

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЖЕНЬШЕНЯ, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В РЕСПУБЛИКЕ АЛТАЙ

А.И. Левашова*, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, М.С. Нестеров

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Женьшень — растение, применяемое в фитомедицине во всём мире, поскольку обладает широким спектром биологической активности, в первую очередь за счёт высокого содержания сапонинов (гинсенозидов). В настоящее время в Республике Алтай возрождается лекарственное растениеводство, в т. ч. культивирование женьшеня. Для производства фитопрепаратов требуется оценка качества сырья. На данный момент в литературе нет сведений о гинсенозидном составе и лечебных свойствах женьшеня, выращиваемого в Республике Алтай.

В данной работе впервые представлен анализ экстрактов корней женьшеня Алтая методом ВЭЖХ-времяпролётной масс-спектрометрии: определен профиль основных биологически активных веществ — гинсенозидов, проведено сравнение с профилем сапонинов китайского аналога. Обнаружено, что «алтайский» женьшень содержит 17 гинсенозидов, 12 из которых рекомендованы к определению институтом стандартов США (NIST), причём 7 основных гинсенозидов (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg и Rd) присутствуют в концентрациях 680–5375 мкг/г сырья. Гинсенозидные профили женьшеня, произрастающего на Алтае, и китайского образца сходны по качественному и количественному составу.

Установлено, что в корнях женьшеня содержится богатый состав гинсенозидов, присутствующих в высоких концентрациях. Следовательно, данное сырьё обладает значительным потенциалом для изготовления экстрактов и лекарственных средств на их основе для дальнейшего их применения в фитопрепаратах превентивной медицины РФ и для экспорта в другие страны.

Ключевые слова: женьшень Алтая, гинсенозиды, ВЭЖХ-МС, экстракция

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Левашова А.И., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Нестеров М.С. Идентификация компонентного состава женьшеня, культивируемого в Республике Алтай. *Биомедицина*. 2021;17(3E):106–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-106-113>

Поступила 24.05.2021

Принята после доработки 03.08.2021

Опубликована 20.10.2021

COMPOSITIONAL ANALYSIS OF GINSENG CULTIVATED IN THE ALTAI REPUBLIC

Anna I. Levashova*, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Maxim S. Nesterov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

Ginseng a plant widely used in phytomedicine due to its pronounced biological activity, primarily connected with the high content of saponins (ginsenosides). The cultivation of ginseng in the Altai Republic is currently being resumed. The production of phytopreparations requires an assessment of the quality of raw plants. There is a lack of information on the composition and medicinal properties of ginseng grown in the Altai Republic.

In this research, for the first time, an analysis of Altai Ginseng roots was carried out by HPLC-QOT MS. The profile of the main biologically active substances — ginsenosides — was determined and compared with that of the Chinese analogue. We found that Altai ginseng contains 17 ginsenosides, 12 of which are recommended for the detection by NIST. The content of 7 main ginsenosides (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg, Rd) ranges from 680 to 5,375 µg/g of raw material. The ginsenoside profiles of ginseng plants grown in Altai and China were found to be similar.

It is shown that ginseng roots contain a rich composition of ginsenosides, which are present in high concentrations. Consequently, this raw material has a significant potential for the manufacture of extracts for their further use in phytopreparations for preventive medicine in Russia and other countries.

Keywords: Altai ginseng, ginsenosides, HPLC-MS, extraction

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Levashova A.I., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Nesterov M.S. Compositional Analysis of Ginseng Cultivated in the Altai Republic. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):106–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-106-113>

Submitted 24.05.2021

Revised 03.08.2021

Published 20.10.2021

Введение

В России и во всём мире ежегодно увеличивается потребление лекарств, фито-препаратов, БАД, природной косметики на основе растений и, соответственно, растёт потребность в получении сырья для их изготовления. Создан специальный проект по возрождению отрасли лекарственного растениеводства [1], который является частью дорожной карты «Хелснет» Национальной технологической инициативы, который призван обеспечить растущие потребности российских фармпроизводителей в сырье — экстрактах из лекарственных растений, а также наладить экспорт препаратов и субстанций из лекарственных трав. В рамках этого проекта идут совместные исследования с участием учёных из Китайской Народной Республики, создаются агропарки, фермерские хозяйства.

Пилотным регионом проекта стала Республика Алтай, т. к. она занимает первое место в РФ по площади сельскохозяйственных и показал себя перспективным центром возрождения лекарственного растениеводства и переработки растительного сырья в России. Так, годовые эксперименты по культивированию 16 видов

лекарственных растений на нескольких площадках Республики Алтай показали достаточно высокую продуктивность, причём по некоторым растениям данный показатель был даже выше, чем ожидаемый специалистами.

Одним из растений, которое необходимо выращивать в больших масштабах, является женьшень, т. к. его используют в фитомедицине во всём мире. Женьшень содержит большой набор биологически-активных веществ (БАВ), которые обладают широким спектром биологической активности. Основным классом БАВ женьшеня являются тритерпеновые гликозиды (гинсенозиды). Экспериментальные исследования показали, что гинсенозиды проявляют различную биологическую активность, включая иммуномодулирующие и кардиотонические эффекты, оказывают противовоспалительное действие, способствуют снижению веса, стимулируют синтез белков крови и др. эффекты [5]. Медицинская практика показала, что препараты из женьшеня благотворно влияют на сердечно-сосудистую, иммунную, нервную системы, на заболевания почек, заболевания репродуктивной системы.

В настоящее время состав женьшеня, культивируемого в Республике Алтай, в частности, его гинсенозидный профиль, другие БАВ — не исследованы. В связи с этим **целью** данной работы стала идентификация гинсенозидного состава корней «алтайского» женьшеня, как наиболее фармацевтически ценной части растения, и сравнение с китайским аналогом [2]. Это позволит оценить его лекарственный потенциал для дальнейшего применения.

Материалы и методы

Приготовление экстрактов

0,1 г высушенных и измельчённых корней женьшеня помещали в стеклянную виалу с закручивающейся крышкой вместимостью 2 мл, добавляли 1,0 мл метанола (соотношение сырьё/растворитель — 1/10), тщательно перемешивали. Затем виалы термостатировали при 50°C в течение 20–24 ч. Отбирали 200 мкл р-ра, центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 10 мин. Полученный супернатант анализировали методом ВЭЖХ-МС.

Условия ВЭЖХ-МС

Систему Agilent 1290 Infinity ВЭЖХ использовали для прямого ввода образцов (5 мкл) в аналитическую колонку с обращённой фазой Agilent Poroshell C18 (150 мм×2,1 мм, размер — 2,7 мкм), температура колонки — 40°C. Элюирование осуществляли смесью, состоящей из фаз А и В, в градиентном режиме: 0–2,0 мин — 1% В; 2,01–15,0 мин увеличивается до 60% В и удерживается в течение 5 мин; 20,01–22,01 — 90% В, 22,02 мин — возвращение в исходные условия. Время уравнивания колонки на исходных условиях — 7 мин. Фаза А — деионизированная вода, содержащая 0,1% р-р уксусной кислоты. Фаза В — ацетонитрил, содержащий 0,1% р-р уксусной кислоты. Скорость потока — 350 мкл/мин, время анализа — 29 мин. Детекцию проводили в режиме Auto MS/MS на Agilent QTOF 6545XT LC/MS, с контролируемым программным обеспечением. Анализ полученных данных проводили с помощью MassHunter Workstation Agilent (версия В.08.01).

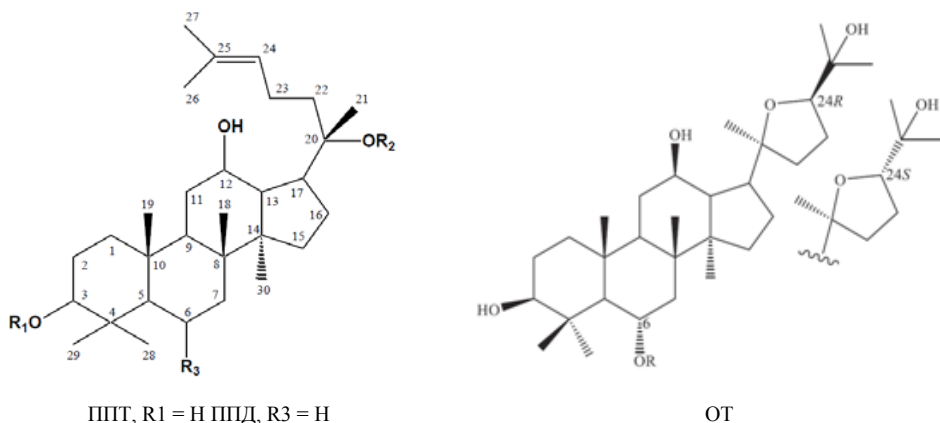


Рис. 1. Основные группы гинсенозидов женьшеня: протопанаксадиолы (ППД, R3=H), протопанаксатриолы (ППТ, R1=H) и октиллольные (ОТ) сапонины.

Fig. 1. Main groups of ginseng ginsenosides include protopanaxadiols (PPD, R3 = H), protopanaxatriols (PPT, R1 = H) and octylloleic (OT) saponins.

Результаты и их обсуждение

Основные группы гинсенозидов женьшеня представлены тремя классами тритерпеновых гликозидов: протопанаксадиольные, протопанаксатриольные и октиллольные сапонины (рис. 1). Гинсенозиды содержат тритерпеновый остов и один или несколько сахарных фрагментов. Особенностью данного класса соединений является значительное структурное разнообразие за счёт большого числа изомеров, а также из-за наличия различных заместителей при хиральном атоме углерода (C20). Такое разнообразие проявляется также в значимых отличиях их биологических эффектов, вызываемых каждым гинсенозидом при их индивидуальном изучении. Вследствие этого фармакологические свойства лекарственных препаратов из женьшеня различного происхождения и произрастающего в разных климатических условиях могут различаться. Поэтому необходимо проводить мониторинг сырья для фитопрепаратов, составлять гинсенозидные профили анализируемых образцов женьшеня, в которых необходимо идентифицировать каждый гинсенозид индивидуально.

Для определения гинсенозидных паттернов для различных представителей рода *Panax* разработано много методов, одним из лучших среди которых является ВЭЖХ

в сочетании с времяпролётной масс-спектрометрией [1, 4].

Нами была проведена оптимизация условий проведения ВЭЖХ гинсенозидов различных классов, наиболее представленных, по литературным данным, в корнях женьшеня. Условия хроматографического разделения позволяют надёжно разделять модельную смесь из 17 гинсенозидов (рис. 2), что подтверждают аналитические характеристики метода, представленные в табл. 1.

Для оценки качества лекарственных средств и соответствия как российским, так и мировых требованиям разрабатываются стандарты, которые регулируются государственной фармакопеей. Наиболее строгие требования, которые наилучшим образом характеризуют и дифференцируют препараты женьшеня, предъявляются Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST), который регулярно разрабатывает новые калибровочные стандарты и стандартные референсные образцы (SRM) для использования при проверке новых и существующих аналитических методов. Согласно последним разработкам NIST [3], стандартизацию препаратов женьшеня необходимо проводить по 7 представителям гинсенозидов (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg и Rd), а также рекомендуется определять группу 5 гинсенозидов (Rb3, Rg2, Rg3, Rh1 и Rh2), т. к. они обычно присутствуют в образцах

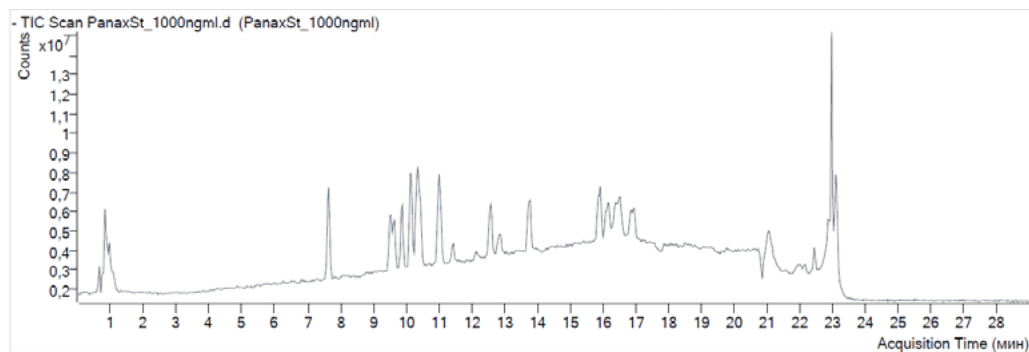


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси 17 гинсенозидов в отрицательном режиме регистрации ионов.
Fig. 2. Chromatogram of a model mixture of 17 ginsenosides in negative ion registration mode.

Таблица 1. Аналитические параметры метода для определяемой группы гинсенозидов
Table 1. Analytical parameters of a method for the determined group of ginsenosides

Соединение (гинсенозид)	Характеристический ион	Время удерживания, мин	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции (R ²)	Предел детекции, нг	Предел колич. определения, нг
Re	991,5561	7,571	y=512,998578x-8397,875767	0,9948	5,46	16,37
Rg1	845,4980	7,675	y=560,406405x-9224,433714	0,9946	5,49	16,46
Rf	799,4912	9,506	y=68,257831x-2150,882462	0,9995	10,50	31,51
Rb1	1153,6094	9,859	y=239,365135x-3464,824161	0,9981	4,83	14,48
Rc	1123,5979	10,093	y=219,336571x-5718,973763	0,9927	8,69	26,07
Rg2	829,5024	10,156	y=686,548540x-10021,706687	0,9948	4,87	14,60
Rh1	683,4439	10,357	y=1177,247571x-22704,622605	0,9972	6,43	19,29
Rb2	1123,6000	10,385	y=499,333031x-8959,911865	0,9990	5,98	17,94
Rb3	1077,5912	10,44	y=123,744006x-1790,217793	0,9999	4,82	14,47
Rd	991,5563	10,983	y=512,443790x-7990,678015	0,9990	5,20	15,59
F1	683,4438	11,013	y=1006,971029x-21461,131424	0,9965	7,10	21,31
Gypenoside 17	991,5540	11,447	y=201,123132x-8219,934146	0,9855	13,62	40,87
Rg6	811,4929	12,552	y=630,021765x-12530,595288	0,9948	6,63	19,89
Rg3	829,5037	13,755	y=779,820805x-15620,495924	0,9947	6,68	20,03
Rk1	811,4938	15,882	y=729,843254x-13266,205095	0,9954	6,06	18,18
Rg5	811,4920	16,113	y=515,179674x-7905,404145	0,9943	5,11	15,34
Rh2	667,4496	16,952	y=851,001375x-12344,936358	0,9972	4,84	14,51

молотого корня и экстракта из него и могут служить критерием подлинности образцов.

Анализ экстрактов «алтайского» женьшеня (табл. 2) показал, что группа мажорных гинсенозидов присутствует в наиболее высоких концентрациях — 680–5375 мкг/г сырья (рис. 3). В то время как содержание гинсенозидов из рекомендованной группы значительно ниже — на уровне 0,19–242 мкг/г сырья, за исключением Rb3, концентрация которого составила 1393,07 мкг/г сырья. Также нами идентифицирована третья группа гинсенозидов, с минорным содержанием по отношению к первым двум группам (0,7–45,8 мкг/г сырья). Однако следует заметить, что низкое содержание не обязательно означает незначительную биологическую активность и доступность. Кроме того, повысить, при необходимости, содержание гинсенозидов позволит разработка соответствующих методов и условий экстракции этих БАВ.

Проведённая сравнительная оценка содержания гинсенозидов в корнях «ал-

тайского» женьшеня и его «китайского аналога» (табл. 2, рис. 3) показала, что спектр идентифицированных гинсенозидов является сходным. При этом наблюдаются отличия по содержанию некоторых мажорных и минорных компонентов.

Заключение

Впервые проведено определение гинсенозидного профиля женьшеня, культивируемого в Республике Алтай. Установлено, что в растении содержится широкий спектр анализируемых биологически активных соединений в достаточно высоких концентрациях. Сравнительный анализ показал, что гинсенозидный профиль женьшеня Алтая по качественному и количественному составу имеет большое сходство с произрастающим в Китае.

Таким образом, женьшень, культивируемый в Республике Алтай, является перспективным сырьём для производства лекарственных средств и фитопрепаратов.

Таблица 2. Содержание гинсенозидов в экстрактах корней алтайского и китайского женьшеня
Table 2. Content of ginsenzides in the extracts from Altai and Chinese ginseng roots

Гинсенозид	Содержание, мкг/г	
	Алтайский	Китайский
Re	1841,68	1644,26
Rg1	1119,27	1066,63
Rf	690,15	1904,14
Rb1	5376,48	5341,36
Rc	3866,43	4941,39
Rg2	242,25	302,44
Rh1	18,86	67,09
Rb2	1208,55	1121,59
Rb3	1393,07	1457,41
Rd	681,85	2566,71
F1	11,47	14,24
Gypenoside 17	45,80	310,37
Rg6	1,62	1,73
Rg3	13,80	13,38
Rk1	0,70	0,67
Rg5	3,13	2,88
Rh2	0,19	0,21

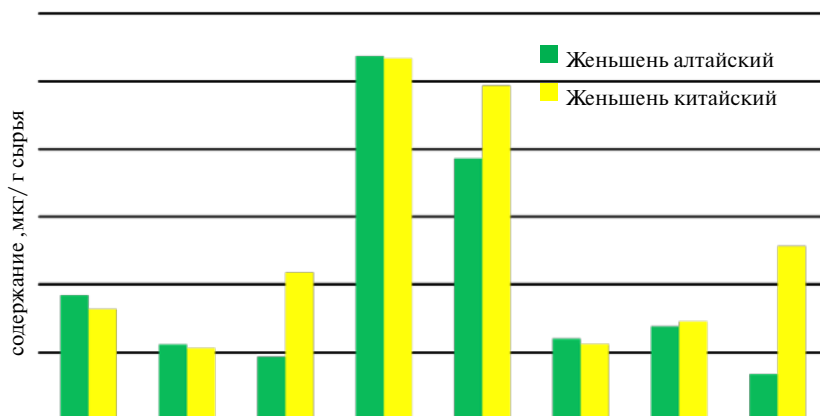


Рис. 3. Гинсенозидные профили экстрактов женьшеня алтайского и китайского происхождения по содержанию мажорных компонентов.

Fig. 3. Ginsenoside profiles of Altai and Chinese ginseng extracts in terms of the content of major components.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Козко А.А., Цицилин А.Н. Перспективы и проблемы возрождения лекарственного растениеводства в России. *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2018;(146):18–25. [Kozko A.A., Tsitsilin A.N. Perspektivy i problemy vozrozhdeniya lekarstvennogo rastenievodstva v Rossii [Prospects and problems of the revival of medicinal plant growing in Russia]. *Biologiya rasteniy i sadovodstvo: teoriya, innovatsii* [Plant biology and horticulture: theory, innovation]. 2018;(146):18–25. (In Russian)]. DOI: 10.25684/NBG.scbook.146.2018.03.
2. Ставрианиди А.Н., Байгильдиев Т.М., Стекольщикова Е.А., Шпигун О.А., Родин И.А. Новые подходы к определению и групповой идентификации физиологически активных соединений в растительных материалах и коммерческой продукции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Журнал аналитической химии*. 2019;74(1):67–80. [Stavrianidi A.N., Baygildiev T.M., Stekolshchikova E.A., Shpigun O.A., Rodin I.A. Novye podkhody k opredeleniyu i gruppovoy identifikatsii fiziologicheski aktivnykh soedineniy v rastitel'nykh materialakh i kommercheskoy produktzii metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii s mass-spektrometricheskimi detektirovaniem [New approaches to the determination and group identification of physiologically active compounds in plant materials and commercial products by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection] *J. of Analytical Chemistry*. 2019;74(1):67–80. (In Russian)].
3. Wilson W.B., Sander L.C. Method development for the certification of a ginsenoside calibration solution via liquid chromatography with absorbance and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. 2018;1574:114–121. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.09.011.
4. Yang L. Development of a validated UPLC-MS/MS method for analyzing major ginseng saponins from various ginseng. *Species Molecules*. 2019;24(22):4065. DOI: 10.3390/molecules24224065.
5. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Zh. Phytochemical analysis of Panax species: A review. *J. Ginseng Res.* 2021;45(1):1–21. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.12.009.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Левашова Анна Игоревна*, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: annalevashova3@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Anna I. Levashova*, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: annalevashova3@gmail.com

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: mdulya@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;

e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author