

УДК 543.544.5.068.7/543.51/615.322/615.074

СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ

И.А. Родин, А.Н. Ставрианиди, А.В. Браун, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии, e-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com)

Гинсенозиды – основные действующие вещества растений рода *Panax*. Женьшень и его аналоги активно используют в производстве средств традиционной медицины в Китае, Корее, Японии, США и на Дальнем Востоке. Более 40 лет многие исследователи создавали методы идентификации и определения гинсенозидов в растительных материалах, экстрактах и коммерческих продуктах. Для выделения этих веществ из растительного сырья применяли разные виды экстракции. Разделение гинсенозидов проводили с помощью таких методов, как газовая хроматография, тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Преимущественно использовали метод ВЭЖХ. Для определения гинсенозидов в сочетании с ВЭЖХ применяли спектрофотометрическое и флуоресцентное детектирование, а позднее детектирование по светорассеянию и масс-спектрометрическое. Наиболее поздние варианты этих методов приведены в данном обзоре с критической оценкой опубликованных результатов.

Ключевые слова: гинсенозиды, *Panax ginseng*, высокоэффективная жидкостная хроматография, биоактивные вещества.

Гинсенозиды относятся к классу тритерпеновых сапонинов и являются основными биоактивными компонентами наиболее распространенного растения, используемого в восточной традиционной медицине (ТМ) – женьшеня (род *Panax*). Наиболее часто такие лекарственные средства изготавливают на основе *P. ginseng* (Корея), *P. Quinquefolius* (США), *P. notoginseng* (Китай и Япония), *P. vietnamensis* (Вьетнам) и *P. japonicas* (Япония). На сегодняшний день наиболее изучен корейский женьшень, который использовали в Азии на протяжении 5 000 лет в качестве тоника и средства, продлевающего жизнь [1]. В настоящее время женьшень применяют в основном как общеукрепляющее средство и для увеличения сопротивляемости организма 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 способность модулировать иммунную систему, а также антистрессовая и антигипергликемическая активность – наиболее существенные черты препаратов на основе женьшеня. Более того, многие современные предклинические и клинические исследования указывают на существование противораковых свойств таких препаратов [6, 7].

Основными компонентами женьшеня, отвечающими за 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 (PPT), протопанаксадиоольными (PPD) и октиллольными (OT) сапогенинами [10]. Чуть меньше известно на данный момент гинсенозидов с олеаноловым кислотным (OA) сапогенином или с сапогенинами с вариациями в боковой цепи в положении C17 и другими неизвестными сапогенинами [8].

Поскольку женьшень – одно из самых популярных во всем мире растений, используемых в фитомедицине, огромное число работ было выполнено в последние 40 лет с целью разработать аналитические методы идентификации, количественной оценки содержания и контроля качества гинсенозидов в растительном сырье, экстрактах и коммерческих продуктах. Одной из основных задач таких исследований была дифференциация гинсенозидных паттернов для разных представителей рода *Panax*, чтобы избежать фальсификации и неверной идентификации. Кроме того, изучено влияние традиционных способов переработки корней

Сапогенины

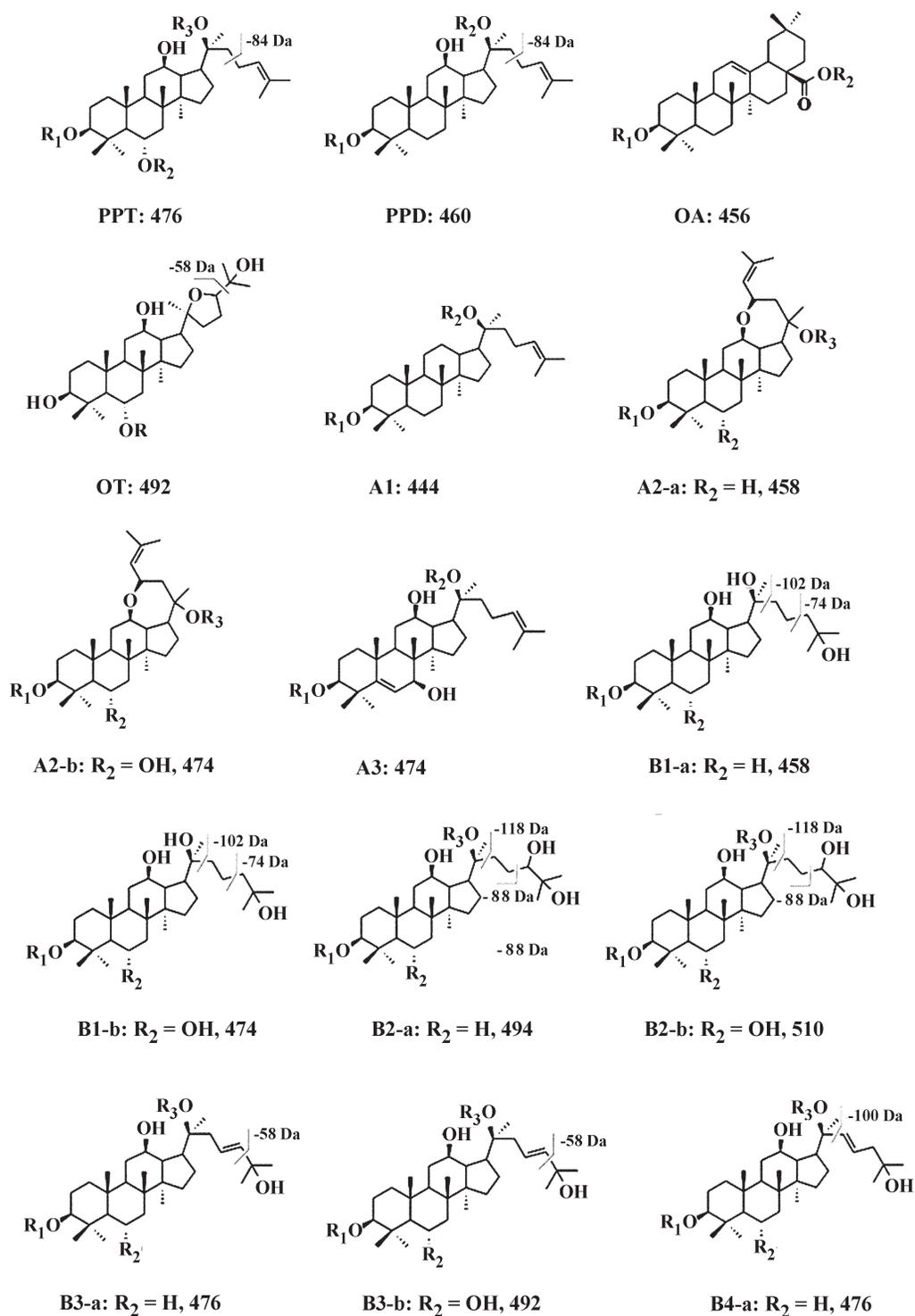


Рис. 1. Структуры составных частей молекул гинсенозидов

Сапогенины

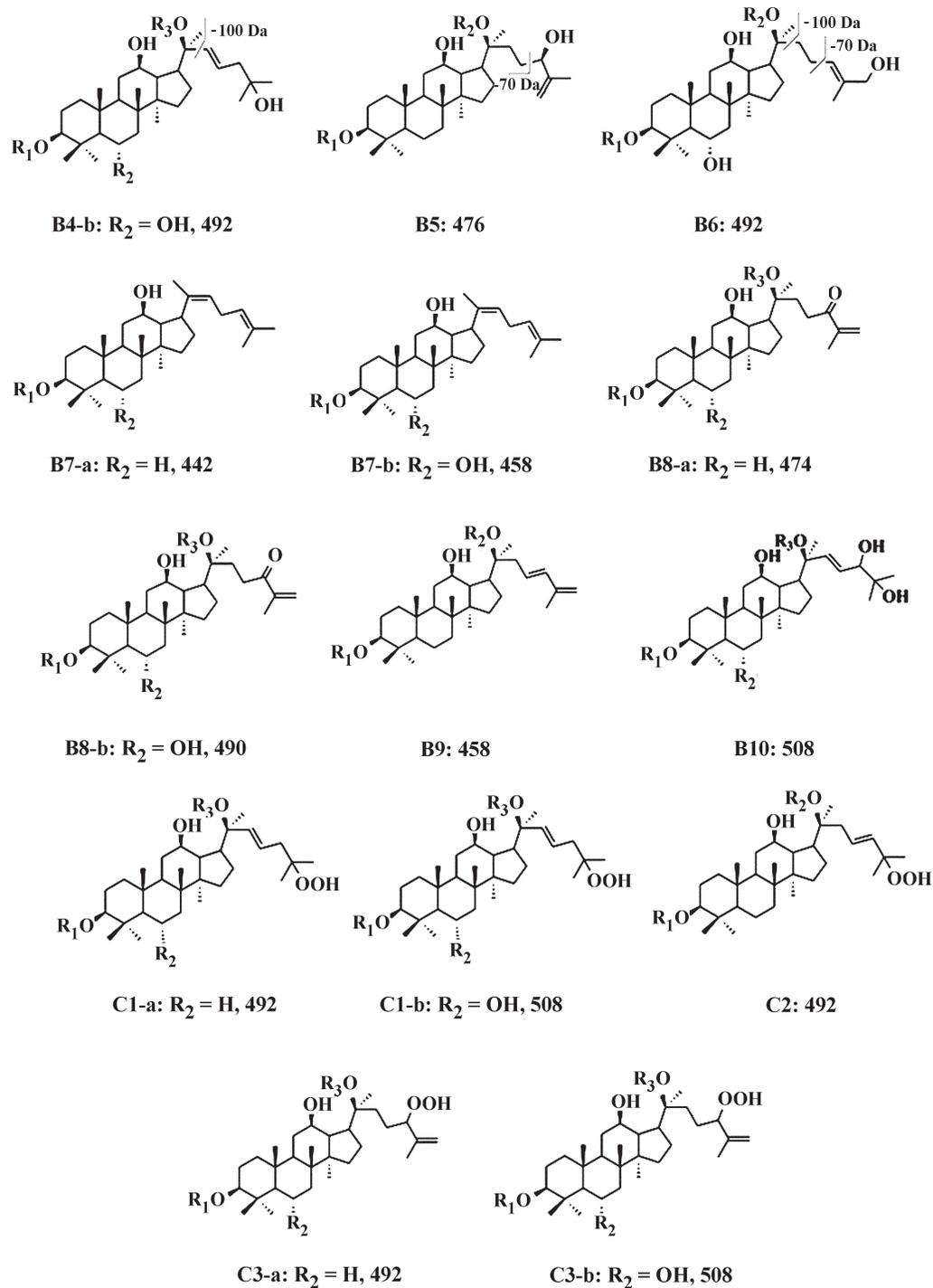


Рис. 1. (продолжение). Структуры составных частей молекул гинсенозидов

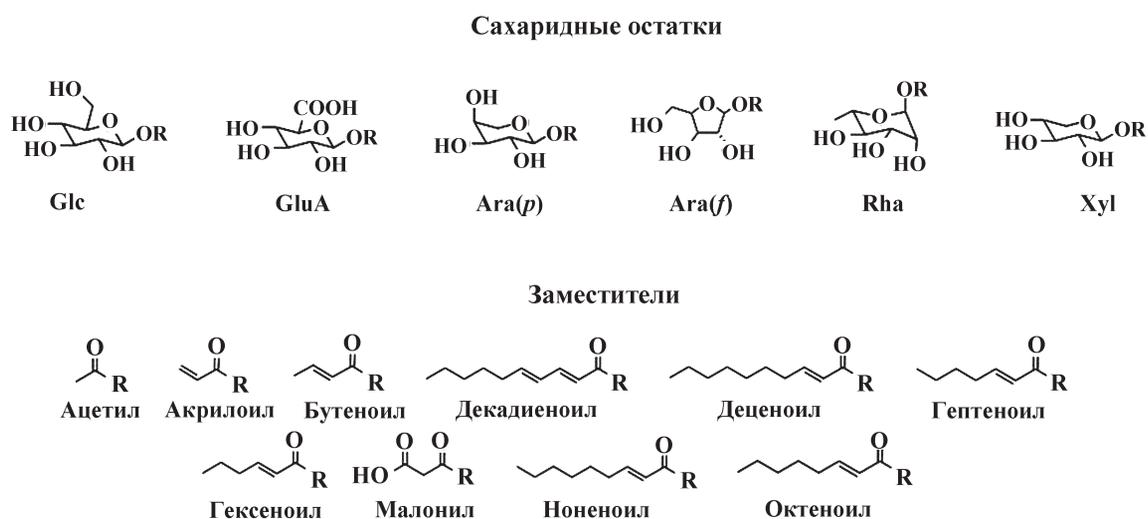


Рис. 1. (окончание). Структуры составных частей молекул гинсенозидов

P. ginseng на гинсенозидный состав получаемого продукта (красный и белый женьшень). В последние 30 лет наиболее популярным методом определения гинсенозидов стала высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Вне зависимости от метода детектирования безэталоновый анализ гинсенозидов трудно выполнить из-за обширных возможностей их изомерии. Помимо изомерии сапогенина и заместителей в молекулах большинства гинсенозидов присутствует хиральный атом углерода C20, 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 разных объектах. Цель данного обзора – выделить основные достижения и тенденции в современном анализе гинсенозидов.

Виды женьшеня

Panax ginseng (азиатский женьшень, известный также как китайский или корейский женьшень; семейство Araliaceae) – растение, обладающее большим лечебным потенциалом. Этот вид произрастает на высокогорьях Маньчжурии (область между Китаем и Кореей). Куст *Panax ginseng* достигает порядка 50 см в высоту, крона состоит из темно-зеленых вертикальных листьев и небольших зеленых цветов,

развивающихся в яркие красные ягоды [13]. Большую часть сырого растительного материала получают в Южной Корее, где женьшень выращивают под соломенными тентами. Когда возраст растения достигает 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 высушиванием на солнце получается красный женьшень с гладкой поверхностью.

P. quinquefolium (американский женьшень), менее крупный по сравнению с азиатским, использовался коренными жителями Америки для лечения разных заболеваний. В данный момент его производство в США, Канаде и северо-восточном Китае составляет более 1000 т сухого корня в год.

P. japonicus (японский женьшень) японские врачи часто используют в лечебных целях, однако этот вид содержит меньше активных ингредиентов (гинсенозидов), чем *P. ginseng*.

P. notoginseng F. H. Chen (нотоженьшень или *san qi*) также хорошо известен и используется в китайской ТМ. Он эффективен при лечении гомеостаза, питает кровь и лечит коронарный тромбоз [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 головной боли, кашля, несварения и других заболеваний.

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

В силу широкого применения женьшеня в медицине возникла необходимость аутентификации его видов. Для идентификации азиатского [15] и американского [16] видов женьшеня были выбраны гинсенозид Rf и 24(R)-псевдогинсенозид F11. Генетические подходы к аутентификации видов женьшеня, описанные в работе [17], включают такие методы, как анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК, а также ДНК-дактилоскопия 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 виды женьшеня.

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, за фармакологические свойства женьшеня отвечают 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 ядерного магнитного резонанса (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 номенклатура гинсенози-

дов основывалась на их подвижности на подложках для тонкослойной хроматографии (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-R₂-3-R₃, где S – сапогенин, а R₁, R₂ и R₃ – 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.

Стандартизованные экстракты из женьшеня коммерчески доступны [12], например, общедоступны экстракты 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]. Из экономических соображений данные вещества можно производить с использованием клеточных структур. Эти подходы хорошо описаны в [21].

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 метанола и воды 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 (50%) разложение гинсенозидов происходило уже через 5 ч экстракции метанолом в аппарате Сокслета, а для полного превращения

Т а б л и ц а 1

Сокращенные обозначения и формулы основных гинсенозидов

Гинсенозид (тривиальное название)	Обозначение	Формула
Ra1	PPD-20-Glc-Ara(p)-Xyl-3-Glc-Glc	$C_{58}H_{98}O_{25}$
Ra2	PPD-20-Glc-Ara(f)-Xyl-3-Glc-Glc	$C_{58}H_{98}O_{25}$
Ra3	PPD-20-Glc-Glc-Xyl-3-Glc-Glc	$C_{59}H_{100}O_{27}$
Rb1	PPD-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc	$C_{54}H_{92}O_{23}$
Rb2	PPD-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc	$C_{53}H_{90}O_{22}$
Rb3	PPD-20-Glc-Xyl-3-Glc-Glc	$C_{53}H_{90}O_{22}$
Rc	PPD-20-Glc-Ara(f)-3-Glc-Glc	$C_{53}H_{90}O_{22}$
Rd	PPD-20-Glc-3-Glc-Glc	$C_{48}H_{82}O_{18}$
Rg3	PPD-20-H-3-Glc-Glc	$C_{42}H_{72}O_{13}$
Rh2	PPD-20-H-3-Glc	$C_{34}H_{62}O_8$
Rs3	PPD-20-H-3-Glc-Glc-Ac	$C_{44}H_{74}O_{14}$
mRb1	PPD-20-Glc-Glc-3-Glc-Glc-Mal	$C_{57}H_{94}O_{26}$
mRb2	PPD-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc-Mal	$C_{56}H_{92}O_{25}$
mRc	PPD-20-Glc-Ara(f)-3-Glc-Glc-Mal	$C_{56}H_{92}O_{25}$
mRd	PPD-20-Glc-3-Glc-Glc-Mal	$C_{51}H_{84}O_{21}$
F2	PPD-20-Glc-3-Glc	$C_{42}H_{72}O_{13}$
Rs1	PPD-20-Glc-Ara(p)-3-Glc-Glc-Ac	$C_{55}H_{92}O_{23}$
Псевдо-RC1	PPD-20-Glc-3-Glc-Glc-Ac	$C_{50}H_{84}O_{19}$
Rb1	PPT-20-H-6-Glc-3-H	$C_{36}H_{62}O_9$
Rg1	PPT-20-Glc-6-Glc-3-H	$C_{42}H_{72}O_{14}$
Rf	PPT-20-H-6-Glc-Glc-3-H	$C_{42}H_{72}O_{14}$
Rg2	PPT-20-H-6-Glc-Rha-3-H	$C_{42}H_{72}O_{13}$
Re	PPT-20-Glc-6-Glc-Rha-3-H	$C_{48}H_{82}O_{18}$
F1	PPT-20-Glc-6-H-3-H	$C_{36}H_{62}O_9$
F3	PPT-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	OA-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	$C_{44}H_{72}O_{13}$

необходимо порядка 20 ч. Для одновременного выделения и определения ацилзамещенных и незамещенных гинсенозидов в корнях растения *P. ginseng* предложен метод последовательной ультразвуковой экстракции (15 мин) смесью этанол:вода (40:60) при перемешивании в течение 4 ч с последующим определением методом ВЭЖХ с испарительным детектированием по светорассеянию (ИДСР) [28]. Для экстракции гинсенозидов в исследовательских целях вместо метанола можно использовать *n*-бутанол [32].

Проведено сравнение четырех методов экстракции (А, Б, В, Г) по степени извлечения для шести наиболее распространенных гинсенозидов (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re и Rg1) из корней *P. quinquefolius* [33].

Метод А. Ультразвуковая экстракция метанолом при комнатной температуре.

Метод Б. Экстракция 70%-м метанолом при комнатной температуре.

Метод В. Экстракция водой при 90°C без перемешивания.

Метод Г. Перемешивание при 60°C в метаноле.

Полученные образцы отфильтровывали и анализировали методом ВЭЖХ с детектированием в УФ-области. 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 видов женьшеня, проверяя содержание гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Re, Rg1 и Rd [29, 30]. Экстракция смесью метанол:вода (30:70) при 50°C в течение 30 мин оказалась менее эффективной, чем ультразвуковая экстракция [30]. Разработаны специальные методы экстракции аналитов из гелей, жидких экстрактов, таблеток и каплет (овальных таблеток, покрытых оболочкой) [30]. Показано [34], что ультразвуковая экстракция сапонинов из корней женьшеня эффективнее экстракции в аппарате Сокслета. Кроме валового содержания продуктов экстракции, было определено количество каждого извлеченного гинсенозида (Rb1, Rb2, Rc, Rd и Rf) при использовании ультразвуковой бани и ультразвукового экстрактора. Проанализированы образцы американского, китайского и корейского видов красного женьшеня, а также суспензии гинсенозидов в клеточных культурах. В большинстве случаев ультразвуковую экстракцию проводили при меньших температурах, что позволило избежать разложения термически нестойких ингредиентов растительного сырья. То, что температу-

ра 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 североамериканского женьшеня, они образуются в результате термообработки при экстракции из гинсенозидов Rb1 и Rc, присутствующих в больших количествах [35]. В [35] приведены детально разобранные масс-спектральные данные компонентов экстрактов из корней и листьев, полученные с применением ионизации электрораспылением (ИЭР) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Также не следует забывать об артефактах, таких как формирование искусственных метаболитов, например, сапогенинов протопанаксадиола и протопанаксатриола при кислотном гидролизе [4].

Микроволновая экстракция гинсенозидов Rg1 и Rb1 в течение 15 мин оказалась более эффективной, чем десятичасовая последовательная экстракция тем же объемом растворителя [36]. Оптимизированы состав экстрагента (смесь воды и метанола), 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 микроволновый экстрактор (300 Вт) с частотой излучения 2450 МГц использовали для экстракции при 72°C (4 повтора по 30 с). Эффективность извлечения Rb1, Rb2, Rc, Rd и Rg1 была сравнима с выходами при двенадцатичасовой экстракции растворителем того же состава (80%-й метанол) и при той же температуре.

Теоретически сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) позволяет сэкономить время экстракции и расход органического растворителя, а также использовать меньшие значения таких параметров, как концентрация и температура [38]. Проведено сравнение эффективности суб- и сверхкритической экстракции из корней женьшеня гинсенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 и природных масел диоксидом углерода в аппарате Сокслета и ультразвуковой бане [39]. Доказано, что СФЭ диоксидом углерода с добавкой 6 мол.% этанола дает лучшие результаты, чем СФЭ чистым диоксидом углерода. Необходимо заметить, что чистый диоксид углерода имеет небольшой дипольный момент и поэтому плохо подходит для извлечения полярных метаболитов. Эффективность экстракции диоксидом углерода (660 л с добавкой 6 мол.%

этанол) при 31,2 МПа и 333 К оказалась такой же, как при экстракции горячей водой, но ниже, чем при экстракции 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 при экстракции гинсенозидов. ПАВ Triton X-100 с концентрацией, большей критической концентрации мицеллообразования (ККМ), 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 для экстракции гинсенозидов в работе [42]. Все экспериментальные факторы процесса мицеллярной экстракции для исследуемых веществ были оптимизированы. 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, 78°C). Недостатком такого подхода является относительно высокая концентрация ПАВ при дальнейшем попадании раствора в ВЭЖХ-систему, что приводит к увеличению времени регенерации хроматографической колонки.

Иногда для извлечения гинсенозидов используют экстракцию с применением ионных жидкостей. Разработан способ ультразвуковой экстракции с применением ионных жидкостей на основе 1-алкил-3-метилимидазола с разным 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. Хотя в литературе подобные примеры редко встречаются, однако в некоторых случаях использование этого метода приносит положительные результаты. Так, например, в работе [44] для выделения 13 гинсенозидов (Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rk1, Rg5, Rg6, F4) из красного женьшеня использовали вышеуказанную методику с применением смесей хлористого метилена с метанолом и изопропанолом в разных соотношениях. Из образцов белого женьшеня было выделено 8 гинсенозидов (Rg1, Re, Rf, Rh1, Rb1, Rb2, Rc и Rd).

Определение целевых аналитов

Отдельные гинсенозиды могут быть идентифицированы методом ТСХ, например, с использованием смеси *n*-бутанол:этилацетат:вода (4:1:5) в качестве элюента. Гинсенозиды образуют коричневые пятна при опрыскивании смесью серной кислоты и воды (1:1) 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 хлороформ:метанол:этилацетат:вода:гексан (20:22:60:8:4) в качестве подвижной фазы. Результаты анализов методами ТСХ, ВЭТСХ и СССРХ показали, что главное отличие заключалось в разрешении определяемых соединений. Проточный вариант СССРХ оказался наиболее чувствительным методом для определения гинсенозидов.

Однако наибольшее распространение при решении задачи определения выбранного набора гинсенозидов получил метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Так, например, для определения гинсенозидов Rg1 и Rb1 в плазме крови человека разработан способ, основанный на ВЭЖХ–ИЭР–МС [46]. Разделение гинсенозидов проводили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (колонка с сорбентом C18; 100×2,1 мм), МС-детектирование осуществляли в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Проводили количественную оценку содержания этих гинсенозидов, используя ионы с *m/z*, равным 1107,6; 799,4 и 385,2 соответственно для Rb1, Rg1 и внутреннего стандарта (3',4',5'-триметокси-7-карбометокси флавонол). Диапазон линейности для данных соединений составил два порядка (от 10 до 1000 нг/мл), а соответствующая минимальная определяемая концентрация – 10 нг/мл плазмы.

Для очистки образцов от белковой фазы использовали сульфат цинка и ацетонитрил. Данный подход успешно применили в фармакокинетическом исследовании гинсенозидов Rb1 и Rg1, определяя их в плазме крови человека после орального приема коммерческих препаратов на основе женьшеня. Другим примером применения этого метода является одновременное определение гинсенозида Rg3 и его метаболитов: гинсенозидов Rg1, Rg2, F1, Rh1 и протопанаксатриола в моче испытуемых [47]. Пробоподготовка образцов мочи включала сорбционное концентрирование, разделение проводили в градиентном режиме с использованием смеси метанола и ацетонитрила с добавкой 0,05%-й муравьиной кислоты. Диапазон линейности составлял от 0,05 до 20 нг/мл. Не удалось обнаружить только гинсенозид Rg2, остальные метаболиты в образцах мочи присутствовали. В искусственных условиях показано [48], что гинсенозид Rh2 и протопанаксадиол являются продуктами гидролиза гинсенозида Rg3. Для установления этого факта 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. Однозарядный ион депротонированной молекулы глюкозы с m/z 161 присутствовал в масс-спектрах как 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 (протопанаксатриола) в плазме крови крыс при изучении фармакокинетического поведения Rg1 после его введения в кишечник и внутривенного введения [49]. После сорбционного концентрирования и ВЭЖХ-разделения в масс-спектрах образцов присутствовали ионы молекулярных аддуктов гинсенозидов Rg1, Rh1 и протопанаксатриола с хлором $[M+Cl]^-$, они использованы в дальнейшем при регистрации выбранных ионов. Пределы обнаружения (ПО) для Rg1, Rh1 и протопанаксатриола составляли 20, 100 и 10 пг/г соответственно. 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 [50]. После аттестации методики авторы установили, что при оральном введении определяемых веществ в дозе 20 мг/кг в плазме крови их обнаружить не удастся, однако при внутривенном

введении 5 мг/кг их присутствие в плазме крови значительно. ПО находился на уровне 10 нг/мл.

Метод ВЭЖХ–МС/МС использовали для определения гинсенозида Re и его метаболитов в экскрементах крыс [51]. Для детектирования выбраны следующие ионные переходы m/z : 945→475 (Re), 799→637 (Rg1), 783→475 (Rg2), 637→475 (Rh1 и F1) 475→391 (протопанаксатриол) и 779→641 (внутренний стандарт – дигоксин). 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.

ВЭЖХ-определение гинсенозидов также можно проводить с флуоресцентным детектированием. Так, флуоресцирующие аналиты получены в работе [52] после предколлонной дериватизации двойной связи C24–C25 в молекулах гинсенозидов путем озонлиза с последующей реакцией с 9-фторметоксикарбониллом гидразина. При использовании ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием ПО для Rg1 и Rb1 составило 2,5 и 0,9 пмоль/л соответственно. После добавки в сыворотку этих соединений проведен количественный анализ; степень извлечения после сорбционного концентрирования составляла 72–80%.

Альтернативой методам УФ, ИДСР и МС может также служить импульсное амперометрическое детектирование, которое успешно сочетается с ВЭЖХ [53]. В этом случае ПО составляет 0,02–0,10 нг/г. Кроме того, данным способом можно легко определить суммарное содержание гинсенозидов. Полярные и неполярные гинсенозиды разделяли на сорбенте с привитыми группами C18.

Способ количественной оценки содержания гинсенозидов создан на основе метода иммуноферментного анализа (ИФА) [54]. Гинсенозиды, разделенные с помощью смеси ацетонитрила воды и уксусной кислоты на полиэтилсульфоновой мембране, обрабатывали раствором иодида натрия, а затем альбумином из бычьей сыворотки (БСА). При этом на полиэтилсульфоновой мембране образуется конъюгат гинсенозид-БСА. Мембрану обрабатывали антителом (анти-G-Rb1) и еще одним антителом, меченным пероксидазой, для противодействия первому антителу.

Наконец, связанный фермент вступал в реакцию с пероксидазным субстратом. Это приводило к окрашиванию мембраны, что, в свою очередь, позволяло провести количественный анализ по степени окрашенности областей мембраны. Предел одновременного индивидуального обнаружения гинсенозидов Rb1, Rc и Rd находился на уровне 60 нг/г. Диапазон определяемых содержаний для этих трех соединений составлял от 0,125 до 2,0 мкг/г.

Чувствительный и селективный метод с использованием связанного фермента на иммуносорбенте разработан для определения 20(S)-протопанаксатриола – одного из основных сапогенинов гинсенозидов [55]. Антитела, действующие против конъюгата гинсенозид F1-альбумин, продемонстрировали практически полное отсутствие реакции на другие гинсенозиды и протопанаксациол. Рабочий интервал концентраций (от 50 пг/мл до 20 нг/мл) и количественная оценка совпали со сделанными методом ВЭЖХ.

Идентификация, или подтверждение идентичности аналита – первый и важнейший шаг для создания метода количественного анализа. Такую информацию можно получить на ионной ловушке или тандемном масс-спектрометре. 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 [56]. Предложенный авторами паттерн фрагментации молекул гинсенозидов часто используется другими исследователями в этой области (рис. 2). В ячейке соударений первое расщепление связей наблюдается при атоме C20, если там находится сахаридный заместитель, который и обозначают как α -цепь. Позиции C3 и C6 оказались местом присоединения β -цепей. Буквами Y и Z обозначены ионы с зарядом непосредственно на основной структуре гинсенозида, а буквами B и C – ионы дополняющие соответственно Y и Z. Ион Y получается в результате потери гескозы или дезоксигескозы, а ион Z – при полной потере сахараида. Фрагментные ионы A- и X-типа получают при расщеплении сахаридного остатка, напрямую присоединенного к сапогенину.

С учетом этой схемы фрагментации успешно проведено изучение структур гинсенозидов Rb1 и Rb2 с помощью ИЭР-МСⁿ (на ионной ловушке) [57]. В положительном режиме регистрации ионов наи-

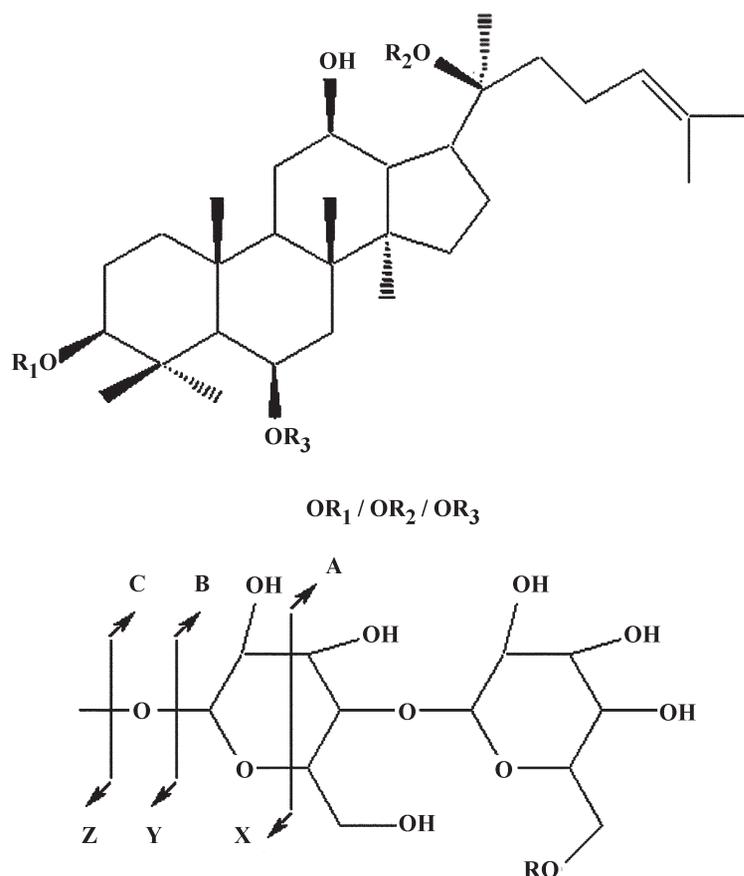


Рис. 2. Номенклатура фрагментов молекул гинсенозидов

более интенсивными оказались аддукты сапонинов $[M+Na]^+$, дающие фрагментные ионы (Y-, Z-, B- и C-типа), что позволяет получить информацию об основной последовательности и ответвлениях в случае заместителей-моносахаридов, объединенных в олигосахаридные цепочки. Ионы A- и X-типа дают информацию о связях внутри сахаридных остатков. В отрицательном режиме регистрации ионов наиболее интенсивны молекулярные ионы $[M-H]^-$, которые дают только небольшое число ионов Y- или B-типа и не дают ионов A- и X-типа из-за внутренней энергии ионов предшественников $[M-H]^-$. Этот подход может быть использован для определения структуры недегидратированных гинсенозидов в экстрактах из лечебных трав, что позволяет не проводить трудоемкой дериватизации сапонинов для их полного разделения [58]. Используя ИЭР-МС/МС, удалось различить и идентифицировать три пары изомерных гинсенозидов (Rg2 и Rg3, Rg1 и F11, Rd и Re) благодаря точному измерению массы 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 (соответствующие потере сахаридов), а также ионы C (ионы сахаридных заместителей). Детектирование и интерпретация Z- и C-ионов позволяли 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 , равным 333 и 349 соответственно, что свидетельствовало о присутствии двух видов дисахаридных заместителей (т.е. глюкозо-рамнозного и глюкозо-глюкозного). Исследование метаболизма гинсенозидов проводят также с помощью квадруполь-времяпролетных систем. Так, основные метаболиты нотогинсенозида R1, гинсенозидов Rg1, Rb1 и Rd выделены из желчи крыс с помощью процедуры микродиализа [59]. Эти метаболиты, гинсенозиды Rg2, Rh2 и компонент K, детектировали на квадруполь-времяпролетном масс-анализаторе с помощью динамического варьирования энергии фрагментации.

Групповая идентификация и определение метаболитических профилей

Концепция групповой идентификации гинсенозидов изложена в работе [60] и использована с незначительными изменениями многими исследователями [39, 41, 61]. Этот метод основан на ВЭЖХ (колонка C18, подвижная фаза – вода:ацетонитрил, режим градиентного элюирования, УФ-детектирование при

203 нм). Данный метод позволяет разделить гинсенозиды Rg1, Rf, Re, Rd, Rc, Rb2 и Rb1 по порядку элюирования. Также описан улучшенный метод анализа для определения 12 гинсенозидов [62], 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 определения содержания сапонинов в ягодах женьшеня до и после термообработки [63]. После паровой обработки (1 ч при 100–120°; 0,5–4 ч при 120°С) 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 сильное влияние на рост колоректальных раковых клеток. ВЭЖХ с диодноматричным детектированием (ДМД) использовали для одновременного определения гинсенозидов и полиацетиленов в корнях американского женьшеня [64]. Гинсенозиды Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Ro, малонил-Rb1, малонил-Rc и малонил-Rd и полиацетилены фалкаринол и панаксадиол были разделены. Этот метод использовали для определения содержания полиацетиленов и гинсенозидов в корневых отростках, боковых и основных корнях шестилетнего растения женьшеня. Общее среднее содержание гинсенозидов и полиацетиленов в корневых отростках оказалось значительно выше, чем в основном корне. Применяя градиентное элюирование смесью ацетонитрила воды и изопропанола 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, ПО составил 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 [65], подвижная фаза – 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 присутствовали сигналы квазимолекул

лярного иона $[M-H]^-$, и его аддуктов $[M+AcO]^-$ и $[M-CH_2O+AcO]^-$, а также сильные сигналы двухзарядных аддуктов, например $[M-H+AcO]^{2-}$ и $[M+2AcO]^{2-}$. Спектры малонил-замещенных гинсенозидов из-за термической нестабильности содержали помимо $[M-H]^-$ 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 [66] даны значения относительной интенсивности ионов $[M-H]^-/I[M+OAc]^-$, $I[M-2H]^{2-}/I[M-H+2OAc]^{2-}$, $I[M-H+OAc]^{2-}/I[M+OAc]^{2-}$ и показано, как их различие связано 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 видов женьшеня [67]. Разработанный способ подходил для разделения и одновременно определения основных найденных гинсенозидов в охлажденных льдом спиртовых экстрактах. Этот способ также подходит для обнаружения других соединений, часто встречающихся в экстрактах из корня женьшеня. Более того, данный метод можно применять для разделения и определения продуктов гидролиза гинсенозидов, например образующихся в условиях, при которых происходит пищеварение (0,1 М соляная кислота при 37°C).

Для проведения контроля качества обычно используется метод ВЭЖХ-МС/МС. Например, при анализе препарата «Shenmai»* [68] с помощью ВЭЖХ-МС обнаружено 39 гинсенозидов, содержащихся в этом лекарственном средстве. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов большинство найденных гинсенозидов, кроме малонил-гинсенозидов, дают масс-спектр, содержащий молекулярные ионы $[M-H]^-$, а также ионы аддуктов $[M+Cl]^-$ и $[M+AcO]^-$. Иногда появляются сигналы ионов $[2M-H]^-$. Термически нестабильные малонил-гинсенозиды дают ионы $[M-CO_2-H]^-$ и $[M-CO_2+Cl]^-$ (несмотря на то, что авторы не использовали хлоридсодержащих растворителей). Некоторые соединения с одинаковой молекулярной массой удалось идентифицировать, основываясь на характеристичных сигналах, соот-

ветствующих потере глюкозы и рамнозы, в МС/МС-спектрах.

Другой препарат ТМ, «отвар *Sijunzi*», изготавливают из корней *P. ginseng*, *Poria cocos*, *Attractylodes 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*) [69]. Гинсенозиды давали аддукт с натрием в масс-спектрах. Потеря нейтральных масс 194 и 176 оказалась характерной особенностью тритерпеноидных МС/МС-спектров. Соотношение концентраций основных активных компонентов растительного сырья (отдельно *Panax ginseng* и *G. uralensis*) отличается от этого показателя для «отвара *Sijunzi*». Это свидетельствует о том, что процесс варки влияет на состав конечного продукта.

Кроме ИЭР некоторые исследователи использовали химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД), которая считается подходящим методом ионизации для слабополярных и стабильных веществ. ХИАД лучше, чем ИЭР, совместима с жидкостной обращенно-фазовой хроматографией, поскольку предполагает использование больших скоростей потоков подвижной фазы. Кроме того, ХИАД предполагает использование испарения при высокой температуре, что способствует лучшему МС-детектированию лабильных гинсенозидов. Методом ВЭЖХ-ХИАД удалось успешно идентифицировать 35 гинсенозидов в *P. ginseng* [70]. Этот метод позволил одновременно определить 10 основных биологически активных компонентов *Naodesheng*, включая сафлоровый 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%-й муравьиной кислоты и метанола. Наименьшие определяемые концентрации лежали в диапазоне от 0,02 до 0,2 нг/г [71].

Новая стратегия групповой идентификации гинсенозидов в растительном сырье предложена в работе [8]. Из растений *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* 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

*Shenmai – популярное медицинское средство в ТМ, используемое для лечения кардиомиопатии, инфаркта миокарда и гипертонии, изготавливается из красного женьшеня и офиопогона.

фазами на гелевой основе и силикагелевой матрице. Детектирование проводили методом МСⁿ на ионной ловушке масс-анализатора. Подтверждение предложенных структур гинсенозидов получали методами МС высокого разрешения и ЯМР.

Таким образом, растительные материалы, лекарственные средства, чай и другие продукты на основе женьшеня содержат большое число близких по структуре активных компонентов (гинсенозидов). Фрагмен-

тация этих веществ как в положительном, так и в отрицательном режимах регистрации сигналов достаточно хорошо изучена. Применяя методы масс-спектрометрии высокого разрешения и информационно-зависимого сканирования на ионной ловушке, можно дифференцировать некоторые изомерные гинсенозиды. В течение одного анализа (около 60 мин) на гибридной линейной ионной ловушке были получены масс-спектры 16 различных гинсенозидов (рис. 3) [72], присутствующих в

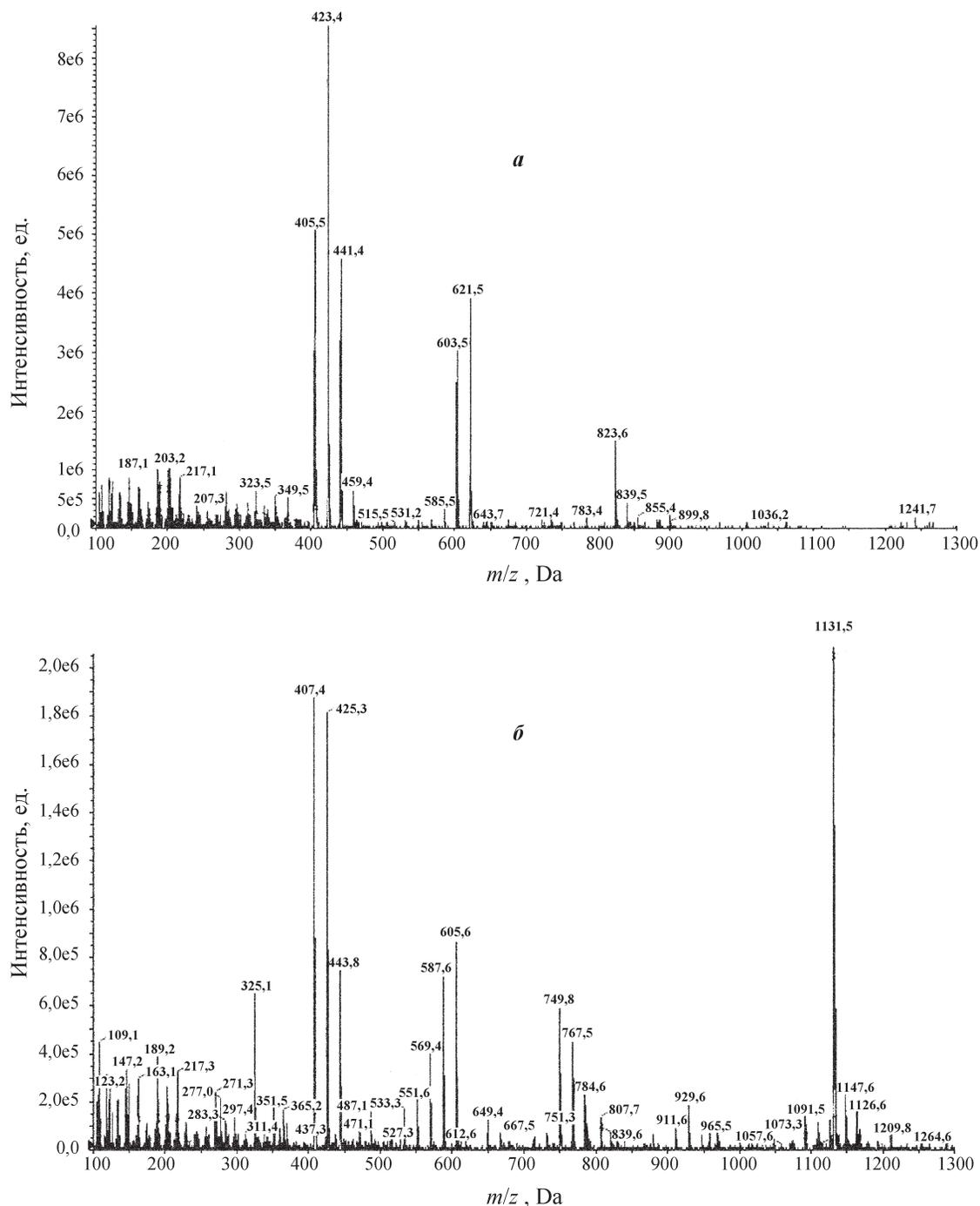


Рис. 3. Масс-спектры гинсенозидов Rg1 (а) и Rb1 (б), полученные в режиме сканирования на гибридной линейной ионной ловушке [72]

корейском женьшеневом чае. Предложенный способ ВЭЖХ-разделения и МС-сканирования универсален, и его можно использовать как для анализа растительных экстрактов, так и для анализа чаев, фитопродуктов, биодобавок и лекарственных средств на основе женьшеня. Так как традиционный процесс обработки корня женьшеня не предполагает полного разрушения молекул гинсенозидов, более того, даже при попадании в живой организм эти вещества дают метаболиты, не сильно отличающиеся по структуре от исходных гинсенозидов (см. раздел «Определение целевых аналитов»), такой способ быстрого сканирования можно использовать и для анализа биологических образцов с соответствующей пробоподготовкой. При этом данный способ детектирования стабилен в широком диапазоне концентраций, и его можно применять для количественного анализа, например, для решения задач сравнения качества образцов. Правильность идентификации аналитов подтверждается при интерпретации большого числа сигналов в масс-спектре [72], что позволяет использовать данный подход в качестве референтного.

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 методы ЯМР и ВЭЖХ–МС наиболее часто используются для получения характеристических метаболомных профилей. ЯМР используют особенно часто для идентификации метаболитов в клинических образцах [73], так как данный метод позволяет одновременно определять все соединения, содержащие протон. 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, несмотря на перекрывание большинства сигналов метаболитов, присутствующих в растворе. Однако в сфере изучения метаболомики наибольшее значение имеют способы анализа ВЭЖХ–МС. 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 первостепенное значение имеет

определение элементного состава метаболита. Такое определение можно сделать, основываясь только на данных высокой точности о массе метаболита (масса должна быть определена с точностью до 5 миллионных долей от теоретической). 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 проводить с привязкой к хроматографической шкале времени и без внутренней калибровки [74]. Одно значение массы может соответствовать более чем одному гинсенозиду. Так, авторы работы [75] сообщают о 136 различных гинсенозидах, имеющих всего 62 уникальные комбинации элементов в своем составе. Точные молекулярные массы некоторых гинсенозидов приведены в табл. 2.

Для определения соединений с одинаковой молекулярной массой необходимо сначала провести процедуру разделения. Обычно используется комбинация высокоэффективного разделения и масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения при сочетании времяпролетных масс-спектрометров с нано-ВЭЖХ-системами. Так, в режиме регистрации положительно заряженных ионов проводили анализ экстрактов из женьшеня описанным выше способом [75]. Ширина некоторых пиков составляла менее 10 с, 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. Обнаружено 9 разных изомерных гинсенозидов с элементным составом $C_{42}H_{72}O_{14}$ (точная масса 800,4922). Успешно разделить удалось лишь пять из них, каждый из изомеров давал в спектре характерное изотопное расщепление молекулярного иона. По сравнению со способом прямого введения пробы в спектрах пиков на хроматограмме интенсивность натриевых аддуктов была ниже и составляла порядка нескольких процентов от интенсивности протонированного молекулярного иона. Сделав поправку на образование аддуктов, авторы работы оценили общее число обнаруженных метаболитов в несколько сотен, построив соответствующую карту интенсивности. Использование

Т а б л и ц а 2

Точные молекулярные массы гинсенозидов и их основных ионов в положительном и отрицательном режимах 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
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

двумерной технологии высокого разрешения позволило получить очень малые и хорошо различимые точки на этой карте, плотность расположения этих точек достаточно 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.

Альтернативные подходы к определению

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 гинсенозидов 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. quinquefolium* [76]. 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 отрезков 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. 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 виде женьшеня. Кроме того, спектроскопию отражения в ближней инфракрасной области с успехом применяли для оценки суммарного содержания сахара в китайском виде женьшеня [77]. 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.

Для оценки содержания полиацетиленов в корнях американского женьшеня также использовали рамановскую спектроскопию [78]. 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 $\sim 2258\text{ см}^{-1}$. 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 романовской 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 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 [79]. 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, а также американскому и азиатскому видам женьшеня [80]. Спектроскопический анализ проводили напрямую с использованием порошка высушенного корня, в результате был получен характеристический интервал между 2000 и 600 см^{-1} , что и предлагалось использовать для определения различия между женьшенем и опилками, а также между американским и азиатским видами женьшеня.

Выводы и перспективы

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 его простотой, доступностью и распространенностью в аналитических лабораториях. Однако из-за слабого УФ-поглощения гинсенозидов детектирова-

ние приходится осуществлять при 200–205 нм, что приводит к высокому значению фонового сигнала и шума, а следовательно, и к низкой чувствительности. Хорошей альтернативой методу ВЭЖХ–УФ считается метод ВЭЖХ–ИДСР, позволяющий получать хроматограммы со стабильной базовой линией и расширить круг используемых растворителей для лучшего хроматографического разделения. Недостатком как УФ-, так и ИДСР-метода 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, этот метод позволяет определить величину молекулярной массы, последовательность сахаридных заместителей и величину массы 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 для изучения фармакокинетики и метаболомики. 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. Этот метод характеризуется хорошей чувствительностью и воспроизводимостью, сравнимыми с ВЭЖХ. Кроме того, он 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, определенных с помощью подходящего референтного метода.

В литературе описано большое разнообразие гинсенозидов, присутствующих в разной пропорции в растительном сырье и продуктах на его основе. Это разнообразие даже для одного вида женьшеня можно объяснить разными природными условиями в местах обитания растений (вид почвы, климат, географическое положение), а также разными способами их первичной обработки. Однако такие отклонения могут быть минимизированы при введении систем стандартизованных способов культивации и обработки. Более того, получаемые исследователями результаты могут зависеть от способов пробоподготовки, экстракции, методов анализа и интерпретации данных. В большинстве научных работ не рассматривают малонилпроизводные гинсенозидов, присутствие которых обнаружено на уровне 60% от общего количества.

Препараты на основе женьшеня – одни из самых продаваемых средств ТМ в мире, поэтому следует на уровне национальных властей узаконить общие правила анализа таких продуктов для обеспечения их надлежащего качества. Первые шаги в этом направлении сделаны в США и Европе, где недавно выпущены монографии, посвященные растительному сырью и экстрактам из *P. ginseng* (USP и Ph. Eur.) и *P. quinquefolius* (USP). Однако единообразие спецификаций производства таких препаратов, а также 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 исследований метаболома, в целях контроля качества препаратов на основе женьшеня. Такие технологии позволят не только обезопасить применение средств ТМ, но также выявить и изучить пути метаболизма и биологического действия гинсенозидов в живом организме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dharmananda S. // HerbalGram. 2002. **54**. P. 34.
2. European Scientific Cooperative on Phytoterapy. Exeter. 2003.
3. Kiefer D., Pantuso T. // Am. Family Phys. 2003. **68**. N 8. P. 1539.
4. Sticher O. // Chemtech. 1998. **28**. N 4. P. 26.
5. Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker H. // Brit. J. Nutr. 2002. **88**. N 6. P. 587.
6. Kang J.H., Song K.H., Woo J.K., Park M.H., Rhee M.H., Choi C., Oh S.H. // Plant Foods Hum. Nutr. 2011. **66**. N 3. P. 298.
7. Nag S.A., Qin J.-J., Wang W., Wang M.-H., Wang H., Zhang R. // Front. Pharmacol. 2012. **3**. P. 25.

8. Yang W.-Z., Ye M., Qiao X., Liu C.-F., Miao W.-J., Bo T., Tao H.-Y., Guo D.-A. // *Analyt. Chim. Acta*. 2012. **739**. P. 56.
9. Kitagawa I., Taniyama T., Yoshikawa M., Ikennishi Y., Nakagawa Y. // *Chem. Pharm. Bull.* 1989. **37**. N 11. P. 2961.
10. Fuzzati N. // *J. Chromatogr. B*. 2004. **812**. N 1–2. P. 119.
11. Zhang J., Zhou F., Niu F., Lu M., Wu X., Sun J., Wang G. // *PLoS One*. 2012. **7**. N 4. P. 35768.
12. Leung K.W., Wong A.S.-T. // *Chinese Medicine*. 2010. **5**. P. 20.
13. Xiao G. *Modern Chinese Materia Medica*. Beijing, 2002.
14. Jia W., Gao W.Y. // *J. Plant Biotechnol.* 2003. **5**. P. 7.
15. Chan T.W., But P.P.-H., Cheng S.W., Kwok, I.M., Law, F.W., Xu H.X. // *Anal. Chem.* 2000. **72**. N 6. P. 1281.
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. // *Anal. Chem.* 2000. **72**. N 21. P. 5417.
17. Hon C.C., Chow Y.C., Zeng F.Y., Leung F.C.C. // *Acta Pharm. Sin.* 2003. **24**. N 9. P. 841.
18. Cutler S.J., Cutler H.G. *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*. N.Y., 2000.
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. // *HerbalGram*. 2001. **52**. P. 31.
20. Chang T.K.H., Chen J., Benetton S.A. // *Drug Metab. Dispos.* 2002. **30**. N 4. P. 378.
21. Wu J., Zhong J.J. // *J. Biotechnol.* 1999. **68**. N 2–3. P. 89.
22. Anderson M.L., Burney D.P. // *J. AOAC Int.* 1998. **81**. N 5. P. 1005.
23. Park M.K., Park J.H., Han S.B., Shin Y.G., Park I.H. // *J. Chromatogr. A*. 1996. **736**. N 1–2. P. 77.
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. // *J. Nat. Prod.* 2000. **63**. N 12. P. 1702.
25. Kwon S.W., Han S.B., Park I.H., Kim J.M., Park M.K., Park J.H. // *J. Chromatogr. A*. 2001. **921**. N 2. P. 335–339.
26. Harkey M.R., Henderson G.L., Gershwin M.E., Stern J.S., Hackman R.M. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. **73**. N 6. P. 1101.
27. Court W.A., Hendel J.G., Elmi J. // *J. Chromatogr. A*. 1996. **755**. N 1. P. 11.
28. Fuzzati N., Gabetta B., Jayakar K., Pace R., Ramaschi G., Villa F. // *J. AOAC Int.* 2000. **83**. N 4. P. 820.
29. Li W., Fitzloff J.F. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2002. **25**. N 1. P. 29.
30. Li W., Fitzloff J.F. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2002. **25**. N 16. P. 2485.
31. Suh H.J., Shin K.S., Oh S.H., Yoon B.K. Processing of extraction from ginseng using high hydrostatic pressure extraction. Korea Patent 10–0970455. 2009.
32. Liu S., Zhong J.J. // *Process Biochem.* 1998. **33**. N 1. P. 69.
33. Corbit R.M., Ferreira J.F.S., Ebbs S.D., Murphy L.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. **53**. N 26. P. 9867.
34. Wu J., Lin L., Chau F.T. // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001. **8**. N 4. P. 347.
35. Popovich D.G., Kitts D.D. // *Phytochemistry*. 2004. **65**. N 3. P. 337.
36. Shu Y.Y., Ko M.Y., Chang Y.S. // *Microchem J.* 2002. **74**. N 2. P. 131.
37. Kwon J.-H., Belanger J.M.R., Pare J.R.J., Yaylayan V.A. // *Food Res. Int.* 2003. **36**. N 5. P. 491.
38. Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Karim A.A., Abbas K.A., Norulaini N.A.N., et al. // *J. Food Eng.* 2009. **95**. N 2. P. 240.
39. Wang H.C., Chen C.R., Chang C.M.J. // *Food Chem.* 2001. **72**. N 4. P. 505.
40. Wood J.A., Bernards M.A., Wan W.K., Charpentier P.A. // *J. Supercrit. Fluid.* 2006. **39**. N 1. P. 40.
41. Choi M.P.K., Chan K.K.C., Leung H.W., Huie C.W. // *J. Chromatogr. A*. 2003. **983**. N 1–2. P. 153.
42. Fang Q., Yeung H.W., Leung H.W., Huie C.W. // *J. Chromatogr. A*. 2000. **904**. N 1. P. 47.
43. Lin H., Zhang Y., Han M., Yang L. // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013. **20**. N 2. P. 680.
44. Shehzad O., Kim H.P., Kim Y.S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. DOI 10.1007/s00216-012-6609-z.
45. Ludwiczuk A., Nyireddy S., Wolski T. // *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*. 2005. **18**. N 102. P. 104.
46. Ji H.Y., Lee H.W., Kim H.K., Kim H.H., Chang S.G., Sohn D.H., Kim J., Lee H.S. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. **35**. N 1. P. 207.
47. Liu L., Huang J., Hu X., Li K., Sun C. // *J. of Chromatogr. B*. 2011. **879**. N 22. P. 2011.
48. Bae E.A., Han M.J., Kim E.J., Kim D.H. // *Arch. Pharm. Res.* 2004. **27**. N 1. P. 61–67.
49. Sun J., Wang G.J., Xie H.T., Li H., Pan G.Y., Tucker I. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. **38**. N 1. P. 126.
50. Patel D.N., Lin H.S., Koh H.L. // *J. Mass Spectrom.* 2012. **47**. N 11. P. 1510.
51. Kim U., Park M.H., Kim D.H., Yoo H.H. // *Food Chem.* 2013. **136**. N 3–4. P. 1364.
52. Shangguan D.H., Han H., Zhao R., Zhao Y.X., Xiong S.X., Liu G.Q. // *J. Chromatogr. A*. 2000. **910**. N 2. P. 367.
53. Lee S.I., Kwon H.J., Lee Y.M., Lee J.H., Hong S.P. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. **60**. P. 80.
54. Morinaga O., Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y. // *Glycobiology*. 2005. **15**. N 10. P. 1061.
55. Jung D.W., Lee J.M., Sung C.K. // *Anal. Chim. Acta*. 2002. **462**. N 2. P. 157.
56. Perreault H., Costello C.E. // *Org. Mass Spectrom.* 1994. **29**. N 12. P. 720.
57. Liu S.Y., Cui M., Liu Z.Q., Song F.R., Mo W.J. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. **15**. N 2. P. 133.

58. Song F.R., Liu Z.Q., Liu S.Y., Cai Z.W. // Anal. Chim. Acta. 2005. **531**. N 1. P. 69.
59. 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. // J. Chromatogr. B. 2012. **895**. P. 162.
60. The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. Strasbourg. 2004.
61. Pan J.Y., Cheng Y.Y., Wang Y., Xiao X.Y., Lin R.C. // Chinese J. Anal. Chem. 2005. **33**. N 11. P. 1565.
62. Wang C.Z., Wu J.A., McEntee E., Yuan C.S. // J. Agric. Food Chem. 2006. **54**. N 6. P. 2261.
63. 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. // J. Agric. Food Chem. 2006. **54**. N 26. P. 9936.
64. Christensen L.P., Jensen M., Kidmose U. // J Agric Food Chem. 2006. **54**. N 24. P. 8995.
65. Fuzzati N., Gabetta B., Jayakar K., Pace R., Peterlongo F. // J. Chromatogr. A. 1999. **854**. N 1-2. P. 69.
66. Ng K.M., Che C.M., Wo S.K., Tam P.K.H., Lau A.S.Y. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. **20**. N 10. P. 1545.
67. Soley B.D., Lin Y.C.J., Ridgway D., Semple H.A., Tam Y.K., Coutts R.T., Lobenberg R., Tam-Zaman N. // J. AOAC Int. 2006. **89**. N 1. P. 16.
68. Zhang H.J., Wu Y.J., Cheng Y.Y. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. **31**. N 1. P. 175.
69. Liu Y., Yang J.S., Cai Z.W. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. **41**. N 5. P. 1642.
70. Ma X.Q., Liang X.M., Xu Q., Zhang X.Z., Xiao H.B. // Phytochem. Anal. 2005. **16**. N 3. P. 181.
71. Yu Z.G., Gao X.X., Zhao Y.L., Chen X.H., Bi K.S. // Chem. Pharm. Bull. 2006. **54**. N 4. P. 588.
72. Stavrianiidi A., Rodin I., Braun A., Shpigun O. // Biomed. Chromatogr. 2012. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.2857
73. Beckwith-Hall B.M., Holmes E., Lindon J.C., Gournarides J., Vickers A., Shapiro M., Nicholson J.K. // Chem. Res. Toxicol. 2002. **15**. N 9. P. 1136.
74. 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 // Advances in Mass Spectrometry. Amsterdam, 2004.
75. Buckingham J. Dictionary of Natural Products. Boca Raton, FL. 2003.
76. Ren G.X., Chen F. // J. Agric. Food Chem. 1999. **47**. N 7. P. 2771.
77. Lu Y.J., Qu Y.L., Cao Z.Q., Song M. // Spectrosc. Spectrom. Anal. 2006. **26**. P. 1457.
78. Baranska M., Schulz H., Christensen L.P. // J. Agric. Food Chem. 2006. **54**. N 10. P. 3629.
79. Campanella L., Bonanni A., Tomassetti M. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. **32**. N 4-5. P. 725.
80. Yap K.Y., Chan S.Y., Weng Chan Y., Sing Lim C. // Assay Drug Dev. Technol. 2005. **3**. N 6. P. 683.

Поступила в редакцию 15.01.13

MODERN APPROACHES FOR IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF GINSENOSES

I.A. Rodin, A.N. Stavrianiidi, A.V. Braun, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

Ginsenosides are the main bioactive compounds of the plants of *Panax* genus. Ginseng and its analogies are often use in the production of traditional medicine in China, Korea, Japan, USA and Russian Far East. For more than 40 years researchers have been developing methods of identification and determination of ginsenosides in plant materials, extracts and commercial products. For the purification of ginsenosides from plant materials different extraction techniques were used. Separation of ginsenosides has been achieved using gas chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). From the list of approaches HPLC prevailed. Spectrophotometric, fluorescence, and, recently, evaporative light scattering and mass-spectrometric detection were coupled with HPLC for the detection of ginsenosides. The most recent methods are here discussed together with a critical evaluation of the published results.

Key words: ginsenosides, *Panax ginseng*, HPLC, bioactive compounds.

Сведения об авторах: Родин Игорь Александрович – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; Ставрианиди Андрей Николаевич – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (*stavrianiidi.andrey@gmail.com*); Браун Аркадий Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ; Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, член-корр. РАН, докт. хим. наук.