

ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИИ И РАЦИОНАЛЬНОГО ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ

УДК 577.13+576.535.2

Д. В. Кочкин, А. М. Носов

КИСЛЫЕ ЭФИРЫ ГИНЗЕНОЗИДОВ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS VAR. REPENS*

Впервые с помощью ВЭЖХ-УФ-анализа показано накопление кислых нестабильных эфиров основных гинзенозидов в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus var. repens*. На основании данных хроматографии доказано наличие малонил-гинзенозида Rb_1 в биомассе культуры клеток *in vitro* данного вида женьшеня.

Ключевые слова: культура клеток *in vitro*, ВЭЖХ, *Panax japonicus*, малонил-гинзенозиды, малонил-гинзенозид Rb_1 .

Введение. Более полувека прошло с момента открытия гинзенозидов – тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда – основных биологически активных веществ женьшеня (род *Panax* L.). За это время достигнуты немалые успехи в изучении накопления этих соединений *in vivo* и *in vitro*. Так, из различных представителей рода выделены и охарактеризованы более 150 индивидуальных гинзенозидов, многие из которых являются либо минорными соединениями, либо нестабильными ацильными производными мажорных компонентов [1]. Более того, благодаря совершенствованию методов практической фитохимии существующие представления о композиционном составе нативных гликозидов женьшеня постоянно приходится пересматривать. Например, еще 20 лет назад в литературе бытовало мнение, что кислые эфиры основных гинзенозидов являются минорными компонентами гликозидной фракции корней женьшеня [2]. В настоящее время установлено, что более 50 % от суммы гинзенозидов в интактном корне *Panax ginseng* С. А. Меу. могут составлять нестабильные эфиры гинзенозидов (прежде всего Rb_1) с малоновой кислотой [3].

Несомненные успехи в изучении гинзенозидов в растениях женьшеня *in vivo* резко контрастируют с достижениями в исследовании этих природных соединений в культурах клеток *in vitro*. Особенно остро существующая асимметрия данных по химии женьшеня *in vivo* и *in vitro* проявляется в свете того, что многие виды рода *Panax* давно являются классическими объектами различного рода биотехнологий [4]. Подавляющее число работ, посвященных культурам клеток разных видов женьшеня, ограничиваются рассмотрением различных аспектов накопления в условиях *in vitro* только семи основных нейтральных гинзенозидов (на рис. 1 обозначены как Rg_1 , Re, Rf, Rb_1 , Rc, Rb_2 и Rd), коммерческие стандартные образцы которых легко доступны [5, 6].

Между тем, возможность формирования в различных системах клеток и тканей растений *in vitro* сложного паттерна гинзенозидов, весьма характерного для интактного растения женьшеня, остается обойденной вниманием исследователей. При этом следует заметить, вопрос об образовании минорных и нестабильных гинзенозидов в условиях стерильной культуры имеет не только фундаментальное, но и вполне конкретное практическое значение. Доказательством этому служат опубликованные в последнее десятилетие работы по молекулярной медицине женьшеня, основной вывод которых заключается в том, что многие уникальные терапевтические свойства этого растения определяются именно минорными и нестабильными гинзенозидами [7].

Цель настоящей работы заключалась в изучении возможности накопления в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim. ацилированных производных нейтральных гинзенозидов.

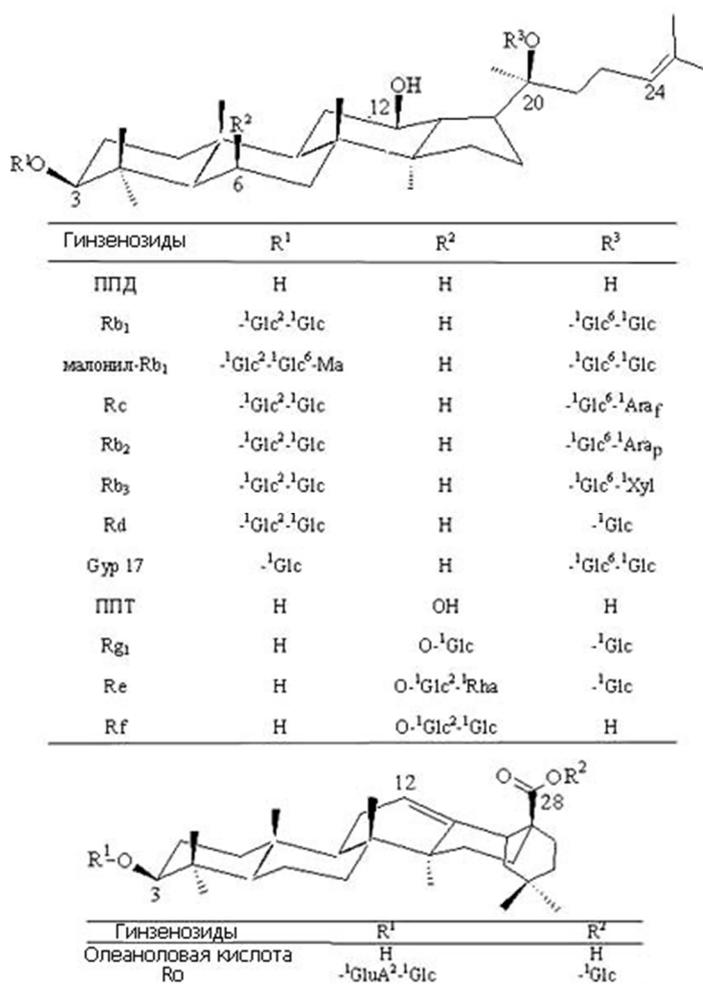


Рис. 1. Структурные формулы основных тритерпеновых гликозидов растений рода *Panax* L. ППД: 20(S)-протопанаксадиол; ППТ: 20(S)-протопанаксатриол; Glc: β -D-glucopyranosyl; Ara(f): α -D-arabinofuranosyl; Rha: α -L-rhamnopyranosyl; Xyl: β -D-xylopyranosyl; GluA: β -D-glucuronopyranosyl

Условия эксперимента. Объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim., зарегистрированная во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (РККК ВР) под № 62. Условия выращивания культуры описаны ранее [8]. Для хроматографического анализа использовали воздушно-сухую биомассу культуры на 21 сутки роста.

В качестве стандартных образцов использовали гинзенозиды Rg₁, Re, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃ (Sigma, США) и R₀ (ТИБОХ ДВО РАН, Россия) и гипенозид XVII (Гур 17, получен в нашей лаборатории).

ВЭЖХ проводили на приборе Perkin Elmer Series 200 (PerkinElmer, США), укомплектованном вакуумным дегазатором, бинарным градиентным насосом, автоматическим инжектором и спектрофотометрическим детектором. Сбор и анализ данных проводили с помощью программы TotalChrom (PerkinElmer, США). Разделение гинзенозидов осуществляли на колонке Hypersil BDS C18 (250×4,6 мм, 5 мкм, Thermo Hypersil-Keystone Inc., США) при 25°C, скорости потока элюента 1 мл/мин и детектировании при длине волны 207 нм. Элюирование анализов с колонки осуществляли в градиентном режиме смесью ацетонитрил – вода с добавлением различных модификаторов (КН₂РО₄, Н₃РО₄). Состав подвижной фазы (ацетонитрил, % по объему) менялся в соответствии со следующими условиями:

система 1 – 0 мин 15 %, 5 мин 18 %, 17 мин 21 %, 32 мин 27 %, 57 мин 37 %, 64 мин 45 %, 69 мин 55 %, 71 мин 90 %, 76 мин 90 %;

система 2 – 0 мин 28 %, 2,5 мин 29 %, 13,5 мин 34 %, 24,5 мин 39 %, 29,5 мин 43 %, 30 мин 90 %, 32,5 мин 90 %.

Наличие нестабильных эфиров гинзенозидов определяли с помощью обработки щелочью спиртового экстракта биомассы клеток с известным профилем ВЭЖХ. Использовали 5 мМ раствор КОН в этаноле, обработку проводили в течение 10 мин при комнатной температуре. После завершения омыления раствор нейтрализовали ледяной уксусной кислотой (контроль рН по универсальной индикаторной бумаге, Реахим, Россия) и использовали для ВЭЖХ.

Подготовка проб для анализа. 20 мг воздушно-сухой биомассы культуры клеток экстрагировали смесью метанол : вода (95:5 по объему) в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ УХ 3560, GXET LTD, КНР) при комнатной температуре. Затем полученный экстракт центрифугировали 6 мин при 3900 g (Микроцентрифуга МЦФ, Россия). Супернатант фильтровали через нейлоновой фильтр с порами 0,2 мкм (Acrodisc, Германия). Полученную пробу использовали для ВЭЖХ.

Смесь кислых гинзенозидов получали путем грубого фракционирования спиртового экстракта биомассы культуры клеток. Для этого 10 г спиртового экстракта, полученного по общепринятой методике [9] из 500 г биомассы, растворяли в минимальном объеме воды и наносили на колонку, содержащую 150 г крупнопористого сорбента Extrelut (Merck, Германия). Для извлечения неполярных и слабополярных нейтральных гинзенозидов колонку промывали 300 мл н-бутанола. Оставшиеся на колонке полярные (в том числе кислые) соединения смывали 250 мл этанола. Полученную фракцию упаривали под вакуумом при 40°C и использовали для хроматографического анализа.

Результаты и обсуждение. ВЭЖХ-профиль спиртового экстракта из биомассы культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens*, полученный при элюировании подвижной фазой с нейтральным рН (ацетонитрил – вода), представлен на рис.2. Сопоставление времен удерживания обнаруженных на хроматограмме пиков и доступных стандартных образцов гинзенозидов позволило заключить, что в спиртовом экстракте биомассы *P. japonicus* присутствуют девять основных нейтральных гинзенозидов (Re, Rg₁, Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd и Гур XVII). Кроме того, среди компонентов хроматографического паттерна также обнаруживались четыре сильно уширенных и плохо разрешенных пика, максимумы которых были зафиксированы на 28,4; 34,9; 35,7 и 40,0 минутах анализа (на рис. 2 обозначены как М 1, М2, М3 и М 4, соответственно).

Элюирование подвижной фазой, составленной из ацетонитрила и 8 мМ водного раствора КН₂РО₄ (рН 4,82), позволило придать данным пикам симметричную форму и добиться их удовлетворительного разрешения (рис. 3, I). Кроме того, использование в качестве модификатора подвижной фазы 8 мМ раствора фосфорной кислоты (рН 2,11) привело к существенному изменению хроматографической картины (рис. 3, II). В данных условиях

наблюдали исчезновение описанных пиков из обычной области их элюирования слабокислым растворителем (12-20 мин, система 2) и одновременное увеличение количества пиков, выходящих из колонки после гинзенозида Rb₁ (21,5-31 мин, система 2).

Описанные факты свидетельствуют, что пики M1–M4 соответствуют соединениям, сродство которых к стационарной обращенной фазе существенно зависит от кислотности подвижной фазы. Согласно опубликованным в периодической печати данным, среди всего многообразия гликозидов женьшеня только две группы соединений характеризуются подобным хроматографическим поведением [10]. Оба этих структурных класса обычно характеризуют как «кислые» гинзенозиды («acidic» ginsenosides). В соответствии с расположением карбоксильной группы в той или иной части молекулы среди кислых гинзенозидов выделяют:

- 1) гликозиды олеаноловой кислоты со свободной карбоксильной группой агликона и/или глюкуроновой кислоты;
- 2) сложноэфирные конъюгаты нейтральных гинзенозидов с двухосновной малоновой кислотой.

Сопоставление хроматографической подвижности соединения M1 и стандарта гинзенозида R₀, имеющего свободную карбоксильную группу в остатке глюкуроновой кислоты, показало, что данные соединения идентичны. Кроме того, порядок элюирования соединений M2–M4 позволяет, опираясь на данные литературы [11, 12], высказать предположение о том, что эти пики соответствуют малонильным эфирам гинзенозидов Rb₁, R_c и R_d.

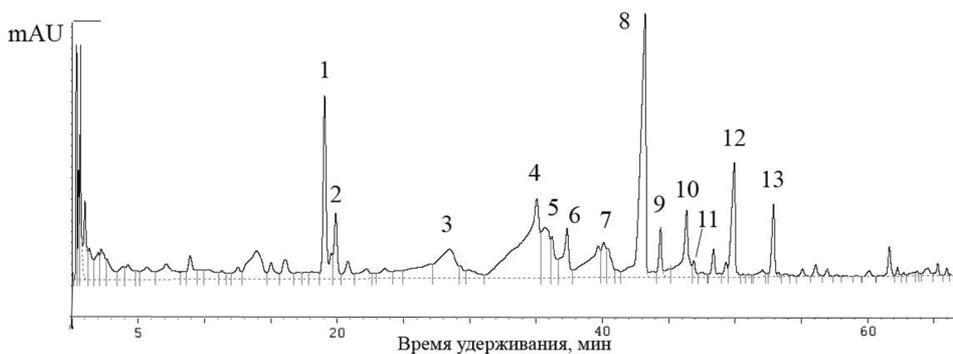


Рис. 2. ВЭЖХ-профиль спиртового экстракта биомассы *P. japonicus* var. *repens*, подвижная фаза с нейтральным pH, система 1. Обозначение пиков: (1) Rg₁, (2) Re, (3) M1, (4) M2, (5) M3, (6) Rf, (7) M4, (8) Rb₁, (9) R_c, (10) Rb₂, (11) Rb₃, (12) R_d, (13) Гур XVII

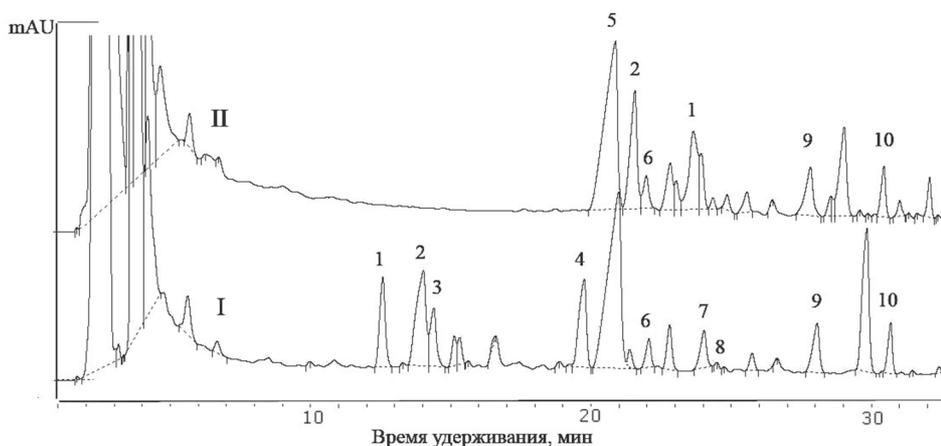


Рис. 3. ВЭЖХ-профиль спиртового экстракта биомассы *P. japonicus* var. *repens*, подвижная фаза с pH 4,8 (I) и 2,1 (II), система 2. Обозначение пиков: (1) M1, (2) M2, (3) M3, (4) M4, (5) Rb₁, (6) R_c, (7) Rb₂, (8) Rb₃, (9) R_d, (10) Гур XVII

В ряде публикаций для обнаружения в экстрактах различных образцов женьшеня ацильных производных гинзенозидов был предложен косвенный метод [10], основанный на крайней нестабильности данных соединений, чувствительных к любым экстремальным воздействиям (умеренное нагревание или мягкий щелочной гидролиз).

В наших экспериментах по обработке спиртового экстракта биомассы *P. japonicus* раствором щелочи было показано исчезновение из ВЭЖХ-профиля соединений M2–M4, в то же время наблюдалось увеличение площадей пиков гинзенозидов Rb₁, Rc и Rd. Эти результаты можно рассматривать в качестве косвенных доказательств того, что пики M2–M4 соответствуют восприимчивым к нуклеофильной атаке конъюгатам нейтральных гинзенозидов. А это, в свою очередь, подтверждает высказанное ранее предположение.

Более точное подтверждение принадлежности данных ацильных производных к тем или иным нейтральным гинзенозидам предполагает их получение в индивидуальном виде. Однако среди компонентов M2–M4 только M2 содержался в биомассе в количествах, достаточных для препаративного выделения. Существенные различия полярности нейтральных и кислых гинзенозидов определяют особенности их распределения в гетерогенных системах, таких как несмешивающиеся органический растворитель и вода. Использование этого свойства гликозидов дало возможность с помощью системы *n*-бутанол – вода получить из суммы гликозидов культуры клеток *P. japonicus* фракцию, обогащенную кислыми гликозидами, ВЭЖХ-профиль которой приведен на рис. 4, I.

Представленная хроматограмма свидетельствует, что из исходной смеси гинзенозидов в данной фракции присутствовали только гинзенозид R₀ и компоненты M2 и M3, причем M2 являлся мажорным компонентом. Мягкий щелочной гидролиз данной фракции (рис. 4, II) приводил к образованию в качестве основного продукта соединения, идентичного по удерживанию стандарту гинзенозида Rb₁.

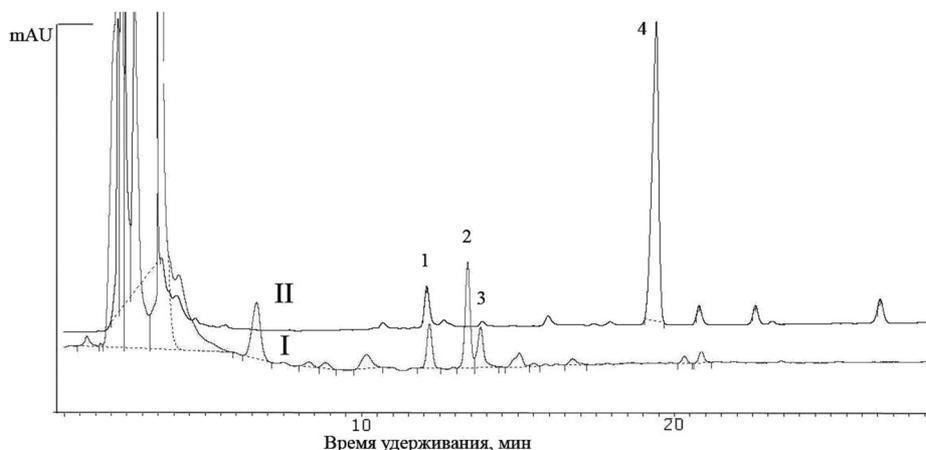


Рис. 4. ВЭЖХ-профиль фракции кислых гликозидов из биомассы *P. japonicus* var. *repens*, до (I) и после (II) обработки спиртовым раствором щелочи, подвижная фаза с pH 4,8, система 2.
Обозначение пиков: (1) R₀, (2) M2, (3) M3, (4) Rb₁

Выводы. Изложенные результаты показывают, что компонент M1 является кислым производным гинзенозида Rb₁, который легко разрушается в щелочных условиях. В настоящее время в природе известно только одно соединение, соответствующее этому описанию – малонильный эфир гинзенозида Rb₁ [1].

В заключение следует заметить, что сообщений о возможности образования малонильных эфиров гинзенозидов в культуре клеток *in vitro* в открытой печати не обнаружено. Таким образом, впервые с помощью ВЭЖХ-УФ-анализа показано накопление кислых нестабильных эфиров основных гинзенозидов в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus*. При этом, на основе данных хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения доказано наличие малонил-гинзенозида Rb₁ в биомассе культуры клеток *in vitro* данного вида женьшеня.

Список литературы

1. Christensen, L.P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects / L.P. Christensen // Adv. Food Nutr. Res. – 2008. – V. 55. – P. 1–99.
2. Court, W.E. The principal active chemicals in *Panax* species / W.E. Court // Ginseng: The Genus *Panax*. [ed Court W.E.]. – New York : Harwood Academic Publishers, 2000. – P. 551–16.
3. Kite, G.C. Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng / G.C. Kite, M.-J.R. Howes, C.J. Leon, M.S.J. Simmonds // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – V. 17. – P. 238–244.
4. Wu, J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects / J.Wu, J.J. Zhong // J. Biotechnol. – 1999. – V. 68. – P. 89–99.
5. Решетняк, О.В. Изменение состава и соотношения гинзенозидов в биомассе каллусной и суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens* / О.В. Решетняк, И.Е. Князьков, И.Н. Смоленская и др. // Биотехнология. – 2003. – № 2. – С. 69–75.
6. Kochan, E. Dynamics of ginsenoside biosynthesis in suspension culture of *Panax quinquefolium* / E. Kochan, A. Chmiel // Acta Physiol. Plant. – 2011. – V. 33. – P. 911–915.
7. Leung, K.W. Pharmacology of ginsenosides: a literature review / Leung, K.W., Wong A.S.T. // Chin. Med. – 2010. – V. 5. – P. 20.
8. Смоленская, И.Н. Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* 1. Параметры роста и цитогенетические характеристики / И.Н. Смоленская, С.Э. Заринянец, Ю.Н. Смирнова, и др. // Биотехнология. – 2005. – № 5. – С. 21–28.
9. Qi, L.-W. Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges / L.-W. Qi, Wang, C.-Z., Yuan, C.-S. // Nat. Prod. Rep. – 2011. – V. 28. – P. 467–495.
10. Fuzzati, N. Analysis methods of ginsenosides / N. Fuzzati // Journal of Chromatography B. – 2004. – V. 812. – P. 119–133.
11. Hu, P. The retention behavior of ginsenosides in HPLC and its application to quality assessment of radix ginseng / P. Hu, G.-A. Luo, Q. Wang, Z.-Z. Zhao, W. Wang, Z.-H. Jiang // Arch Pharm. Res. – 2008. – V. 31. – P. 1265–1273.
12. Li, S.-L. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du–Shen–Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC–Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach / S.-L. Li, S.-F. Lai, J.-Z. Song, C.-F. Qiao, X. Liu, Y.Z.H. Cai, B.-C. Cai, H.-X. Xu // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2010. – V. 53. – P. 946–957.

Статья поступила в редакцию 15.10.11.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7050 от 29 июля 2011 г.) и Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.M04.12.0003) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «МарГТУ».

D. V. Kochkin, A. M. Nosov

GINSENOIDES ACIS ESTERS IN SUSPENSION CULTURE
OF *PANAX JAPONICUS* VAR. *REPENS* CELLS

*Accumulation of acid unstable esters of the basic ginsenosides in suspension culture of *Panax japonicus* var. *Repens* cells is for the first time shown with the help of HPLC-hydrocarbon-analysis. On the basis of chromatography data malonyl- ginsenoside Rb₁ presence in the biomass of cell culture in vitro of this kind of ginseng is proven.*

Key words: cell culture in vitro, HPLC, *Panax japonicas*, malonyl- ginsenosides, malonyl- ginsenoside Rb₁.

КОЧКИН Дмитрий Владимирович – научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Область научных интересов – физиология растений.

E-mail: info@mail.bio.msu.ru

НОСОВ Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений МГУ им. Ломоносова, зав. отделом биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биотехнология. Автор более 100 публикаций.

E-mail: amn@ippras.ru