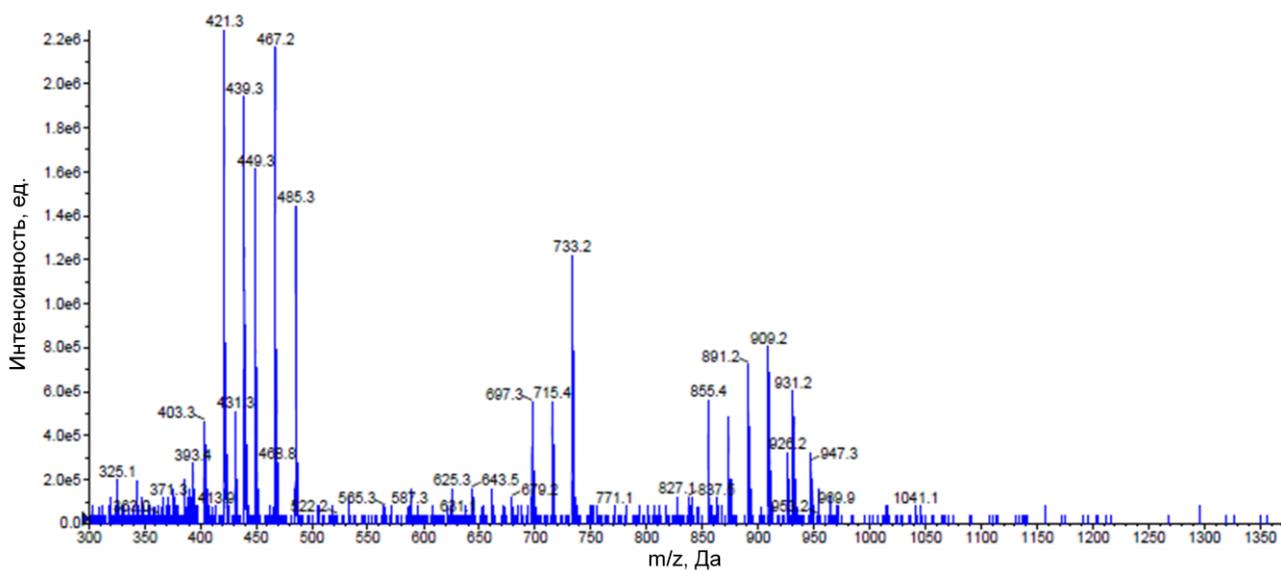


Рис. П20. Масс-спектр гинсенозида X-3-Glc(Mal)GluA в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

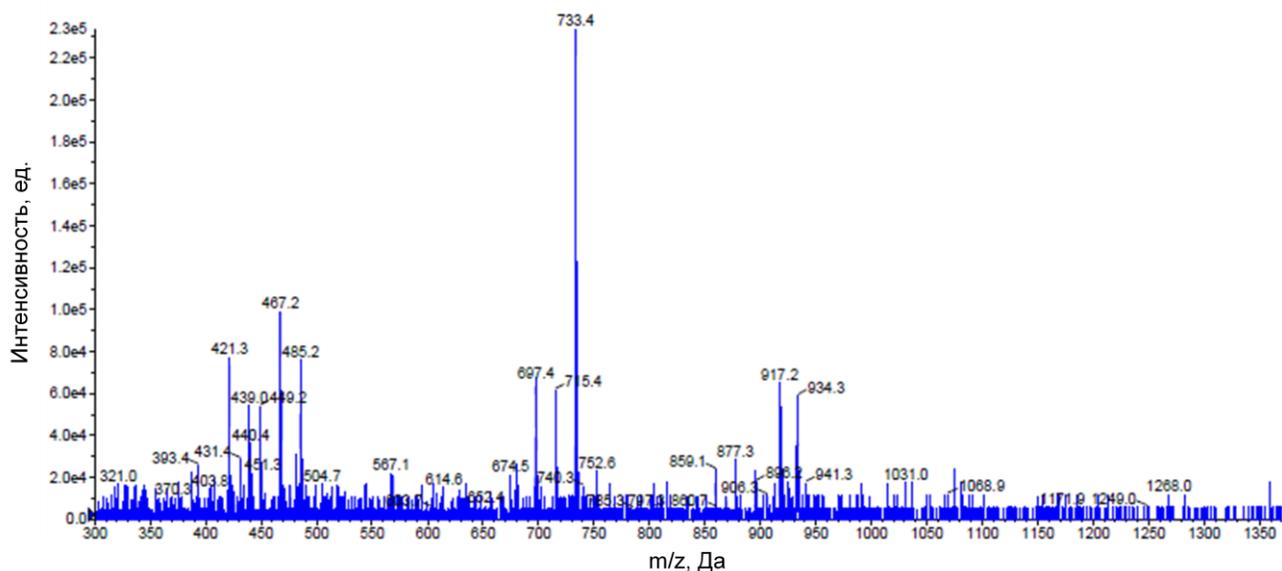


Рис. П21. Масс-спектр гинсенозида X-20-Glc-3-Glc(Mal) в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

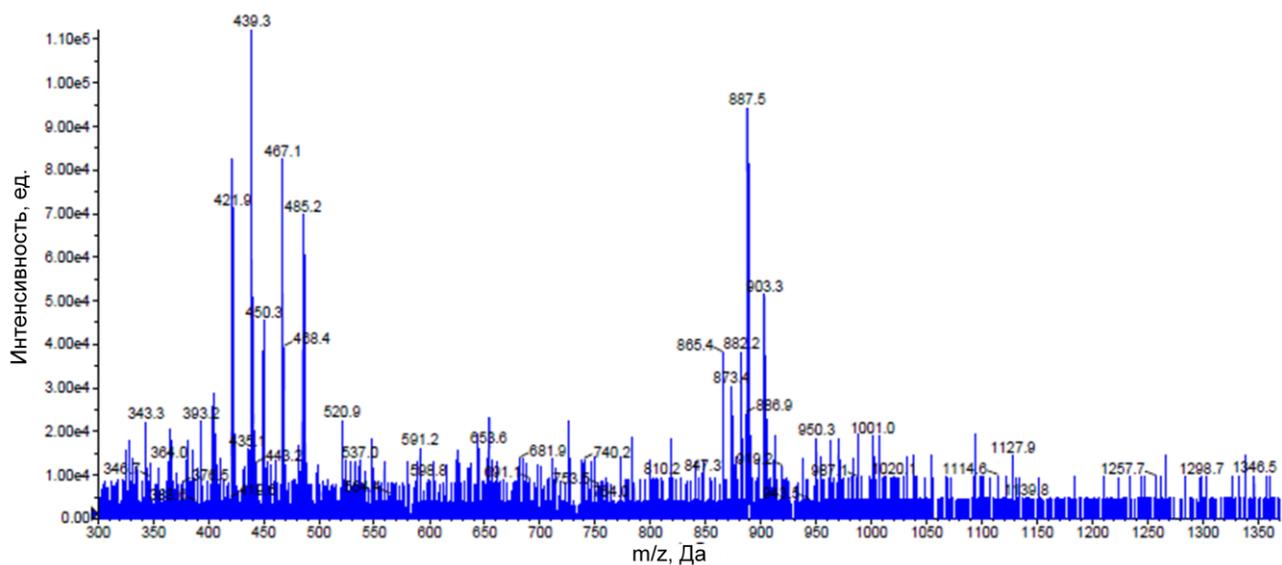


Рис. П22. Масс-спектр гинсенозидов X-20-GluA-3-Glc(Ac) и X-20-Glc-3-Glc(Ac) в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

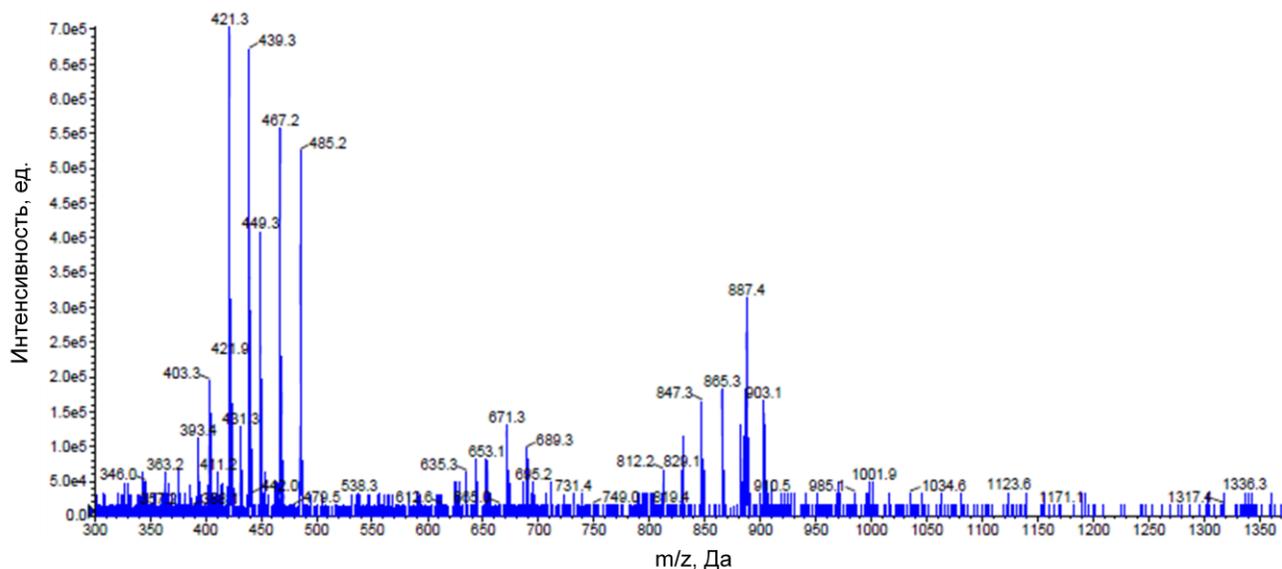


Рис. П23. Масс-спектр гинсенозида X-3-Glc(Ac)GluA в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

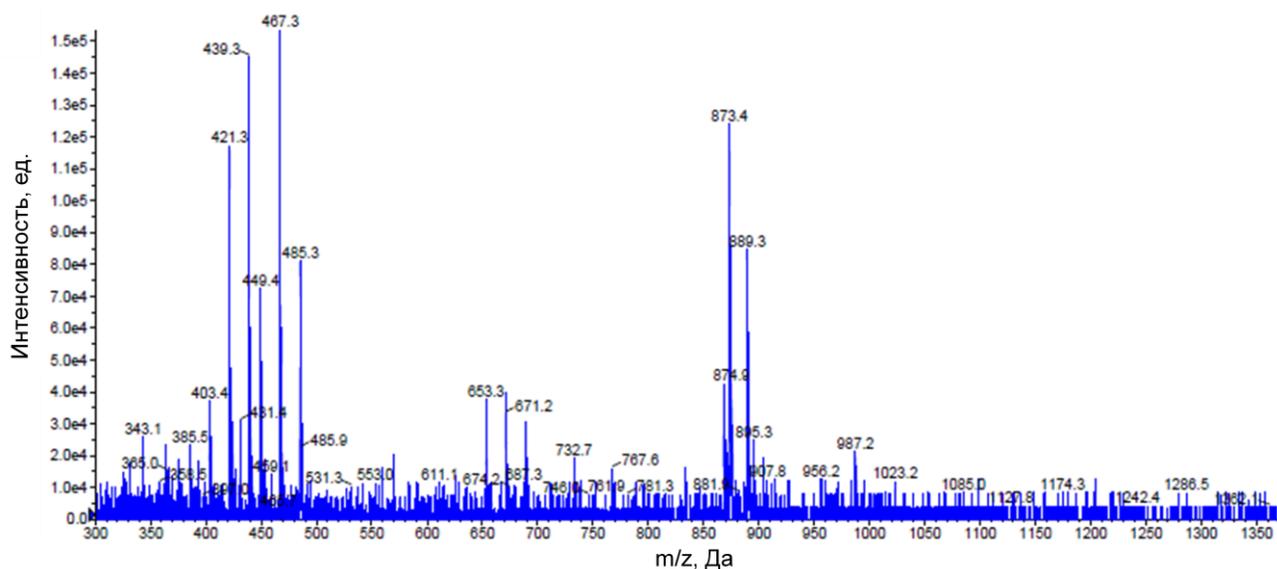


Рис. П24. Масс-спектр гинсенозида X-Glc-3-Glc(Ac)Glc в диапазоне m/z 300 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

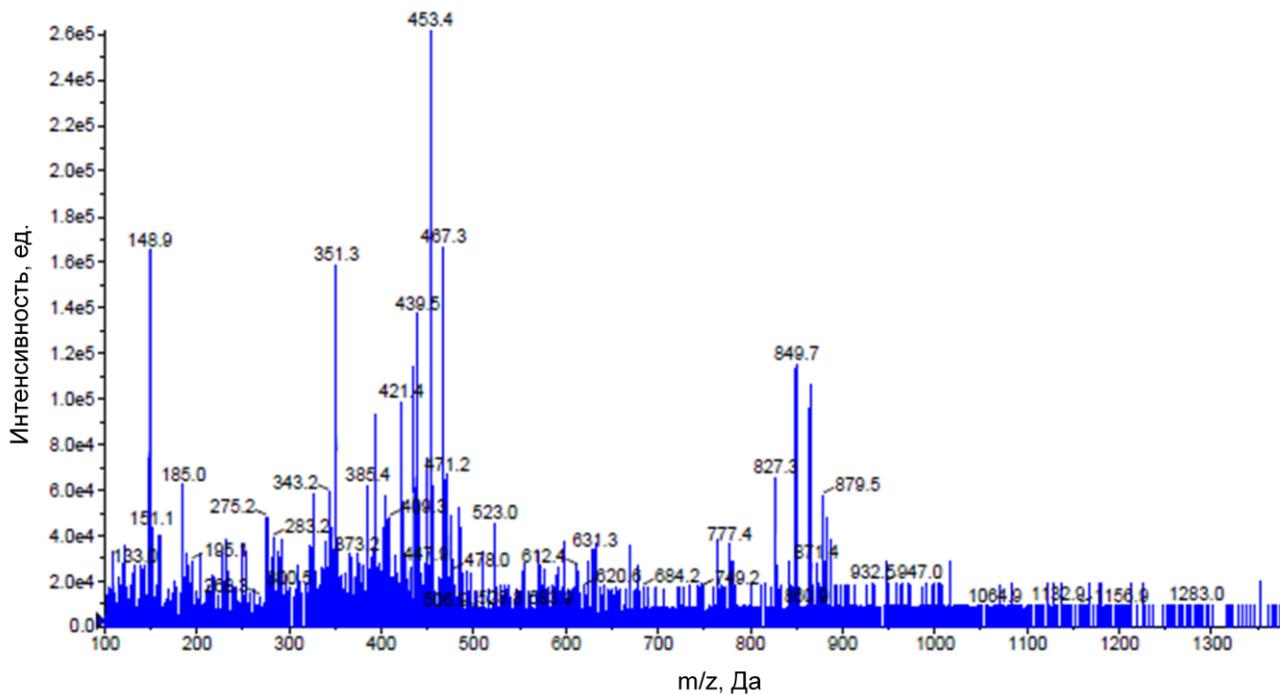


Рис. П25. Масс-спектр гинсенозида X-3-GlcGluA в диапазоне m/z 100 – 1370 сканирования на ЛИЛ в режиме ИЭР в варианте регистрации положительных ионов.

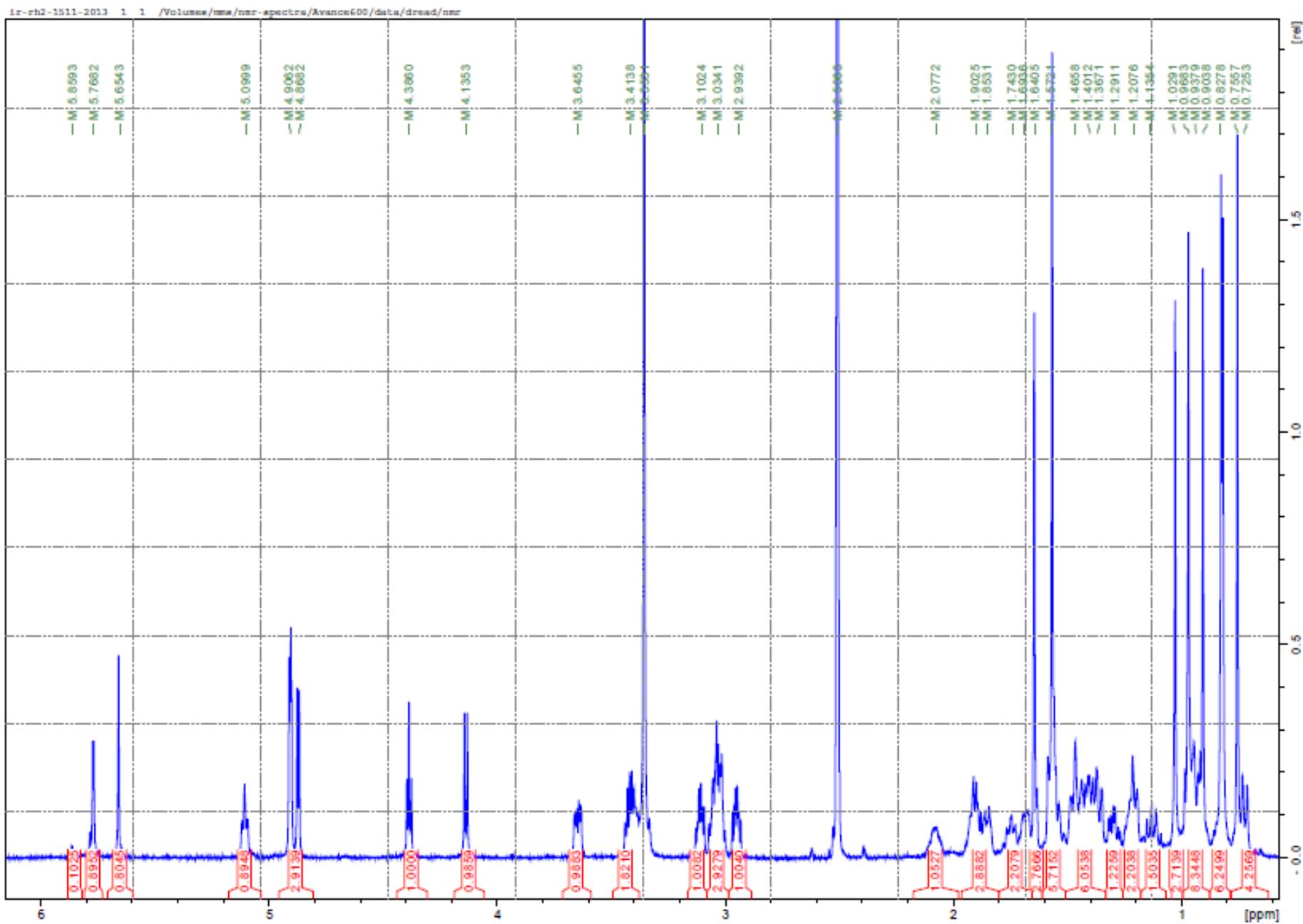


Рис. П26. ПМР спектр (600 МГц) 4.5 мг гинсенозида Rh2 в дейтеро-ДМСО.

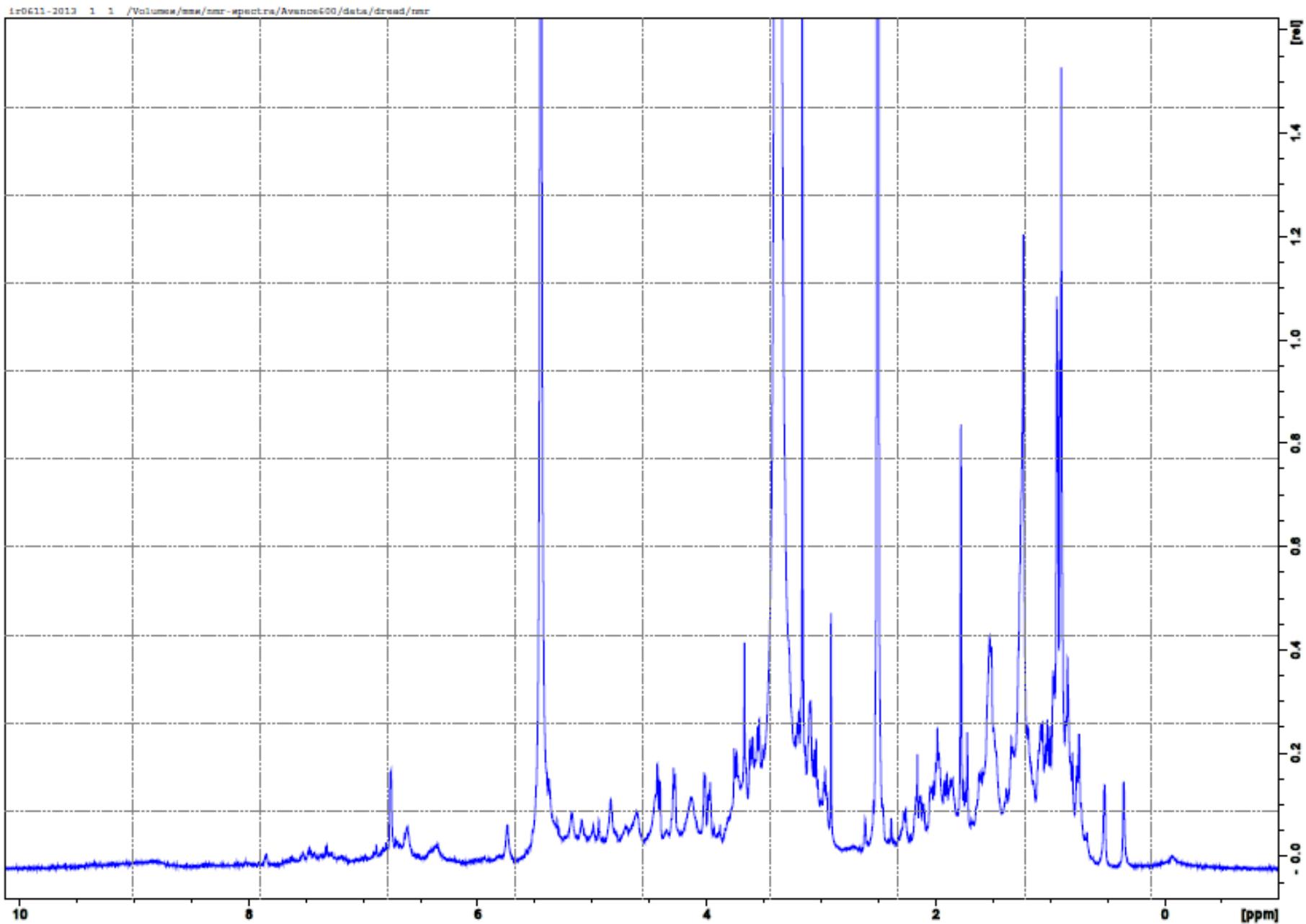


Рис. П27. ПМР спектр (600 МГц) фракции № 1 в дейтеро-ДМСО.

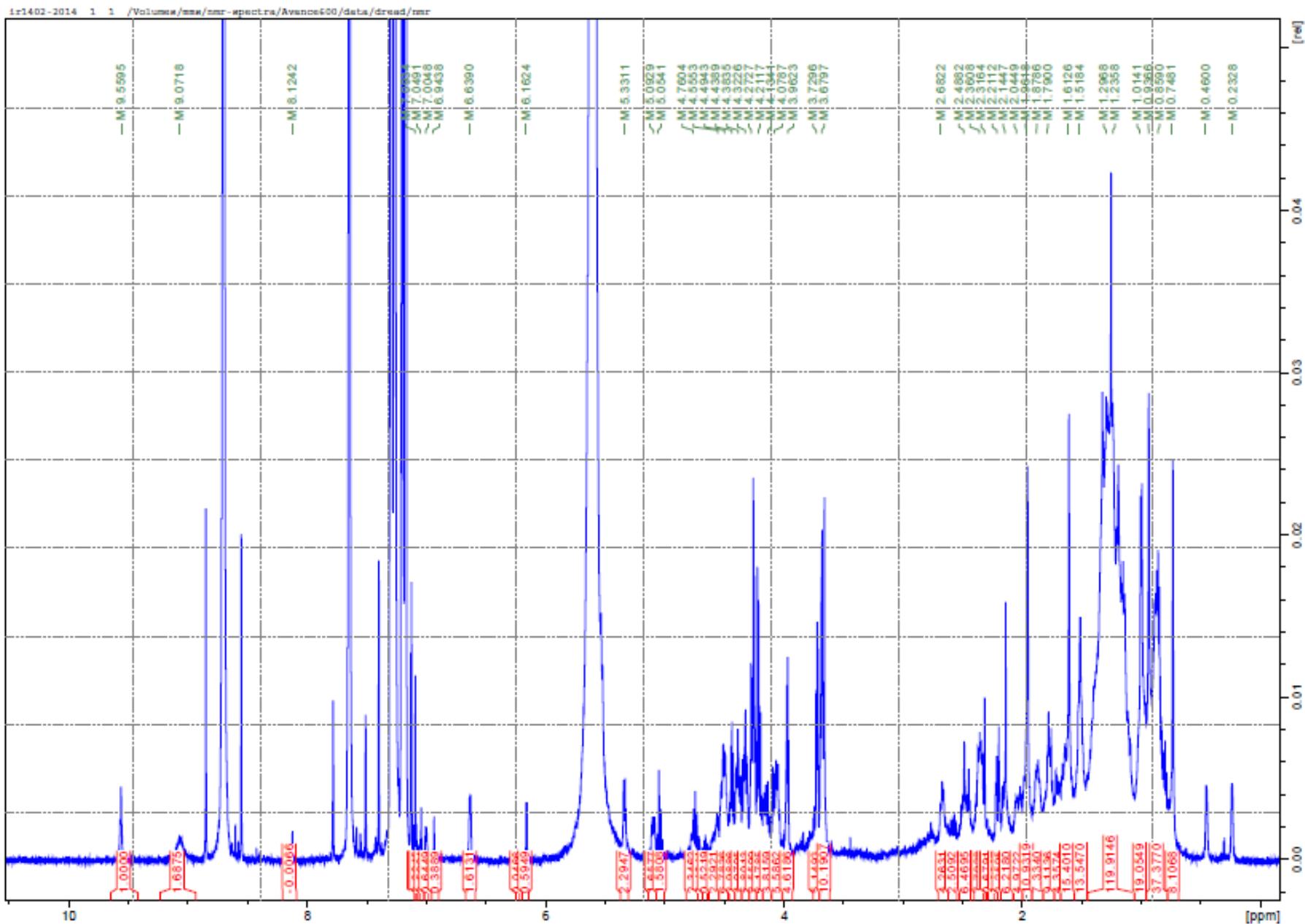


Рис. П28. ПМР спектр (600 МГц) фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D₂O.

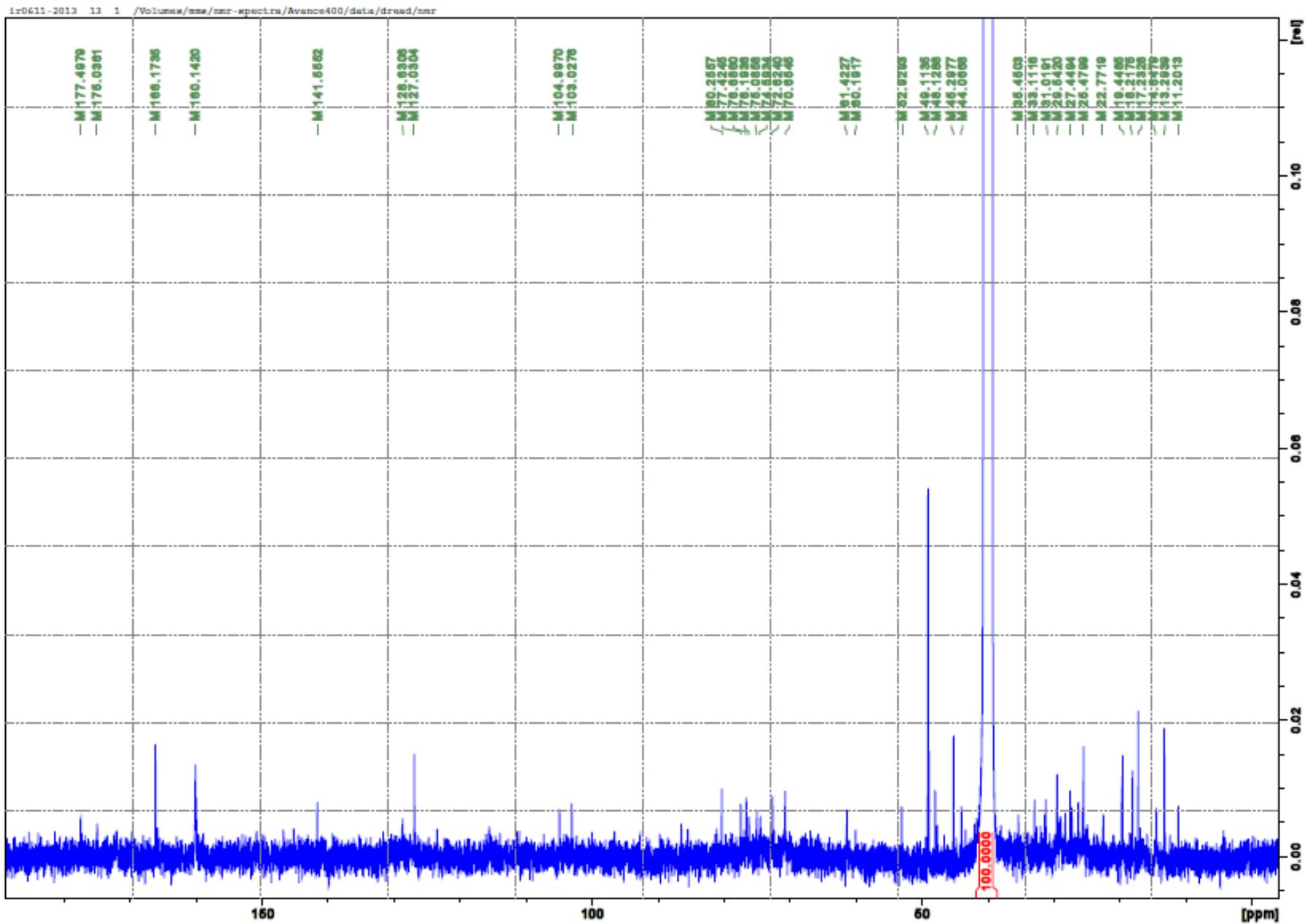


Рис. П29. ^{13}C ЯМР (150 МГц) спектр фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

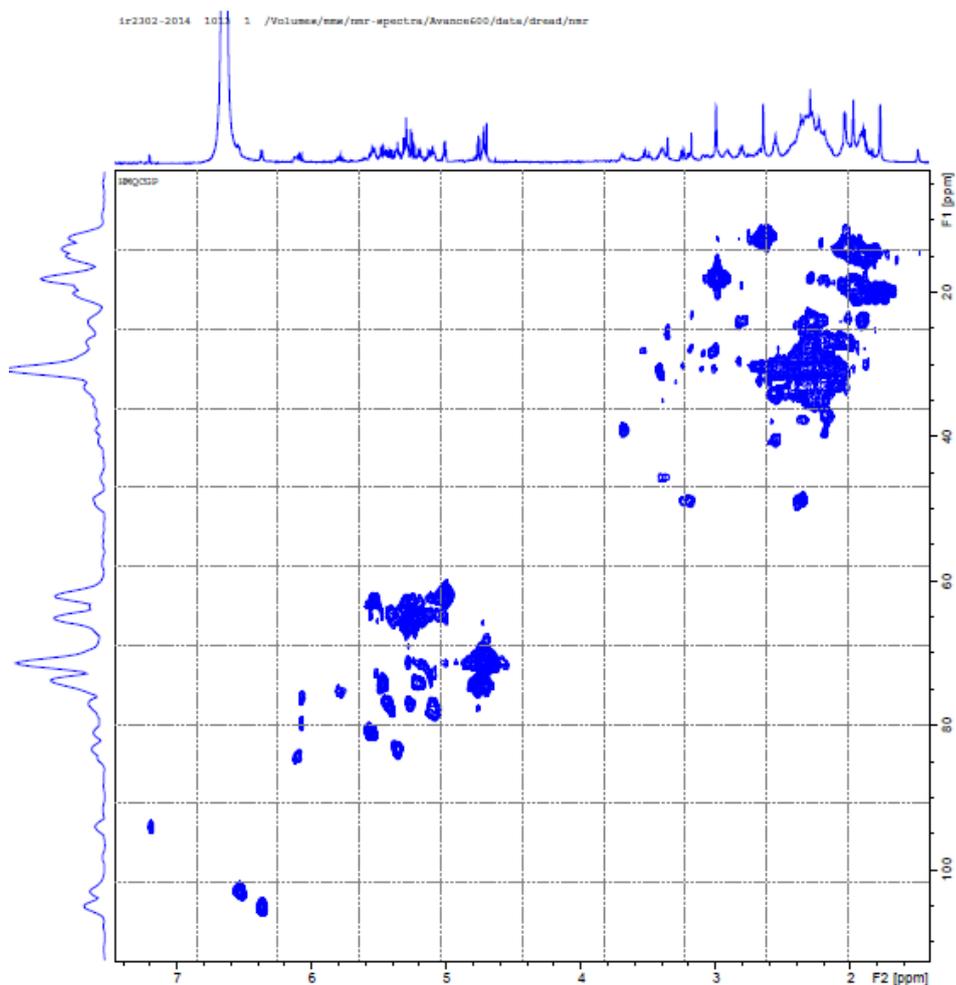


Рис. П30. ^1H - ^{13}C НМҚС корреляция, полученная из ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) спектров фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

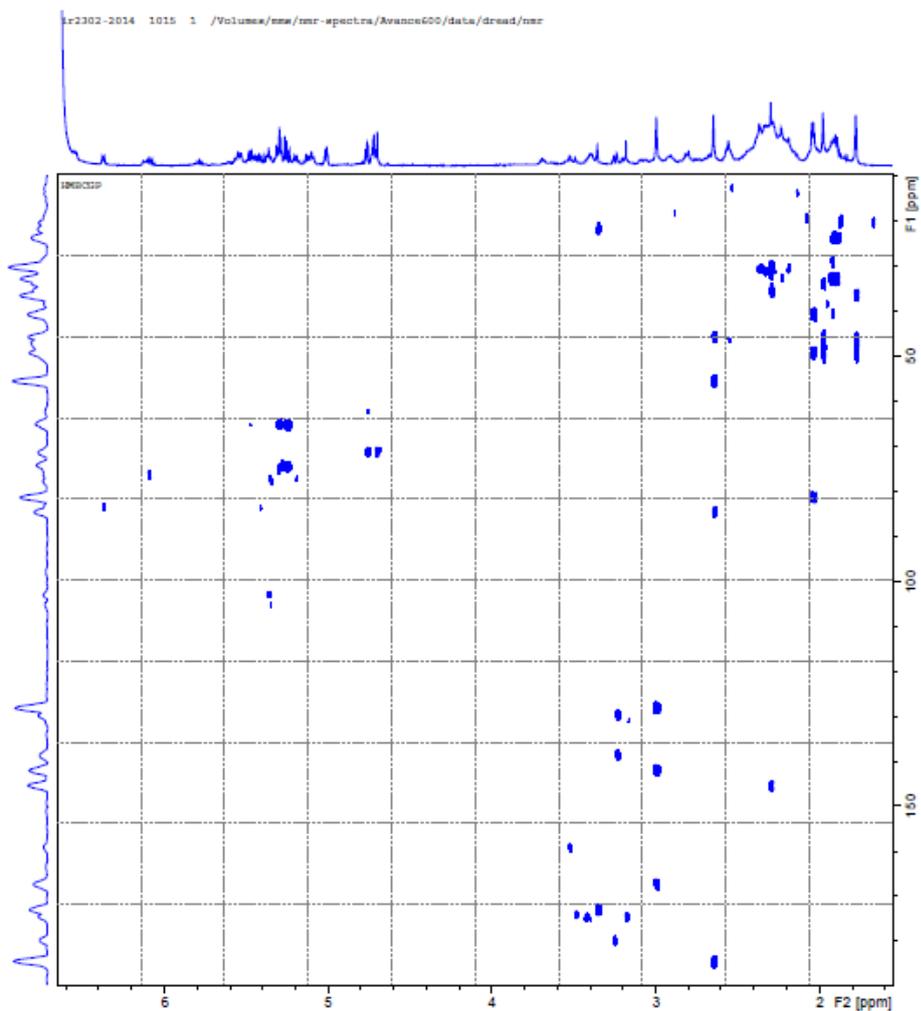


Рис. ПЗ1. ^1H - ^{13}C НМВС корреляция, полученная из ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) спектров фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

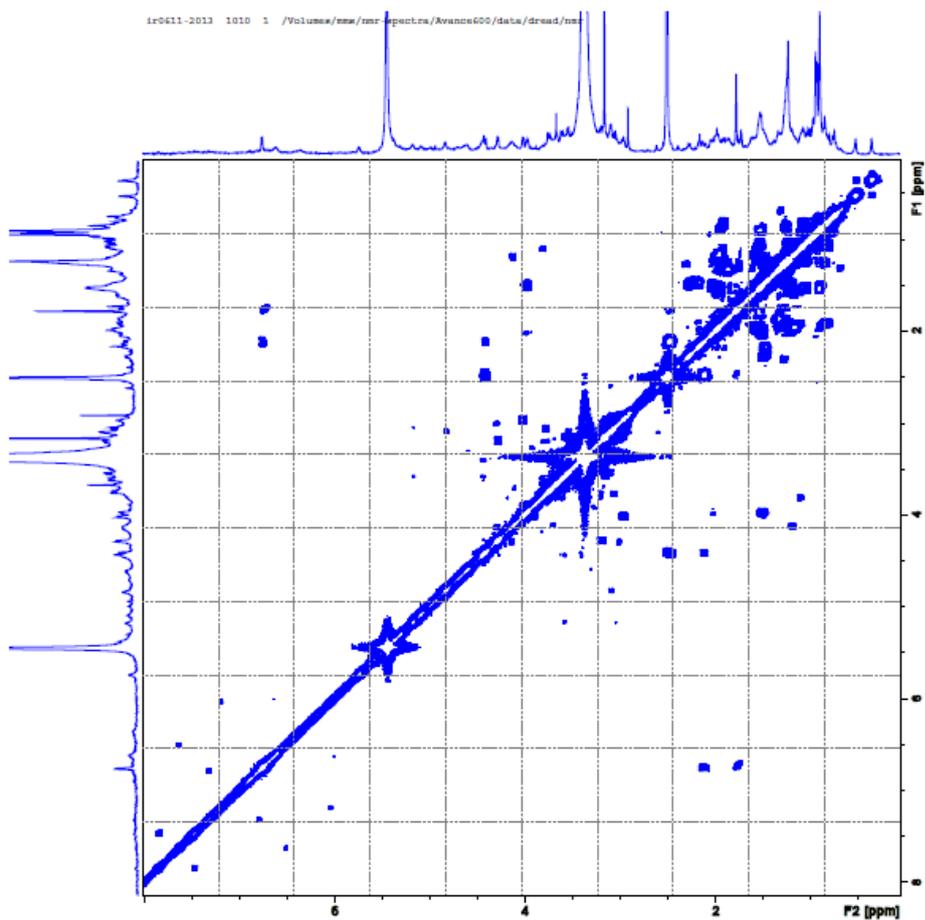


Рис. П32. ^1H - ^1H COSY корреляция, полученная из ПМР (600 МГц) и ^{13}C ЯМР (151 МГц) спектров фракции № 2 в смеси (7:1) дейтеро-пиридина и D_2O .

