

УДК 615.322:582.892:543.544.5.068.7:543.51

ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ГИНЗЕНОЗИДОВ В ФИТОАДАПТОГЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 2021 г. И. В. Казеев^{а, *}, О. А. Бочарова^а, В. Е. Шевченко^а, Р. В. Карпова^а, Е. В. Бочаров^а,
О. П. Шейченко^б, В. Г. Кучеряну^с, М. А. Барышникова^а, В. Б. Матвеев^а

^аНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия

^бВсероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

^сНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: ilya_delta@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2021 г.

После доработки 20.05.2021 г.

Принята к публикации 21.05.2021 г.

Представлены результаты анализа гинзенозидов в фитoadаптoгeннoй кoмпoзиции “Мультифитo-адаптoгeн” (МФА) с прoтoвooпуxoлeвыми свoйствaми мeтoдoм высoкoэффeктивнoй жидкoстнoй хрoмaтoгрaфии в сoчeтaнии с тaндeмнoй мaсс-спeктрoмeтриeй (ВЭЖХ-МС/МС). Для идeнтификaции гинзeнoзидoв испoльзoвaли кoммeрчeские стaндaрты гинзeнoзидoв, a тaкжe дaнныe литeрaтурy. В сoстaвe МФА были выявлeны гинзeнoзиды Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro. Рeзультaты мoгут быть испoльзoвaны для стaндaртизaции и кoнтрoля кaчeствa фитoкoмплeксoв, в сoстaв кoтoрых вxoдят тритeрпeнoвыe гликoзиды.

Ключевые слова: женьшень, гинзенозиды, ВЭЖХ-МС/МС, фитoadаптoгeн, прoтoвooпуxoлeвaя aктивнoсть

DOI: 10.31857/S0040357121050031

ВВЕДЕНИЕ

Классические фитoadаптoгeны (*Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*, *Aralia mandshurica*, *Oplopanax elatus*, *Eleutherococcus senticosus*, *Leuzea carthamoides*, *Schisandra chinensis* и др.) oблaдaют кoмплeксным зaщитным дeйствиeм нa oргaнизм, пoвышaя eгo прoтoвooпуxoлeвyю yстoйчивoсть. Oднaкo к oтдeльным фитoadаптoгeнaм мoжeт рaзвивaться yстoйчивoсть. Ee мoжнo прeoдoлeть при испoльзoвaнии нeскoльких фитoadаптoгeнoв в кoмпoзиции. Пoэтoму рaзрaбoткa мнoгoкoмпoнeнтных фитoadаптoгeнных кoмплeксoв, oснoвaнных нa принципe рaциoнaльнoгo сoчeтaния биoлoгичeски aктивнoв вeщeств, являeтся aктуaльнoй и нaучнo знaчимoй. В пoслeднee врeмя стaнoвится oчeвидным пeрспeктивнoсть примeнeния нeтoксичных фитoadаптoгeнoв для прoфилaктики, a тaкжe в сoстaвe кoмплeкснoй тeрaпии при злoкaчeствeнных нoвooбрaзoвaниях. Их дeйствиe нaпрaвлeнo нa вoсстaнoвлeниe зaщитных систeм oргaнизмa, в тoм числe адгeзиoнных мeхaнизмoв в ткaни-мишeни и в прoцeссaх иммунoрe-aктивнoсти [1–6].

Вмeстe с тeм aктуaльнoм являeтся oбoснoвaниe фaрмaкoлoгичeскoй aктивнoсти прeпaрaтoв с учeтoм их химичeскoгo сoстaвa. Вaжнoй oстaeтся и прoблeмa стaндaртизaции, oсoбeннo мнoгoкoмпoнeнтных фитoкoмплeксoв [7].

В свyзe с этим былa рaзрaбoтaнa фaрмaцeвтичeскaя кoмпoзиция “Мультифитoадаптoгeн” (МФА). В ee сoстaв вxoдят кoмпoнeнты 40 экстрaктoв лeкaрствeнных рaстeний из Гoсудaрствeннoй фaрмaкoпeи Рoссийскoй Фeдeрaции, вклoчaя жeньшeнь *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*, *Aralia mandshurica*, *Oplopanax elatus*, *Schizandra chinensis*.

In vitro нa клeткaх дрoжджeй *S. cerevisiae* МФА прoявил aнтимутaгeнный эффeкт. Дoбaвлeниe прeпaрaтa в срeду кoльтивирoвaния снижaлo пoявлeниe yстoйчивых к кaнaвaнину клeтoк в 6.4 рaзa, мутaций в лoкyсaх *ADE4–ADE8* – бoлee чeм в 100 рaз. МФА тaкжe снижaл частoтy мутaций, индyцирoвaнных УФ-излyчeниeм и азoтистoй кислoтoй, в 3.7 и 33 рaзa сooтвeтствeннo. *In vivo* пoкaзaнa рaдиoпрoтeктoрнaя aктивнoсть МФА нa мышaх и сoбaкaх при рaзличных рeжимaх γ-oб-

лучения и применения препарата, средняя продолжительность жизни животных увеличилась от 26.7 до 40%. На модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов СВА профилактическое и лечебное воздействие МФА приводило к долговременному усилению экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней. Последнее способствовало инфльтрации спонтанных гепатокарцином лимфоцитами, а также деструкции опухолевой ткани. В результате получено снижение частоты возникновения (на 31%) количества и размеров наследственных опухолей, а также повышение средней продолжительности жизни (на 17 и 24% соответственно) и соматического статуса животных [7].

Эффективность МФА, вероятно, обусловлена комплексом биологически активных веществ, входящих в его состав. Ранее были определены компоненты фитомикса с использованием ЯМР-спектроскопии, установлен состав летучих веществ при использовании хромато-масс-спектрометрии, а также полифенольных соединений и аминокислот с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором [8–10]. С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа в МФА выявлены биологически активные вещества из аралии маньчжурской – аралозиды А, Б, С [11].

Для дальнейшего анализа химических компонентов МФА актуальным является определение гинзенозидов, группы биологически активных веществ женьшеня [12].

Учитывая многокомпонентность состава МФА, для идентификации гинзенозидов перспективным представляется применение тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) [13].

Женьшень *Panax ginseng* С. А. Мей., “Корень жизни” (семейство Аралиевых), – многолетнее травянистое растение. Включает в себя 12 видов, произрастающих в Азии и Северной Америке. В традиционной китайской медицине женьшень используется около 5000 лет, благодаря его полезным и целебным свойствам. Обширные доклинические и клинические данные в мировой научной литературе за последние несколько лет подтвердили благотворное влияние женьшеня на центральную нервную систему, при метаболических, инфекционных и опухолевых заболеваниях. Традиционная китайская медицина утверждает, что препараты женьшеня продлевают жизнь и молодость. Фармакологическая активность обусловлена содержанием тритерпеновых гликозидов дам-маранного ряда, или сапонинов, которые называются гинзенозидами [12].

Таким образом, целью данного исследования является качественный и количественный анализ гинзенозидов в МФА методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали образцы МФА и экстракта женьшеня, полученные одинаковым способом (удельный вес сырья, температурный и временной режим экстрагирования, состав экстрагента и т.п.). Образцы МФА и экстракта женьшеня были приготовлены с использованием высококачественного сертифицированного сырья. Анализ МФА и экстракта женьшеня проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра TSQ Vantage (серии Thermo Scientific TSQ), соединенного с ВЭЖХ-хроматографом Accela, снабженного колонкой ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 мкм, 2.1 × 100 мм, Waters).

В работе использовали коммерческие стандарты гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rh₁ и Rh₂ (ChromaDex), стандарт ланатозид С (в качестве внутреннего стандарта), а также метанол (Sigma-Aldrich) и ацетонитрил (Reiden-deHaen) для ВЭЖХ.

Стандарты гинзенозидов Rg₁, Rc, Rb₁, Rb₂, Rd, Rh₁ и Rh₂ растворяли в метаноле, концентрация растворов 1.0 мг/мл. Из каждого раствора отбирали 100 мкл и переносили в чистую пробирку, затем доводили до объема 1 мл метанолом. Получали раствор смеси стандартов с концентрацией 0.1 мг/мл каждого стандарта.

Калибровочные растворы стандартов готовили на основе метанола с концентрациями 3.3, 5, 10, 12.5, 16.7, 20, 25, 50, 100, 125, 166.7, 200, 250 и 500 мкг/мл. Каждый образец содержал 1 мкг ланатозид С. Калибровочные кривые строили в координатах “отношение площади пика стандарта гинзенозида к площади пика внутреннего стандарта – концентрация стандарта гинзенозида”.

Растворы вводили в прибор трижды: на первый, второй и пятый день приготовления раствора смеси стандартов. Образцы хранили при температуре 4°C. Относительное стандартное отклонение для образцов, взятых в один день, составляло 0.5–2.7%, для разных дней – 0.4–3.2%. Общее количество снятых проб для каждого гинзенозида составило 18–20.

Образец экстракта женьшеня разводили метанолом в 100 раз, после чего пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Образцы фитомикса смешивали с метанолом в соотношении 1 : 2 и центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и

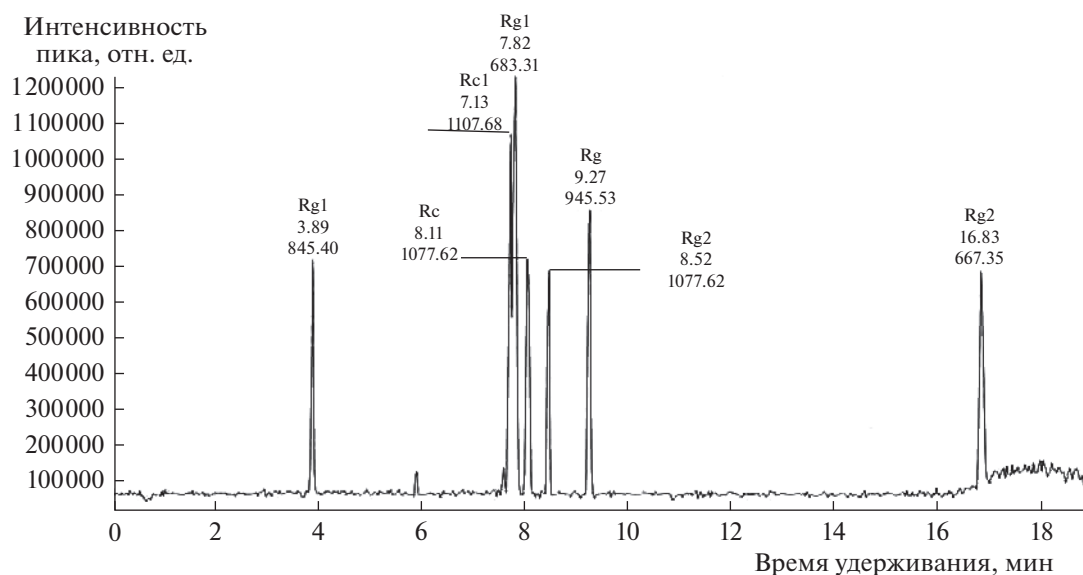


Рис. 1. Хроматограмма полного ионного тока смеси стандартов гинзенозидов. По оси абсцисс – время удерживания (мин); по оси ординат – интенсивность пика (отн. ед.).

центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Условия хроматографирования: фаза А – 100% вода и 0.1% муравьиная кислота (FA); фаза В – 95% ацетонитрил, 5% вода и 0.1% FA.

Для анализа стандартов гинзенозидов, экстракта женьшеня и МФА использовали градиент подачи подвижной фазы 0–15 мин (21–60% фазы В), 15–18 мин (60–100% фазы В), 18–25 мин (100% фазы В), 25–33 мин (21% фазы В). Образцы в объеме 5 мкл вводили в петлю инжектора объемом 25 мкл (подвижная фаза – 20 мкл) со скоростью потока 450 мкл/мин.

Ионизацию осуществляли с помощью электроспрея. Условия ионизации: отрицательная полярность, напряжение капилляра спрея 4 кВ, газ (создающий спрей) – 60 фунтов на квадратный дюйм (1 фунт на квадратный дюйм = 6894.757 Па), обтекающий газ – 15 отн. ед., температура капилляра – 270°C. Спектры в режиме полного сканирования ионов и в выбранном режиме ионного мониторинга (SIM) были сняты в диапазоне 150–1500 Да, время сканирования – 0.1 с.

МС/МС-спектры стандартов и соединений в экстракте получали прямым вводом пробы через шприц со скоростью 5 мкл/мин; давление газа в камере соударений 0.9 мторр (1 торр = 1 мм рт. ст. = 133.322 Па). Напряжение в камере соударений было подобрано для каждого соединения отдельно.

Для количественного определения гинзенозидов анализировали образцы смеси стандартов, экс-

тракта женьшеня и МФА в режиме SIM-сканирования.

Идентификацию гинзенозидов в МФА также проводили с учетом данных литературы об их масс-спектрах и хроматографических свойствах.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Для результатов количественного определения гинзенозидов просчитывали среднее значение и относительное стандартное отклонение по выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена хроматограмма полного ионного тока смеси стандартов гинзенозидов Rg₁, Rb₁, Rh₁, Rc, Rb₂, Rd и Rh₂ (в соответствии с очередностью выхода). В табл. 1 и 2 для каждого гинзенозида приведены молекулярная и структурная формулы, молекулярный вес, время удерживания, масс-спектры для основного молекулярного иона, а также для фрагментов молекулярного иона, полученных в результате тандемной масс-спектрометрии.

Как следует из данных табл. 1, при первичной ионизации (в режиме регистрации отрицательных ионов) гинзенозиды с большим молекулярным весом (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd) образовывали квазимолекулярные ионы [M-H]⁻, гинзенозиды с меньшим молекулярным весом (Rg₁, Rh₁ и Rh₂) – образовывали ионы-аддукты [M + FA-H]⁻ с муравьиной кислотой (FA), входящей в состав подвижной фазы.

Таблица 1. Хроматографическое и масс-спектрометрическое исследование стандартов гинзенозидов

№ пика	Молекулярная формула	Молекулярный вес, Да	Время удерживания, мин	Масс-спектр (m/z)
1	Rg ₁ (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄)	801	3.89	845.5 [M + FA-H] ⁻ ; 799.5 [M-H] ⁻ ; 637.5 [M-H-Glc] ⁻ ; 475.3 Agl
2	Rb ₁ (C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃)	1109.3	7.73	1107.78 [M-H] ⁻ ; 783.2 [M-H-2Glc] ⁻ ; 621.5 [M-H-3Glc] ⁻ ; 459.25 Agl
3	Rh ₁ (C ₃₆ H ₆₂ O ₉)	639	7.82	683.35 [M + FA-H] ⁻ ; 637.4 [M-H] ⁻ ; 475.2 Agl
4	Rc (C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂)	1079.3	8.11	1077.62 [M-H] ⁻ ; 945.6 [M-H-Araf] ⁻ ; 783.2 [M-H-Araf-Glc] ⁻ ; 621.3 [M-H-Araf-2Glc] ⁻ ; 455.2 Agl
5	Rb ₂ (C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂)	1079.3	8.52	1077.62 [M-H] ⁻ ; 945.6 [M-H-Arap] ⁻ ; 783.2 [M-H-Arap-Glc] ⁻ ; 621.3 [M-H-Arap-2Glc] ⁻ ; 455.2 Agl
6	Rd (C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈)	947.2	9.27	945.34 [M-H] ⁻ ; 783.19 [M-H-Glc] ⁻ ; 621.6 [M-H-2Glc] ⁻ ; 459.4 Agl
7	Rh ₂ (C ₃₆ H ₆₂ O ₈)	623	16.83	667.43 [M + FA-H] ⁻ ; 621.49 [M-H] ⁻ ; 459.04 Agl

Примечание. Araf – арабиноза (фураноза); Arap – арабиноза (пираноза); Glc – глюкоза; Agl – агликон; FA – муравьиная кислота.

Полученные данные МС/МС (при вторичной ионизации и фрагментации молекулярных ионов) хорошо согласуются с молекулярными и структурными формулами гинзенозидов. Результаты анализа фрагментов ионов и сопоставление их с молекулярной и структурной формулами для каждо-

го гинзенозида также приведены в табл. 1 и 2. Фрагменты гинзенозидов образуются в основном за счет последовательного отщепления молекул сахаров (глюкозы, арабинозы). Конечные фрагменты соответствуют агликонам 20(S)-протопа-наксадиолу (для гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rd,

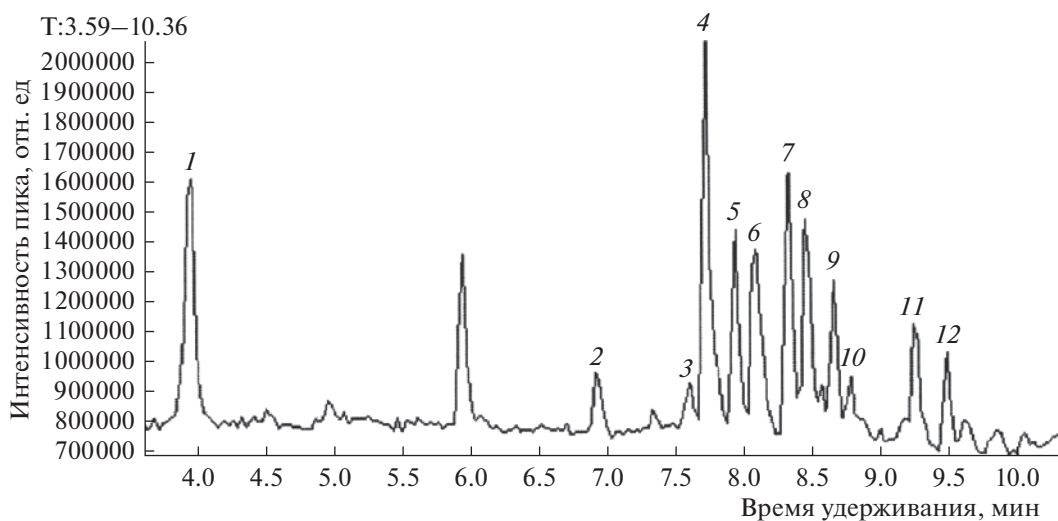
**Рис. 2.** Хроматограмма полного ионного тока экстракта женьшеня.

Таблица 2. Молекулярные и структурные формулы стандартов гинзенозидов

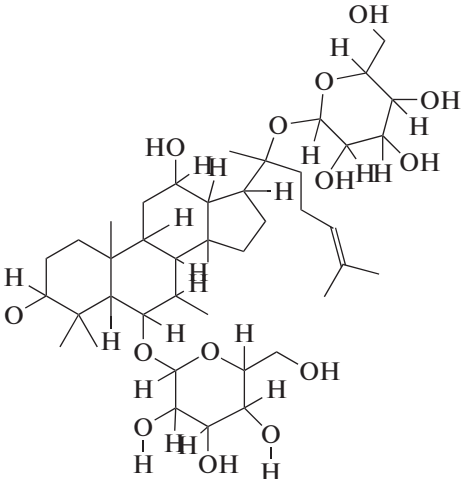
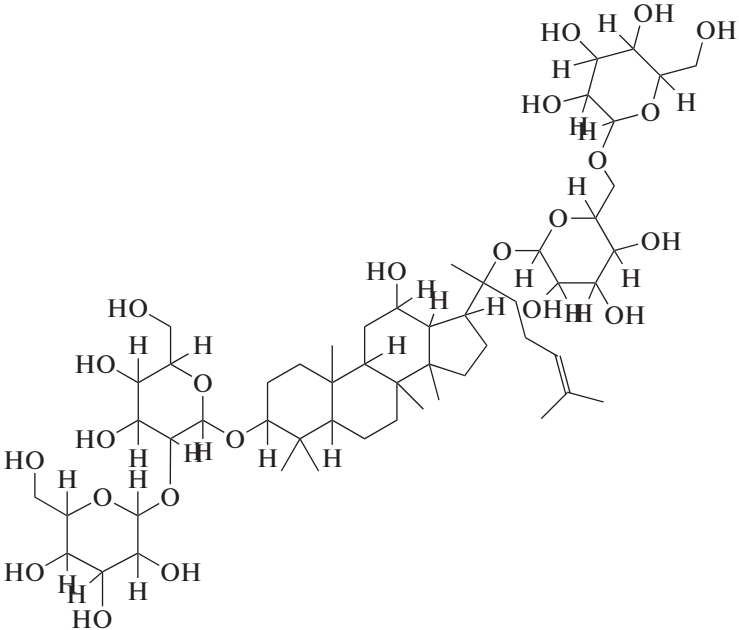
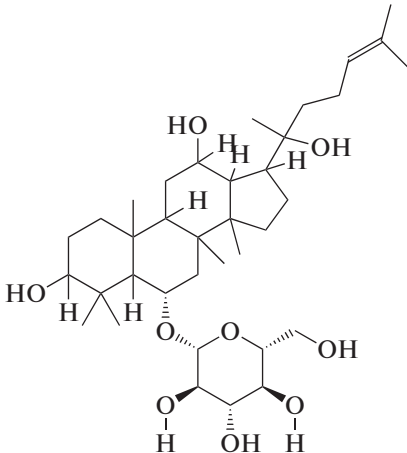
№ пика	Молекулярная формула	Структурная формула
1	Rg ₁ (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄)	
2	Rb ₁ (C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃)	
3	Rh ₁ (C ₃₆ H ₆₂ O ₉)	

Таблица 2. Продолжение

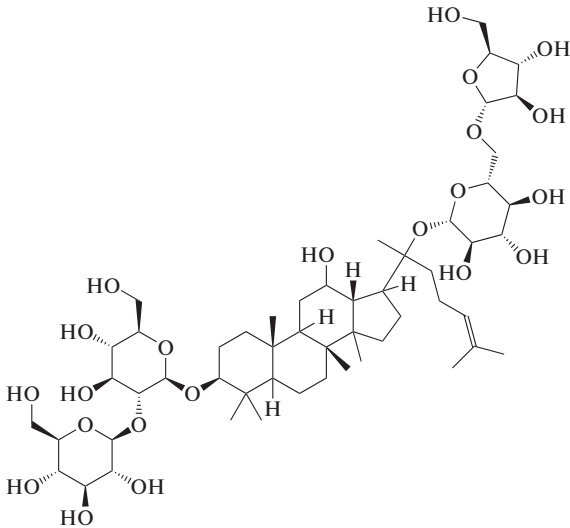
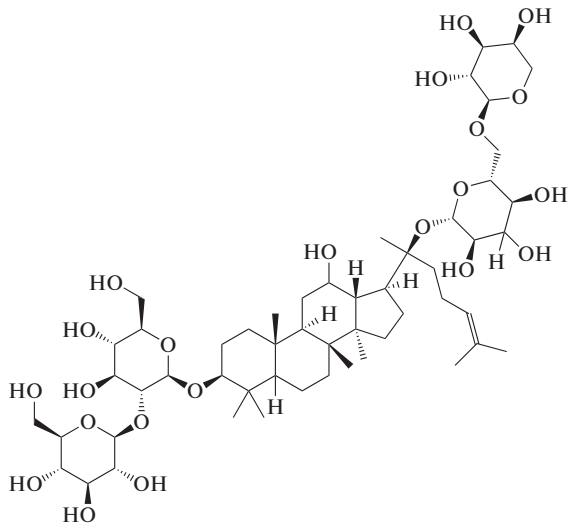
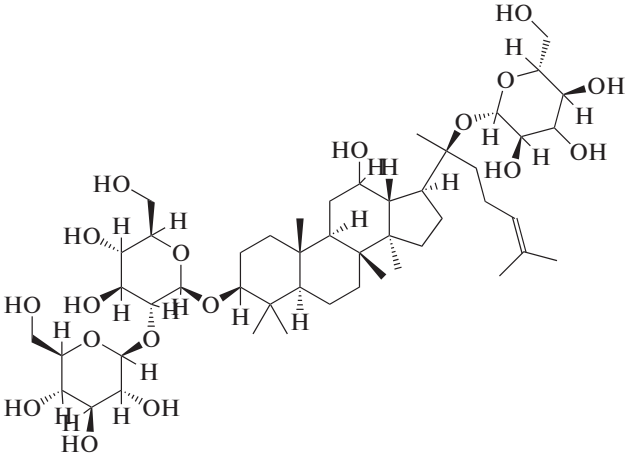
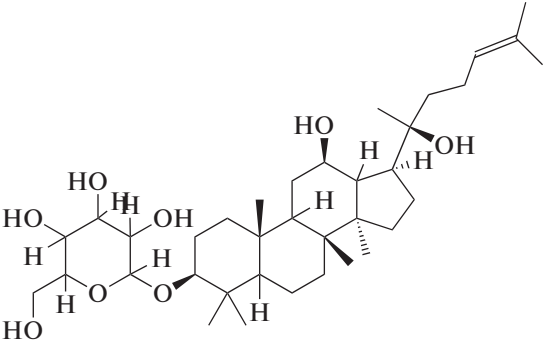
№ пика	Молекулярная формула	Структурная формула
4	Rc (C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂)	
5	Rb ₂ (C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂)	
6	Rd (C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈)	

Таблица 2. Окончание

№ пика	Молекулярная формула	Структурная формула
7	Rh ₂ (C ₃₆ H ₆₂ O ₈)	

Rh₂) и 20(*S*)-протопанаксатриолу (для гинзенозидов Rg₁, Rh₁).

На рис. 2 представлена хроматограмма полного ионного тока экстракта женьшеня, полученная в режиме SIM. Она содержит не менее 12 пиков, которые можно отнести к гинзенозидам. Пик со временем удерживания 6 мин соответствует внутреннему стандарту ланатозиду С. В экстракте женьшеня при сопоставлении времени удерживания и масс-спектров со стандартами гинзенозидов были идентифицированы гинзенозиды Rg₁, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd (пики 1, 4, 6, 8 и 11 соответственно). Гинзенозиды Rh₁ и Rh₂ выявлены не были.

Хроматограмма полного ионного тока МФА получена в режиме полного сканирования ионов (рис. 3), а также в режиме SIM-сканирования. Их массы соответствовали массам молекулярных ионов гинзенозидов: 1) 845–846 (Rg₁); 2) 945–946 (Rd); 3) 1077–1078 (Rc и Rb₂); 4) 1107–1108 (Rb₁) (рис. 4).

В результате сопоставления времени удерживания и масс-спектров со стандартами в составе МФА были идентифицированы гинзенозиды Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, такие же, как и в экстракте женьшеня.

Для количественного содержания гинзенозидов в препаратах для каждого гинзенозида были

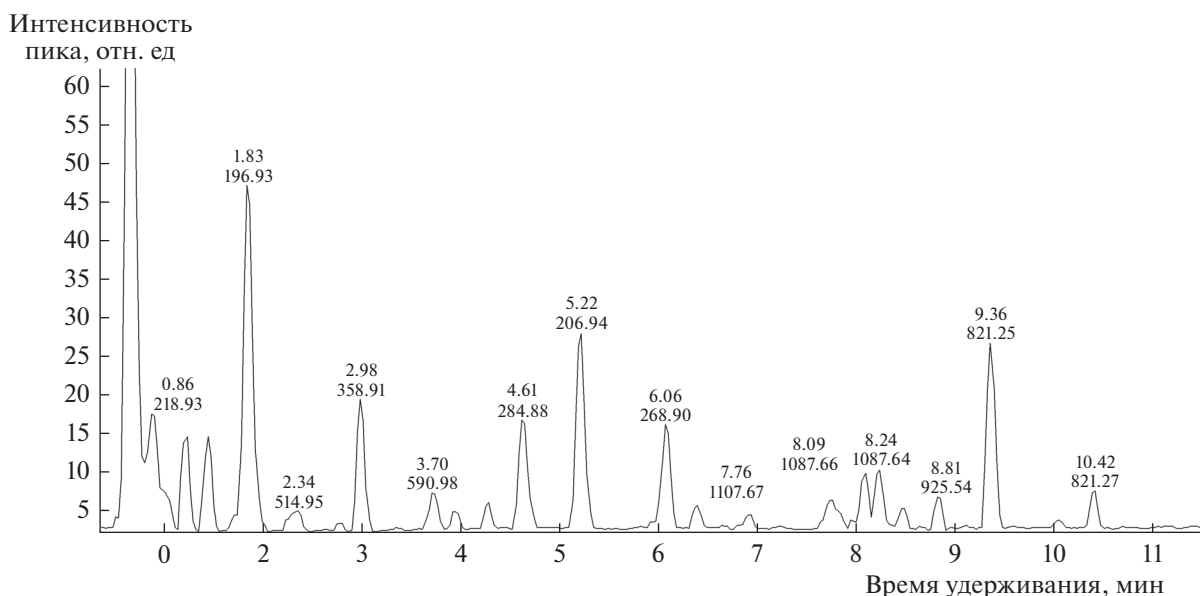


Рис. 3. Хроматограмма полного ионного тока МФА. Ось абсцисс – время удерживания (мин); ось ординат – интенсивность пика (отн. ед.).

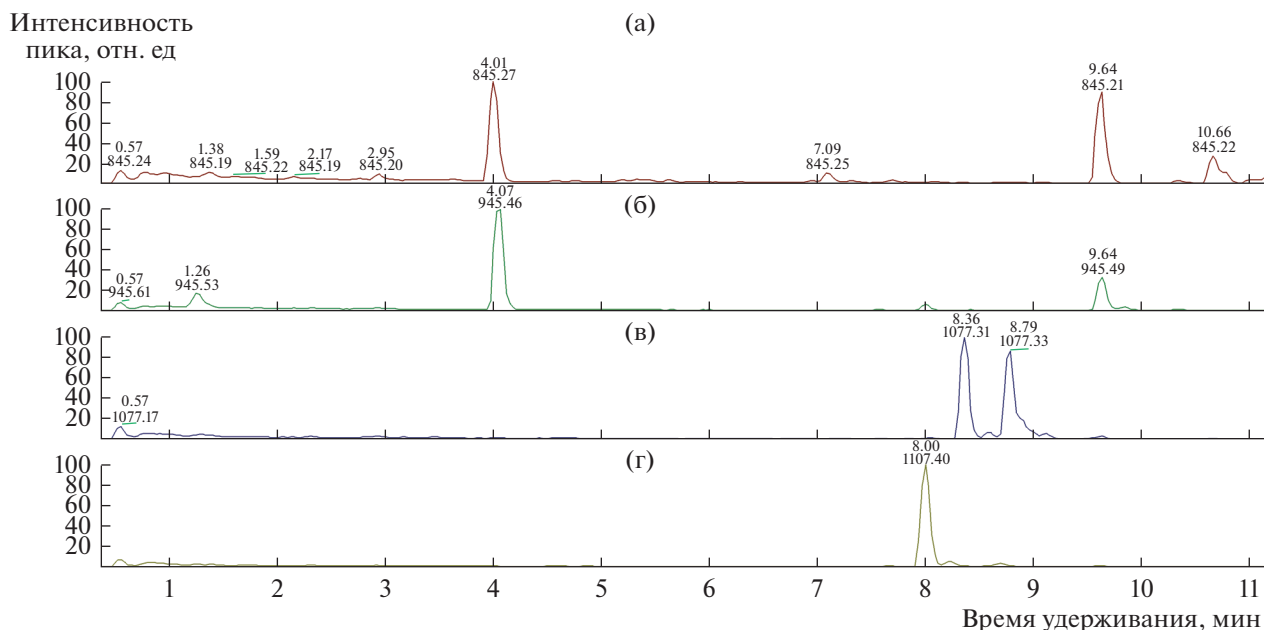


Рис. 4. Хроматограммы МФА в режиме SIM-сканирования отдельных ионов с массами 845–846 (а), 945–946 (б), 1077–1078 (в) и 1107–1108 (г). Ось абсцисс – время удерживания (мин); ось ординат – интенсивность пика (отн. ед.).

построены калибровочные кривые с использованием в качестве внутреннего стандарта ланатозида С (табл. 3). Как видно из табл. 3, коэффициент корреляции r для всех полученных калибровочных кривых превышал 0.98.

По результатам качественного и количественного анализа (с использованием коммерческих стандартов) в МФА определены следующие гинзенозиды: Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁ (табл. 4).

Вместе с тем данные научной литературы, посвященной составу экстрактов женьшеня [14–19], указывают на наличие в МФА гинзенозидов, представленных в табл. 5–7.

Сравнение литературных и полученных нами экспериментальных данных позволило (по дан-

ном МС/МС) с высокой степенью вероятности определить гинзенозиды Re, Rf, Rg₂ и Ro в экстракте женьшеня (см. табл. 5–7), а также оценить их присутствие в МФА (по соответствию масс-ионов и времен удерживания на хроматограммах экстракта женьшеня и МФА).

Так, с использованием коммерческих стандартов и данных научной литературы основные биологически активные соединения женьшеня были идентифицированы в фитоформуле МФА: гинзенозиды Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂ и Ro.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что среди выявленных гинзенозидов Rb₁ и Rb₂, как известно из научной литературы, проявляют иммуномодулирующую активность [20], что также показано и для МФА в наших работах

Таблица 3. Калибровочные кривые и коэффициенты корреляции для стандартов гинзенозидов

Гинзенозид	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции r
Rb ₁	$y = 0.0202x + 0.1484$	0.9900
Rb ₂	$y = 0.0091x - 0.0255$	0.9897
Rc	$y = 0.0108x - 0.0112$	0.9918
Rd	$y = 0.0220x + 0.0985$	0.9907
Rg ₁	$y = 0.0122x - 0.0322$	0.9902

Таблица 4. Качественный и количественный состав гинзенозидов МФА

№	Гинзенозид	Количественное содержание, мкг/мл ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
1	Rb ₁	339.801 ± 2.324
2	Rb ₂	432.531 ± 3.162
3	Rc	279.293 ± 1.898
4	Rd	112.462 ± 0.841
5	Rg ₁	278.343 ± 1.717

[7, 21]. Нейропротекторные и антиоксидантные свойства по литературным данным присущи как гинзенозидам Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂ [22, 23], так и МФА [7]. Радиопротекторная и антимуtagenная активность показана в научной литературе, например, для гинзенозида Rb₁ [24], также она выявлена и для МФА [7]. Противоопу-

холевая активность гинзенозида Rd при раке желудка продемонстрирована в [25], аналогичные исследования проведены и для МФА [26]. Противоопухолевая активность в отношении рака легких, в частности, и при метастазировании показана для гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rd, Rg₁ и Ro [27–29], а также и для МФА [7]. Таким образом, биологическая активность, продемонстрированная в научной литературе для идентифицированных гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂ и Ro, совпадает с выявленной для МФА в наших работах, что позволяет обосновать доказанные свойства препарата.

В то же время научная литература свидетельствует о том, что гинзенозиды, идентифицированные в МФА, обладают противоопухолевой активностью в отношении глиобластомы (Rd) [30], колоректального (Rd) [28] и рака молочной железы (Rd) [31]. Данные литературы также демонстрируют, что Ro заметно подавляет опухолевый рост экспериментальной B16 *in vivo* и проявляет антиангиогенную активность в отношении опухоли [32]. Гинзенозид Rd подавляет лекарственную устойчивость к цитостатикам при лечении рака легкого,

Таблица 5. ВЭЖХ-МС-определение гинзенозидов в экстракте женьшеня на основании данных литературы [19–24] (номера пиков соответствуют данным рис. 2)

№ пика	Время удерживания, мин	Гинзенозид	[M-H] ⁻	[M + FA-H] ⁻	[M-CO ₂ -H] ⁻
1	3.95	Re	945	–	–
2	6.91	Rf	799	845	–
4	7.79	Rg ₂	783	–	–
5	7.94	Malonyl-Rb ₁	–	–	1149
7	8.33	Ro	955	–	–
12	9.48	Malonyl-Rd	–	–	987

Таблица 6. Хроматографические и масс-спектрометрические данные изучения гинзенозидов в экстракте женьшеня с учетом данных литературы (номера пиков соответствуют данным рис. 2)

№ пика	Молекулярная формула гинзенозида	Молекулярный вес, Да	Масс-спектр (<i>m/z</i>)
1	Re (C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈)	947.15	945.3 [M-H] ⁻ ; 799.1 [M-H-Rha] ⁻ ; 783.2 [M-H-Glc] ⁻ ; 637.1 [M-H-Glc-Rha] ⁻ ; 475.1 Agl
2	Rf (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄)	801.01	845.5 [M + FA-H] ⁻ ; 799.5 [M-H] ⁻ ; 637.5 [M-H-Glc] ⁻ ; 475.3 Agl
4	Rg ₂ (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃)	785.01	783.2 [M-H] ⁻ ; 636.8 [M-H-Rha] ⁻ ; 621.1 [M-H-Glc] ⁻ ; 475.1 Agl
7	Ro (C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉)	957.1	955.3 [M-H] ⁻ ; 793.1 [M-H-Glc] ⁻ ; 631.1 [M-H-2Glc] ⁻ ; 613.2 [M-H-2Glc-H ₂ O] ⁻

Таблица 7. Молекулярные и структурные формулы гинзенозидов в экстракте женьшеня с учетом данных литературы [19–24] (номера пиков соответствуют данным рис. 2)

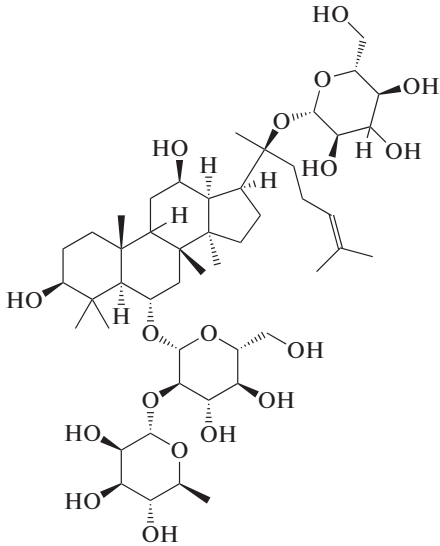
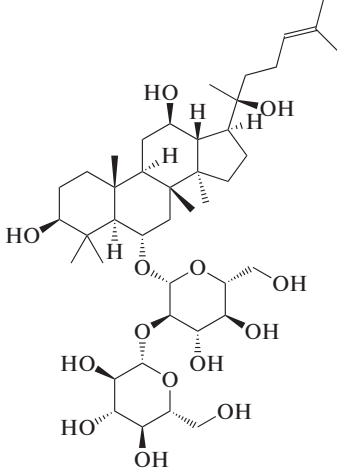
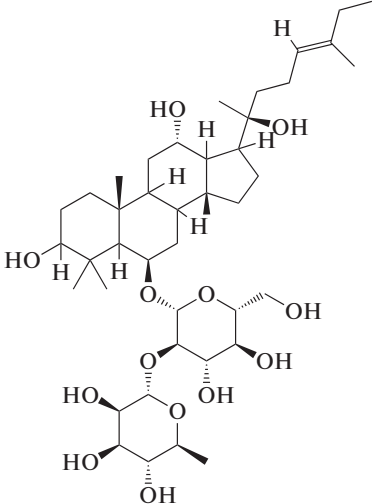
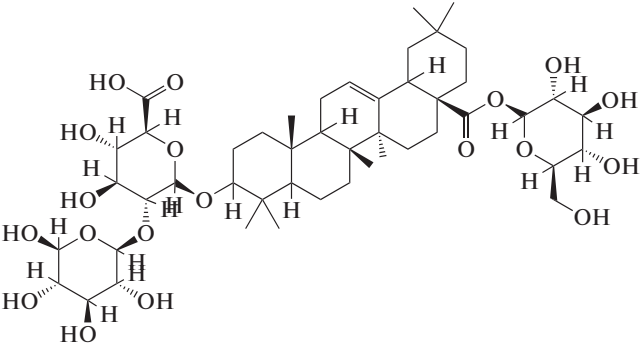
№ пика	Молекулярная формула гинзенозида	Структурная формула
1	Re (C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈)	
2	Rf (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄)	
4	Rg ₂ (C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃)	

Таблица 7. Окончание

№ пика	Молекулярная формула гинзенозида	Структурная формула
7	Ro (C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉)	

повышая эффективность противоопухолевой терапии [33]. В научной литературе также рассматриваются защитные эффекты гинзенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg1 и Re на ишемию миокарда [34] и антидиабетические свойства [35] гинзенозидов Rb1 и Rg1. Поэтому есть основания полагать, что МФА, содержащий идентифицированные гинзенозиды, может обладать аналогичными свойствами. Последнее может стать предметом будущих исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод тандемной масс-спектрометрии ВЭЖХ/МС-МС был успешно применен для определения Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro гинзенозидов в качестве составляющих оригинальной фармацевтической композиции “Мультифитоадаптоген”. Хроматограммы и спектры, полученные в ходе исследования, могут быть использованы для стандартизации МФА. Результаты также важны для обоснования биологической активности МФА с учетом составляющей группы гинзенозидов. Кроме того, на основе известной биологической активности идентифицированных гинзенозидов могут быть предсказаны новые свойства МФА, что может служить предметом будущих исследований. Вместе с тем показана возможность стандартизации комплексных фитопрепаратов, в состав которых входят соединения из группы тритерпеновых гликозидов.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов Комиссии по биомедицинским инновациям и технологиям Министерства науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Вершинская А.А., Барышникова М.А., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Киселевский М.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 1) // Росс. биотерапевтический журн. 2020. Т. 19. № 2. С. 13. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Verzhinskaya A.A., Baryshnikova M.A., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Kiselevsky M.V. et al. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 1) // Russ. Biother. J. 2020. V. 19. № 2. P. 13.]
2. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Вершинская А.А., Барышникова М.А., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Киселевский М.В. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 2) // Росс. биотерапевтический журн. 2020. Т. 19. № 3. С. 12. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Verzhinskaya A.A., Baryshnikova M.A., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Kiselevsky M.V. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 2) // Russ. Biother. J. 2020. V. 19. № 3. P. 12.]
3. Liu T., Zhao L., Hou H. et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 suppresses ovarian cancer migration via hypoxia-inducible factor 1 alpha and nuclear factor-kappa B signals // Tumor Biol. 2017. V. 39. № 5. <https://doi.org/10.1177/1010428317692225>
4. Vinh L.B., Park J.U., Duy L.X. et al. Ginsenosides from Korean red ginseng modulate T cell function via the regulation of NF-AT-mediated IL-2 production // Food Sci. Biotechnol. 2019. V. 28. № 1. P. 237. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0428-8>
5. Meng Q., Pan J., Liu Y. et al. Anti-tumour effects of polysaccharide extracted from *Acanthopanax senticosus* and cell-mediated immunity // Exp. Ther. Med. 2018. V. 15. № 2. P. 1694. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5568>
6. Le H.T., Nguyen H.T., Min H.Y., Hyun S.Y., Kwon S., Lee Y., Van Le T.H., Lee J., Park J.H., Lee H.-Y. Panaxynol, a natural Hsp90 inhibitor, effectively targets both lung cancer stem and non-stem cells // Cancer Lett. (N. Y., NY, U. S.). 2018. V. 412. P. 297. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.013>

7. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Вершинская А.А., Барышников М.А., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Киселевский М.В., Матвеев В.Б. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомплексов // Росс. биотерапевтический ж. 2020. Т. 19. № 4. С. 35. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Verzhinskaya A.A., Baryshnikova M.A., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Kiselevsky M.V., Matveev V.B. Research of new phytoadaptogens and possibilities of herbal formulas application // Russ. Biother. J. 2020. V. 19. № 4. P. 35.]
8. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П., Бочаров Е.В., Быков В.А. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс-40 // Завод. лаб. Диагн. матер. 2006. Т. 72. № 8. С. 15. [Sheychenko V.I., Bocharova O.A., Sheychenko O.P., Bocharov E.V., Bykov V.A. Analytical capabilities of the NMR method for determining the components of Phitomix-40 // Ind. Lab. Diagn. Mater. 2006. V. 72. № 8. P. 15.]
9. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И., Толкачев О.Н., Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Быков В.А. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата “Фитомикс-40” // Вопр. биол., мед. фарм. хим. 2007. Т. 5. № 2. С. 20. [Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Sheychenko V.I., Tolkaichev O.N., Bocharov E.V., Karpova R.V., Bykov V.A. Possibility of using electronic absorption spectra for standardization of the multicomponent preparation “Phytomix-40” // Probl. Biol., Med. Pharm. Chem. 2007. V. 5. № 2. P. 20.]
10. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А., Уютова Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В., Бочаров Е.В., Быков В.А. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ // Вопр. биол., мед. фарм. хим. 2012. Т. 10. С. 52. [Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Kravivkin B.A., Uyutova E.V., Karpova R.V., Kazeev I.V., Bocharov E.V., Bykov V.A. Investigation of complex phytoadaptogen by HPLC // Probl. Biol., Med. Pharm. Chem. 2012. V. 10. P. 52.]
11. Казеев И.В., Бочарова О.А., Шевченко В.Е., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Уютова Е.В., Шейченко О.П., Кучеряну В.Г., Барышников М.А. Тандемная масс-спектрометрия в технологии определения аралозидов композиции фитоадаптогенов // Теор. осн. хим. технол. 2020. Т. 54. № 6. С. 733. [Kazeev I.V., Bocharova O.A., Shevchenko V.E., Karpova R.V., Bocharov E.V., Uyutova E.V., Sheychenko O.P., Kucheryanu V.G., Baryshnikova M.A. Tandem mass spectrometry in the technology of determining aralosides of phytoadaptogene compositions // Theor. Found. Chem. Eng. 2020. V. 54. № 6. P. 1242.]
12. Mancuso C., Santangelo R. *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: From pharmacology to toxicology // Food Chem. Toxicol. 2017. V. 107. Part A. P. 362. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.019>
13. Taira S., Uematsu K., Kaneko D., Katano H. Mass spectrometry imaging: applications to food science // Anal. Sci. 2014. V. 30. № 2. P. 197.
14. Liu Z., Li Y., Li X., Ruan C.-C., Wang L.-J., Sun G.-Z. The effects of dynamic changes of malonyl ginsenosides on evaluation and quality control of *Panax ginseng* C.A. Meyer // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. V. 64–65. P. 56.
15. Morinaga O., Uto T., Yuan C.S. et al. Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts // Fitoterapia. 2010. V. 81. № 4. P. 284.
16. Zhao Q., Zheng X., Jiang J. et al. Determination of ginsenoside Rg3 in human plasma and urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2010. V. 878. № 24. P. 2266.
17. Lee S.M., Bae B.-S., Park H.-W., Ahn N.-G. et al. Characterization of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer): History, preparation method, and chemical composition // J. Ginseng Res. 2015. V. 39. № 4. P. 384. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.04.009>
18. Lv W.J., Liu C., Li Y.F., Chen W.Q. et al. Systems Pharmacology and Microbiome Dissection of Shen Ling Bai Zhu San Reveal Multiscale Treatment Strategy for IBD // Oxid. Med. Cell. Longevity. 2019. V. 2019. Article number 8194804. <https://doi.org/10.1155/2019/8194804>
19. Shi Z.Y., Zeng J.Z., Wong A.S.T. Chemical Structures and Pharmacological Profiles of Ginseng Saponins // Molecules. 2019. V. 24. № 13. P. 2443. <https://doi.org/10.3390/molecules24132443>
20. Nguyen N.H., Nguyen C.T. Pharmacological effects of ginseng on infectious diseases // Inflammopharmacology. 2019. V. 27. № 5. P. 871. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00630-4>
21. Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V., Il'Enko V.A., Kazeev I.V., Baryshnikov A.Y. Integrins LFA-1 and Mac-1 and cytokines IL-6 and IL-10 in high-cancer mice under influence of phytoadaptogen // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. V. 157. № 2. P. 258. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2539-4>
22. Kim D.H., Kim D.W., Jung B.H., Lee J.H., Lee H., Hwang G.S., Kang K.S., Lee J.W. Ginsenoside Rb2 suppresses the glutamate-mediated oxidative stress in neuronal cell // J. Ginseng Res. 2019. V. 43. № 2. P. 326. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.12.002>
23. Chen J., Li M., Qu D., Sun Y. Neuroprotective Effects of Red Ginseng Saponins in Scopolamine-Treated Rats and Activity Screening Based on Pharmacokinetics // Molecules. 2019. V. 24. № 11. P. 2136. <https://doi.org/10.3390/molecules24112136>
24. Alessio N., Capasso S., Di Bernardo G., Cappabianca S., Casale F., Calarco A., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U. Mesenchymal stromal cells having inactivated RB1 survive following low irradiation and accumulate damaged DNA: Hints for side effects following radiotherapy // Cell Cycle. 2017. V. 16. № 3. P. 251. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1175798>
25. Tian Y.Z., Liu Y.P., Tian S.C., Ge S.Y., Wu Y.J., Zhang B.L. Antitumor activity of ginsenoside Rd in gastric cancer via up-regulation of Caspase-3 and Caspase-9 // Pharmazie. 2020. V. 75. № 4. P. 147. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.9931>
26. Bocharova O.A., Davydov M.I., Klimenkov A.A., Baryshnikov A.Y., Karpova R.V., Chulkova S.V., Gorozhanskaya E.G., Ilyenko V.A. Prospects of using

- phytoadaptogen in the treatment of diffuse stomach cancer // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 148. № 1. P. 82.
27. *Lee D.G., Jang S.I., Kim Y.R., Yang K.E., Yoon S.J., Lee Z.W., An H.J., Jang I.S., Choi J.S., Yoo H.S.* Anti-proliferative effects of ginsenosides extracted from mountain ginseng on lung cancer // *Chin. J. Integr. Med.* 2016. V. 22. № 5. P. 344.
<https://doi.org/10.1007/s11655-014-1789-8>
28. *Phi L.T.H., Sari I.N., Wijaya Y.T., Kim K.S., Park K., Cho A.E., Kwon H.Y.* Ginsenoside Rd Inhibits the Metastasis of Colorectal Cancer via Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Axis // *IUBMB Life.* 2019. V. 71. № 5. P. 601.
<https://doi.org/10.1002/iub.1984>
29. *Zhou X., Liu H., Zhang M., Li C., Li G.* Spectrum-effect relationship between UPLC fingerprints and anti-lung cancer effect of *Panax ginseng* // *Phytochem. Anal.* 2020. V. 32. № 3. P. 339.
<https://doi.org/10.1002/pca.2980>
30. *Liu G.M., Lu T.C., Sun M.L., Jia W.Y., Ji X., Luo Y.G.* Ginsenoside Rd Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Up-Regulating the Expression of miR-144-5p // *Biol. Pharm. Bull.* 2020. V. 43. № 10. P. 1534.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00338>
31. *Zhang E., Shi H., Yang L., Wu X., Wang Z.* Ginsenoside Rd regulates the Akt/mTOR/p70S6K signaling cascade and suppresses angiogenesis and breast tumor growth // *Oncol. Rep.* 2017. V. 38. № 1. P. 359.
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5652>
32. *Zheng S.W., Xiao S.Y., Wang J., Hou W., Wang Y.P.* Inhibitory Effects of Ginsenoside Ro on the Growth of B16F10 Melanoma via Its Metabolites // *Molecules.* 2019. V. 24. № 16. P. 2985.
<https://doi.org/10.3390/molecules24162985>
33. *Chian S., Zhao Y., Xu M., Yu X., Ke X., Gao R., Yin L.* Ginsenoside Rd reverses cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer A549 cells by downregulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway // *Anti-Cancer Drugs.* 2019. V. 30. № 8. P. 838.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000781>
34. *Wang J., Wang H., Mou X., Luan M., Zhang X., He X., Zhao F., Meng Q.* The Advances on the Protective Effects of Ginsenosides on Myocardial Ischemia and Ischemia-Reperfusion Injury // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2020. V. 20. № 16. P. 1610.
<https://doi.org/10.2174/1389557520666200619115444>
35. *Bai L., Gao J., Wei F., Zhao J., Wang D., Wei J.* Therapeutic Potential of Ginsenosides as an Adjuvant Treatment for Diabetes // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 423.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00423>