

УДК 615.322: 547.918

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ В ЖЕНЫШЕНЕ *PANAX GINSENG* C.A. MEYER, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ЭКСТРАКЦИИ**М.П. Разгонова, Т.К. Каленик, А.М. Захаренко, Д. Кравотто*, К.С. Голохваста**

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*Туринский университет, Турин, Италия

ВВЕДЕНИЕ

Сверхкритическая флюидная экстракция (SFE) и сверхкритическая флюидная хроматография (SFC) стали применяться с конца 1970-х для анализа продовольствия и для определения содержания жира и уровней токсикантов. Коммерческие экстракты, полученные с помощью сверхкритической экстракции, содержат, в целом, все биологически активные компоненты наряду с инертными смесями экстрагированных составов (King *et al.*, 2014; Brunner *et al.*, 2010).

Использование сверхкритической флюидной экстракции представляет большой интерес особенно для естественной экстракции продукта. Процесс, сверхкритической экстракции имеет потенциальные преимущества перед обычными процессами извлечения, например: меньшее время экстракции, меньший объем органического растворителя, и возможность более селективной экстракции (Taylor *et al.*, 2000).

Сверхкритический углекислый газ, является привлекательным растворителем биологически активных веществ из-за низких критических температур использования (30–40 °C), его нетоксичности и инертности.

SFE используется в экстракции многих натуральных продуктов, например, плодов лимонника китайского (Choi *et al.*, 1998), масла, богатого антиоксидантами и полиненасыщенными жирными кислотами, из микроводорослей (Gouveia *et al.*, 2007), антиоксидантов из семян кориандра (Yerez *et al.*, 2002), имбирного олеорезина (терпентин) из имбиря (Zancan *et al.*, 2002) и многих других соединений, экстрагируемых из растительных матриц. Авторы данной статьи произвели успешную сверхкритическую экстракцию корней дальневосточного женьшеня при различных уровнях давлений, температуры и с разным содержанием соразтворителя (Razgonova *et al.*, 2019).

Дальневосточный женьшень *Panax ginseng* C.A. Meyer является многолетним растением, используемым в течение тысячелетий в традиционной восточной медицине. Наиболее полностью исследованные активные компоненты женьшеня, известные как гинсенозиды, представляют из себя гомологический ряд тритерпеновых сапонинов с различным профилем гликолизирования (Stavrianidi *et al.*, 2019). Гинсенозиды, как сообщали, имеют разнообразное положительное лекарственное действие: противоопухолевый, химиопрофилактический, иммуномодулирующий и антидиабетический эффекты (Ren *et al.*, 1999; Surh *et al.*, 2001).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы: дикий женьшень *Panax ginseng* C.A. Meyer (*P. ginseng*) из Лазовского района Приморья и культивированный женьшень из провинции Кэсон, Северная Корея.

Сверхкритическая CO₂-экстракция была осуществлена в Дальневосточном федеральном университете с помощью экстракционного аппарата сверхкритического давления Thar SFC, США.

В университете Турина (Италия) для процессов хроматографирования и идентификации использовался жидкостной хроматограф Waters Fraction Link, оснащенный детектором двойного поглощения 2487 и масс-детектором Micromass ZQ. Разделение образцов было выполнено при комнатной температуре с двойной мобильной фазой, состоящей из вода с 0,1 % муравьиной кислоты (растворитель А) и ацетонитрила (растворитель В) при скорости потока 1 мл / мин. Программа элюции градиента: (время, %) 0, 01, 2; 1,5, 2; 15, 100; 21, 100. Элюирующая колонка Kinetex C18 100 Å (3 x 150 мм, 2,6 мкм, Phenomenex). Масс-детектирование производили в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Сравнительные хроматограммы сверхкритических экстрактов дальневосточного и корейского корней женьшеня представлены на рисунках 2 и 3.

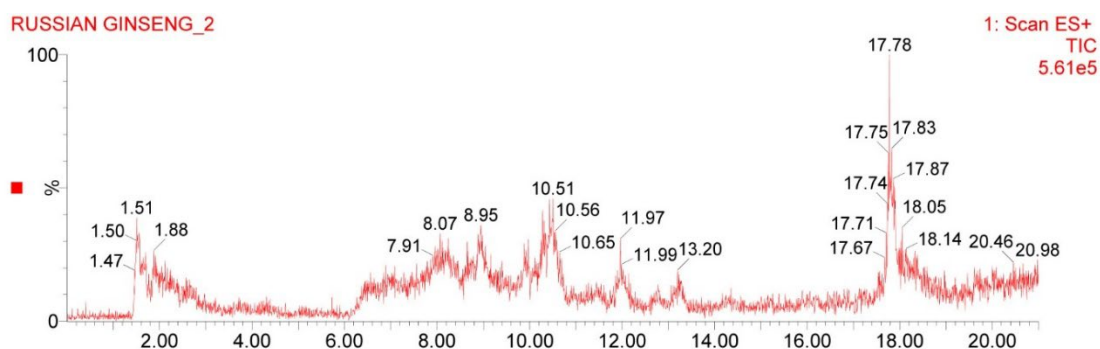


Рис. 2. – Хроматограмма сверхкритического экстракта корня дальневосточного женьшеня *P. ginseng*.

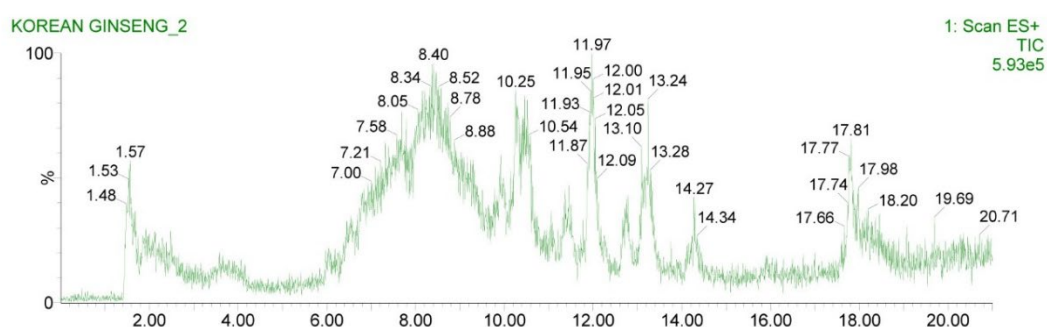


Рис. 3. – Хроматограмма сверхкритического экстракта корня корейского женьшеня *P. ginseng* (провинция Кэсон)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные масс-спектрометрии хорошо согласуются с известными структурными формулами гинсенозидов. Молекула любого гинсенозида состоит из сапогенина и сахаридных боковых цепей, которые также могут иметь более простые заместители (малонил). Конечные фрагменты соответствуют агликонам 20 (S) протопанаксдиолу (PPD), протопанаксатриолу (PPT) и октиллольным (OT) сапогенинам. На данный момент из всей группы растений рода *Panax* выделено более 620 соединений гинсенозидов (Yang *et al.*, 2012). На рисунке 4 представлены профили хроматограммы для некоторых гинсенозидов из дальневосточного дикого женьшеня.

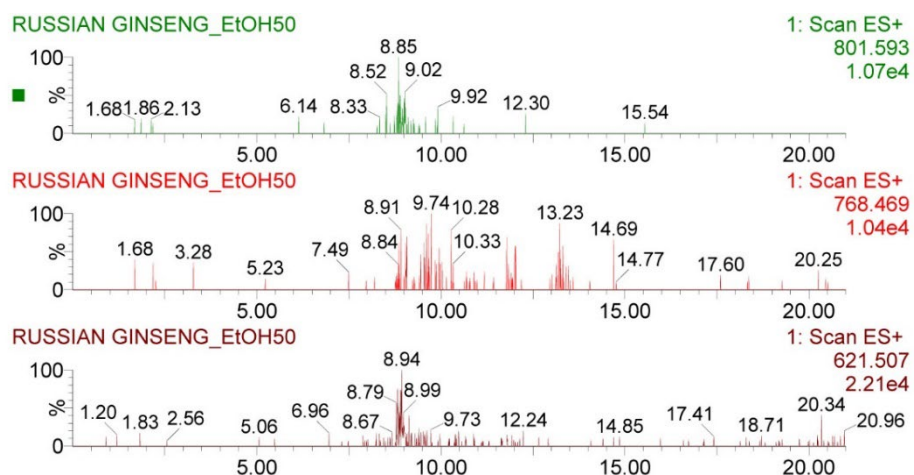


Рисунок 4 – Масс-спектры гинсенозидов Rg1, Rk3 и нотогинсенозида R2, выделенных из дальневосточного женьшеня *P. ginseng*

В таблице 1 представлены данные масс-спектрометрии в положительном режиме регистрации масс-спектров высокого разрешения гинсенозидов дальневосточного женьшеня и корейского культивированного женьшеня, соответственно.

В масс-спектрах экстракта дальневосточного женьшеня обнаружались достаточно редко встречающиеся кориогинсенозид (KG-R2) и нотогинсенозид R2.

В экстракте корейского культивированного женьшеня был найден неизвестный гинсенозид с предполагаемой структурной формулой $C_{48}H_{82}O_{17}$ (рисунок 5). Гинсенозид с такой же структурной формулой был идентифицирован в работе Н. – Р. Wang (Wang et al., 2016).

Таблица 1 – Данные масс-спектрометрии по женьшеню дальневосточному *P. ginseng*.

Гинсенозиды	Данные МС, m/z	Структурная формула	Дальневосточный <i>P.ginseng</i>	Культивированный <i>P. ginseng</i> (провинция Кэсон)
Гинсенозид Rk3	621,507	$C_{36}H_{60}O_8$	+	+
Гинсенозид Rh1	639,396	$C_{36}H_{62}O_9$	-	+
Гинсенозид Rk1	767,459	$C_{42}H_{70}O_{12}$	+	+
Нотогинсенозид R2	768,469	$C_{41}H_{70}O_{13}$	+	-
Гинсенозид Rg3	785,565	$C_{42}H_{72}O_{13}$	-	+
Гинсенозид Rg1	801,593	$C_{42}H_{72}O_{14}$	+	+
Неизвестный гинсенозид	929,352	$C_{48}H_{82}O_{17}$	-	+
Гинсенозид Rd	947,555	$C_{48}H_{82}O_{18}$	+	+
Гинсенозид Rb2	1079,658	$C_{53}H_{90}O_{22}$	+	+
Гинсенозид Rb1	1109,606	$C_{54}H_{92}O_{23}$	+	-
Корио гинсенозид KG-R2	1122,142	$C_{54}H_{92}O_{24}$	+	-
Ацетил гинсенозид Rb1	1152,489	$C_{56}H_{94}O_{24}$	+	-
Гинсенозид Ra1	1209,98	$C_{58}H_{98}O_{26}$	+	-

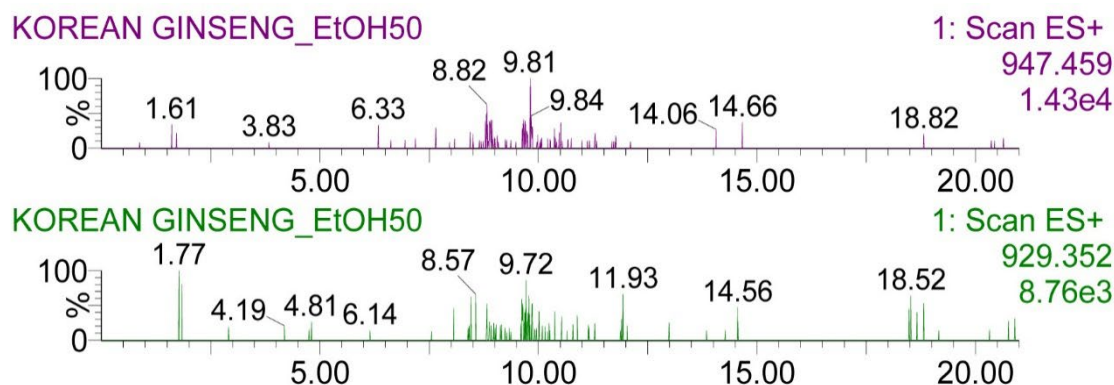


Рисунок 5 – Профиль молекулярных ионов гинсенозида Rd и неизвестного гинсенозида, выделенных из корейского культивированного женьшеня *P. ginseng*.

ВЫВОДЫ

Использование сверхкритической флюидной экстракции позволило выделить и проанализировать профили основных гинсенозидов из корней дальневосточного женьшеня *P. ginseng* культивированных в провинции Кэсон (Сев. Корея) и дикого женьшеня из Приморского края. Из корней корейского культивированного женьшеня с помощью этого метода был выделен неизвестный гинсенозид с предполагаемой структурной формулой $C_{48}H_{82}O_{17}$. Кроме того было показано, что данный метод экстракции позволяет выделить и все основные гинсенозиды, которые характерны для женьшеня. Методом масс-спектрометрии были подтверждены молекулярные массы гинсенозидов и последовательность сахаров. Было показано, что все они соответствуют ранее выделенным гинсенозидам, а метод SFE не приводит к химическим модификациям и может быть рекомендован для выделения гинсенозидов из сырья женьшеня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brunner, G. Applications of supercritical fluids / G. Brunner // Annual Review of Chemical and Biomolecular engineering. 2010. № 1. P. 321–42.
2. Choi, Y.H. Optimum SFE condition for lignans of *Schisandra chinensis*. / Y.H. Choi, J. Kim, S.H. Jeon, K. P. Yoo, H. K. Lee // Chromatographia. Vol. 48. Issue 9. P. 695–699.
3. Gouveia, L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. / L. Gouveia, B.P. Noble, F.M. Marcelo, S. Mrejen, M.T. Cardoso, A.F. Palavra, R.L. Mendes // food chemistry. -2007. Vol. 101. P. 717–723.
4. King, J.W. Modern supercritical fluid technology for food applications. // J.W. King / Annual review of food science and technology. 2014. № 5. P. 215–238.
5. Razgonova, M.P. Supercritical green technologies for obtaining ginsenosides from Far-Eastern wild *Panax ginseng* C.A. Meyer using SFE for applying in drug, food and cosmetic industries. / Razgonova M.P., Kalenik T.K., Veselov V.V., Zakharenko A.M., Ali Taghizadehghalehjoughi, Vita V., Barbuceanu F., Izotov B.N., Stratidakis A.K., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S. // Farmacia. 2019. Vol.67. Issue 1. P. 81–91.
6. Ren, G. Degradation of ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) extracts during microwave and conventional heating / G. Ren, F. Chen // J. Agric. Food Chem. 1999. № 47. P. 1501–1505.
7. Stavrianidi, A. New approaches to the determination and group identification of physiologically active compounds in plant materials and commercial products by HPLC–Mass spectrometry/A.N. Stavrianidi, T.M. Baygildiev, E.A. Stekolshchikova, O. Shpigun I. Rodin, // Journal of Analytical Chemistry. 2019. Vol. 74. P. 67–80.
8. Surh, Y. J. Molecular mechanism underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer // Y. J. Surh, H. K. Na, J. Y. Lee, Y.S. Keum / J. Korean Med. Sci. 2001. No. 16. P. 38–41.
9. Taylor, S.L. Enrichment and fractionation of phospholipid concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography. // S.L Taylor, J.W. King, L. Montanari, P. Fantozzi, M.A. Blanco // Ital. J. Food Sci. 2000. № 12. P.65–76.
10. Wang, H. P. Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS. / Hong-Ping Wang, You-Bo Zhang, Xiu-Wei Yang, Da-Qing Zhao, Ying-Ping Wang // Journal of Ginseng Research -2016. Vol. 40. P. 382–394.
11. Yang, W. Z.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. / W. Z. Yang, M. Ye, X. Qiao, C.F. Liu, W.J. Miao, H. Y Tao, D. A. Guo // Analytica Chimica Acta 2012. Vol. 739. P. 56–66.
12. Yopez, B. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction / B. Yopez, M. Espinosa, S. Lopez, G. Bolanos // Fluid Phase Equilib. 2002. № 194. P. 879–884.
13. Zancan, K.C. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of antioxidant action of extracts. / K.C. Zancan, M.O.M. Marques, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles // Journal of Supercritical Fluids 2002. Vol. 24. P.57–76.