

УДК 581.1

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИНЗЕНОЗИДОВ В МОРФОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО (*Panax ginseng* С.А. Meyer)¹

© 2023 г. Т. Ю. Горпенченко^{а, *}, В. П. Григорчук^а, В. В. Маханьков^б, Д. В. Кочкин^{с, д}, Ю. В. Воложанина^а, М. Т. Ханды^а, Г. К. Чернодед^а, Ю. Н. Журавлев^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук”, Владивосток, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^дФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: gorpenchenko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Методом ВЭЖХ-МС определен состав тритерпеновых гликозидов в разных тканях клеточных линий (PgR – ризогенная и PgG – геммогенная) *in vitro* и корней интактных растений женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С.А. Meyer), выращиваемых на плантациях в Приморском крае Российской Федерации. Обнаружено и охарактеризовано более 60 тритерпеновых гликозидов. Максимальное содержание гинзенозидов идентифицировано в листьях геммогенной линии. Общее количество гинзенозидов в эмбриональной ткани линии PgG было ниже, по сравнению со всеми другими исследованными образцами, в основном, за счет количества протопанаксадиолов. Во всех частях линии PgR содержание протопанаксатриола Re было в два раза выше, по сравнению с корнем интактного растения. В базальной части каллусов PgR и PgG обнаружено высокое содержание протопанаксатриолов и олеаноловых гинзенозидов. Таким образом, морфогенные клеточные линии повторяют не только паттерн качественного состава гинзенозидов, по сравнению с отдельными частями нативных корней и листьев, но и увеличивают их разнообразие и количество.

Ключевые слова: *Panax ginseng*, гинзенозиды, женьшень, культура клеток растений, морфогенная культура, тритерпеновые гликозиды

DOI: 10.31857/S0015330323601036, EDN: ATLJPG

ВВЕДЕНИЕ

Женьшень настоящий (*Panax ginseng* С.А. Meyer) является одной из визитных карточек Дальнего Востока России. Несомненна его роль и в экономике Азиатско-Тихоокеанского региона, как ценного лекарственного и промышленного растения [1]. На рынок продукции с добавлением экстрактов женьшеня постоянно выходят новые товары как отечественного, так и зарубежного производства. Для женьшеня характерными и основными биологически активными веществами являются тритерпеновые гликозиды (сапонины), имеющие общее групповое наименование — гин-

зенозиды. Гинзенозиды обладают различными терапевтическими эффектами: противовоспалительным, противоаллергическим, антиоксидантным, антидиабетическим и противоопухолевым [2, 3]. На сегодняшний день известно более 300 различных гинзенозидов из разных видов женьшеня [2, 3]. Основное значение имеют гинзенозиды с тетрациклическими агликонами даммаранового ряда — 20(S)-протопанаксадиолом (PPD) и 20(S)-протопанаксатриолом (PPT), и производные окотиллола (Oct) — продукта дополнительной модификации боковой цепи даммаранового скелета [3]. Кроме того, фармакологически важными являются тритерпеновые гликозиды, имеющие пентациклический агликон — олеаноловая кислота (Ole) [3, 4]. В современной медицине при разработке фармакологических препаратов ис-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323601036 для авторизованных пользователей.

пользуется одно активное вещество, чье действие тщательно исследуется на протяжении долгого периода времени. В случае женьшеня, исследования обычно сосредоточены на изучении одного определенного вещества из группы гинзенозидов для выявления механизмов, определяющих его терапевтическую активность [3]. В этом случае возникает проблема выделения индивидуальных гинзенозидов в количествах, достаточных для биологических испытаний.

У растений биосинтез и накопление вторичных метаболитов связаны с различными типами клеток, включая эпидермис, эндодерму, перicycle, паренхиму флоэмы, ситовидные элементы флоэмы и клетки-компаньоны, специализированный мезофилл и др. В настоящее время для фитохимического анализа тритерпеновых гликозидов в образцах цветочных бутонов, листьев, корневищ и корней интактных растений *Panax spp.* в основном используются различные варианты жидкостной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ- или УВЭЖХ-МС и т.д.) [5–8]. Только использование таких чувствительных и селективных методов как, например, ВЭЖХ-МС позволяет продуктивно и точно проводить рутинный анализ разных образцов женьшеня и продуктов из него, каждый из которых может содержать десятки (а в некоторых случаях и сотни) индивидуальных гинзенозидов [2, 9].

Культивируемые *in vitro* растительные клетки являются альтернативой плантационным и дикорастущим растениям, используемым для получения конечного продукта — очищенных биологически активных веществ, индивидуальных или в составе смесей. В асептических условиях также можно культивировать сами растения (микрорклоны), ткани или органы растений, в которых накапливаются целевые метаболиты. Например, известны случаи промышленного использования культур корней разных видов *Panax* для получения гинзенозидов [9, 10], микрорклонов *Trigonella spp.* — для наработки производных диосгенина, листьев *Catharanthus roseus* — для выделения винбластина, культуры клеток *Dioscorea deltoidea* — для получения стероидных гликозидов [11, 12]. Особый интерес представляют разные варианты культур клеток растений — наиболее универсальный и разнообразный тип культивируемых *in vitro* растительных объектов. Известно, что качественный и количественный состав вторичных метаболитов в культивируемых *in vitro* дедифференцированных растительных клетках отличается от интактных растений [11, 13]. Культуры клеток могут различаться по типу выращивания (каллусные, суспензионные), продолжительности выращивания и физиологическим характеристикам (первичные, “молодые”, длительно выращиваемые культуры), по способу выращивания

(выращивание в колбах, биореакторах) и т.д. При этом каждый из вариантов культур клеток растений обладает своими уникальными свойствами и физиолого-биохимическими особенностями. Такое разнообразие культур клеток растений представляет уникальную возможность для самых разных фундаментальных, практико-ориентированных исследований и создания новых технологий в области изучения биологически активных веществ растений.

Методы биотехнологии позволяют получить клеточные линии с преобладанием конкретных групп вторичных метаболитов, изучать и направлять процессы биосинтеза и накопления этих веществ [9]. В каллусных культурах, состоящих из одного типа клеток, одной из проблем получения целевых метаболитов может быть ограничение, связанное с последовательным биосинтезом вещества: когда предшественник синтезируется в одном органе растения, а затем перемещается в другой для завершения биосинтетических процессов и/или накопления [12]. Это напрямую зависит от направления и характера развития дифференцировки растительных клеток. В таких случаях практически невозможно производство клеточных линий с высоким уровнем накопления конечного вещества, т.к. отсутствуют высокоспециализированные клетки, осуществляющие синтез промежуточных веществ [11]. С другой стороны, в клеточных линиях находят новые вещества и/или формы/производные известных веществ, которые не характерны и/или являются минорными в интактных растениях [14, 15]. Эти особенности клеточных культур требуют детального изучения вторичного метаболизма в различных длительно культивируемых морфогенных клеточных культурах, образующих отдельные ткани и органы.

Большинство работ по морфогенезу в клеточных линиях различных видов женьшеня нацелены на формирование соматических зародышей в культуре тканей для размножения и получения искусственных семян [10]. Исследования геммогенеза *in vitro* также направлены на успешную регенерацию растений женьшеня [10]. Литературные данные по продукции гинзенозидов в геммогенных линиях ограничены [10]. Наибольшее значение для получения высокого выхода гинзенозидов имеет изучение ризогенных клеточных культур при культивировании в биореакторах [10, 16]. В разных работах путем добавления различных элиситоров на разных вариантах питательных сред удалось достичь продукции общего количества основных гинзенозидов до 7.29 мг/г сухого веса и 29-кратного увеличения содержания при контрольных значениях 2.07% [10]. Оценка различных клеточных линий в этом случае велась по основным группам гинзенозидов и отмечена их нестабильность при долговременном культивировании. Только в последнее время появились

работы по поиску и характеристике минорных соединений в длительно культивируемых недифференцированных клеточных линиях различных видов женьшеня [14, 15, 17, 18]. Рассматриваются возможности преобразования основных гинзенозидов в уникальные соединения в бактериальных системах [19]. Эти работы ограничиваются недостатком знаний о продукции редких гинзенозидов не только в клеточных линиях, но и в интактных растениях. В настоящей работе впервые проанализирован качественный и количественный состав тканей и органов длительно культивируемых органогенных клеточных линий женьшеня настоящего, сохраняющих свой морфогенный потенциал, что послужит основой для выделения и анализа минорных гинзенозидов.

Цель работы — определение и анализ содержания гинзенозидов в двух морфогенных клеточных линиях *P. ginseng*, которые поддерживаются в активно растущем состоянии более 6 лет, с помощью ВЭЖХ-МС в сравнении с корнями плантационных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объектов исследования использовали морфогенные клеточные линии PgR (ризогенная) и PgG (геммогенная) *Panax ginseng* С.А. Meyer, культивируемые более 6 лет, а также среднюю часть основных корней 6-летнего растения *P. ginseng*, выращенного на плантациях в Приморском крае РФ и выкопанного в конце августа 2021 г. Суммарные образцы для экстрагирования клеточных линий были отобраны с трех различных пассажей и из средней части трех корней плантационных растений.

Получение культур клеток. Клеточные культуры PgR и PgG были получены в лаборатории биотехнологии в 2017 г. из незрелых завязей женьшеня. Для индукции побегообразования использовали модифицированную питательную среду Chang и Hsing [20], содержащую 1/2 набор макроэлементов, 15 г/л сахарозы, 4.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л ГК₃. Посредством постоянного мониторинга и селекции первичного каллуса и кончиков корней были выделены две морфогенные линии. Линия PgR через четыре месяца после переноса на среду, содержащую 1.0 мг/л индолил-3-масляной кислоты стала образовывать корни. Линия PgG через три месяца после начала формирования почек и листьев была перенесена на среду с фитогормонами (0.5 мг/л БАП и 2.0 мг/л НУК). На момент исследования линии установили стабильные фенотипы, имея сезонные изменения в приросте биомассы, в линии PgR развивались корни, в линии PgG формировались листья.

Условия культивирования. Для культивирования клеточных линий использовали модифици-

рованную МС-среду [21]. Модификация МС-среды заключалась в уменьшении содержания нитрата аммония до 400 мг/л, количества микро- и макроэлементов — в два раза и дополнительном введении в ее состав следующих компонентов: тиамина гидрохлорида (0.2 мг/л), пиридоксина гидрохлорида (0.5 мг/л), никотиновой кислоты (0.5 мг/л), мезоинозита (100 мг/л), пептона (100 мг/л), сахарозы (25–30 г/л), агара (6.0 г/л), а также фитогормонов (4.0 мг/л БАП, 1.0 мг/л ИМК, 2.0 мг/л НУК), pH 5.6–5.8 (до автоклавирования). Каллусные культуры (PgR, PgG) выращивали в колбах объемом 100 мл (объем МС-среды 30 мл) в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$, для PgG использовали 16-часовой фотопериод (освещенность 2500 лк), относительная влажность воздуха 50–70%. Период между пересадками каллусных культур составлял 30 сут. Для пересадки использовали фрагменты каллуса размером $0.8 \pm 0.1 \text{ см}^3$.

Гистологический анализ. Для гистологического исследования фрагменты морфогенных культур величиной не более 0.5 см^3 фиксировали смесью 4% формальдегида (объем 7 мл), этанола 70% (объем 36 мл) и ледяной уксусной кислоты 7 мл (фиксатор ФСУ) путем вакуумной инфильтрации, обезжизивали, заливали парафином. Срезы толщиной 5–10 мкм изготавливали с помощью ротационного микротомы HM 340E (Microm, Thermo Scientific, Великобритания). Окраску срезов проводили по Жинкиной и Вороновой [22]. В качестве красителя использовали альциановый синий и гематоксилин. После гистохимической окраски препараты изучали на световом микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Растворители и стандартные образцы. Ацетонитрил и метанол были получены от Merck (Германия). Муравьиная кислота была приобретена у компании Sigma-Aldrich (Германия). Деионизированную воду очищали с помощью системы очистки воды Milli-Q Simplicity (Millipore, Франция). Стандартные образцы индивидуальных гинзенозидов (G-Rg1, G-Re, G-Rf, NG R2, G-Rb1, G-Rg2, G-Rc, G-Ro, G-Rb2, G-F1, G-Rd, G-F2) для качественного анализа были предоставлены лабораторией органического синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук. Стандартные образцы G-Rg3 и G-Rh1 (Sigma-Aldrich, КНР) использовались для полуколичественной оценки содержания индивидуальных три-терпеновых гликозидов в исследуемых образцах.

Подготовка проб для анализа тритерпеновых гликозидов. Для анализа использовали морфогенные линии на 20 сутки от начала пассажа с трехкратной повторностью и среднюю часть трех разных корней растений, выращенных на планта-

ции. Лиофильно высушенный измельченный растительный материал (100 мг) экстрагировали в 2 мл 80% (по объему) водного метилового спирта в течение 30 мин с использованием ультразвука (Ультразвуковая ванна “Сапфир-28,0 ТТЦ”, Россия) и выдерживали в течение 20 ч при комнатной температуре без доступа света. Затем экстракты центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин (Эппендорф, Германия), собирали супернатант и остаток повторно экстрагировали тем же способом. Супернатанты объединяли, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, Bedford, США) и использовали для анализа.

Аналитическая хроматография и масс-спектрометрия. Профилирование тритерпеновых гликозидов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (ОФ-ВЭЖХ-ВРМС(/МС)) с использованием хромато-масс-спектрометра Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония), оснащенного жидкостным хроматографом высокого давления LC-20A Prominence и гибридным времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Подвижная фаза состояла из растворов муравьиной кислоты (0.1% по объему) в деионизированной воде (А) и ацетонитриле (Б). Разделение компонентов экстрактов проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США), уравновешенной в 10% элюента Б и термостатированной при 30°C. Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0.2 мл/мин по следующей схеме: от 10 до 50% Б за 50 мин, затем от 50 до 95% Б за 10 мин, и 95% Б до 75 мин. Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации электрораспылением и одновременной регистрации отрицательных и положительных ионов с разрешением 12000. Диапазон регистрируемых значений m/z (отношение массы к заряду) составил 400–1500, давление газа осушителя (N_2) – 195 кПа, поток газа распылителя (N_2) – 1.5 л/мин, потенциал ионного источника менялся от –3.8 кВ до 4.5 кВ. Температура интерфейса составляла 200°C. Тандемную масс-спектрометрию проводили с использованием масс-спектрометра низкого разрешения Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия), оснащенного ионной ловушкой, в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных ионов. Сигнал детектора записывали в автоматическом режиме при постоянном напряжении фрагментации 1.4 В.

Полуколичественную оценку содержания индивидуальных гинзенозидов рассчитывали, используя метод внешней калибровки против стандартных образцов гинзенозидов двух эталонных

образцов G-Rg3 и G-Rh1 с концентрацией 100 мкг/мл. Анализ данных и построение диаграмм осуществлялось с помощью пакета программ Microsoft Excel 2016. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с использованием апостериорного критерия защищенной наименьшей значимой разницы (PLSD) Фишера, уровень статистической значимости принимали за $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая и гистологическая характеристика линий PgR и PgG. В течение 6 лет культивирования клеточные линии женьшеня не меняли свой фенотип, характеризуясь только сезонными изменениями в приросте биомассы. В ризогенной линии стабильно формировались корни с участками разрастания недифференцированной массы клеток; из сформированных почек геммогенной линии вырастали листья, периодически формировались соцветия (рис. 1а, 1б).

Линия PgR. Клеточная линия регенерировала корни, не отличающиеся по своей морфологии от трансформированных корней *P. ginseng*, образующихся при культивации на жидких средах [23]. Корни имели светлый оранжево-коричневый цвет и практически не образовывали латеральных корней второго и третьего порядка (рис. 1а). Интересно отметить, что образование корней происходило из апексов более старых корней, на которых формировались утолщения. Это можно объяснить наличием активной меристемы апекса (рис. 1в). Молодые корни имели более светлую окраску. В некоторых случаях начало формирования апекса боковых корней происходило на границе между эндодермой и центральным цилиндром корня, как и у боковых корней интактных растений женьшеня. Внутри корешков находится проводящая ткань (рис. 1д). Основная часть клеток коры корня вакуолизируется и образует межклетники, в которых происходит разрастание каллусной ткани.

Линия PgG. Клеточная линия регенерировала почки, из которых развивались листья с хорошо сформированными черешком и листовой пластинкой (рис. 1б). Размер листьев не превышал 2–3 см. Развитие почек происходило аналогично развитию почек нативного растения первого года. Субэпидермальные клетки меристематической зоны, претерпевая несколько периклинальных и антиклинальных делений, формировали меристематический бугорок на поверхности твердого каллуса. В дальнейшем на нем закладывались листовые примордии (рис. 1г) и апекс будущего побега, образующие почку (рис. 1г). Таким образом, в линии наблюдался постоянный процесс возобновляемого геммогенеза (формирования почек).

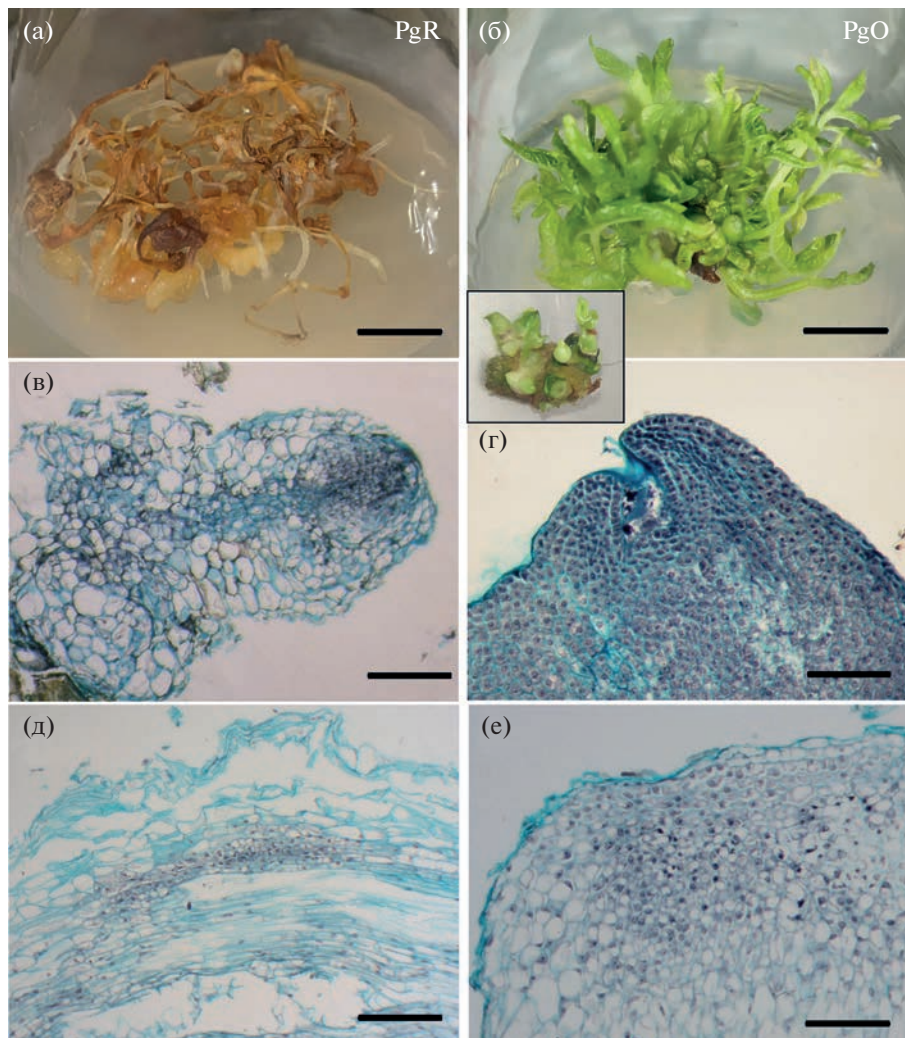


Рис. 1. Морфогенные клеточные линии PgR и PgG *Panax ginseng*: а – внешний вид ризогенной линии PgR, масштаб 1 см; б – внешний вид геммогенной линии PgG, масштаб 1 см; в – гистологический срез апекса корня линии PgR, масштаб 500 мкм; г – гистологический срез почки с примордиями листьев линии PgG, масштаб 500 мкм; д – продольный срез корня с проводящим пучком и меристемными клетками линии PgR, масштаб 500 мкм; е – продольный срез основания каллуса PgG с меристематическими клетками.

Периодически наблюдали формирование цветочных (генеративных) почек и соцветий. С течением времени листья заканчивали вегетацию и отмирали с поверхности основного плотного каллуса, на котором формировались новые почки. Развития корней в линии не происходило. Основание каллуса было представлено плотной тканью, большая часть которой состояла из меристематических клеток, расположенных в субэпидермальном слое (зоны роста будущих почек и листьев) (рис. 1е).

Идентификация гинзенозидов, обнаруженных в морфогенных клеточных линиях женьшеня и нативных плантационных корнях. Более 60 тритерпеновых гликозидов были детектированы и охарактеризованы с использованием ВЭЖХ-МС(/МС) в исследуемых экстрактах нативного корня и морфогенных линий *P. ginseng*. ВР-ВЭЖХ-МС хрома-

тографические профили по полному ионному току показаны на рис. 2.

Первоначально было изучено хроматографическое и масс-спектрометрическое поведение 14 стандартных образцов, из которых 12 (G-Rg1, G-Re, G-Rf, NG-R2, G-Rb1, G-Rg2, G-Rc, G-Ro, G-Rb2, G-F1, G-Rd, G-F2) были ранее выделены и охарактеризованы в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук [24, 25]. Еще два соответствовали двум эталонным стандартам G-Rg3 и G-Rh1 компании Sigma-Aldrich. На этом этапе были оптимизированы параметры ВЭЖХ метода, такие как температура термостата аналитической колонки, состав подвижной фазы и профиль гра-

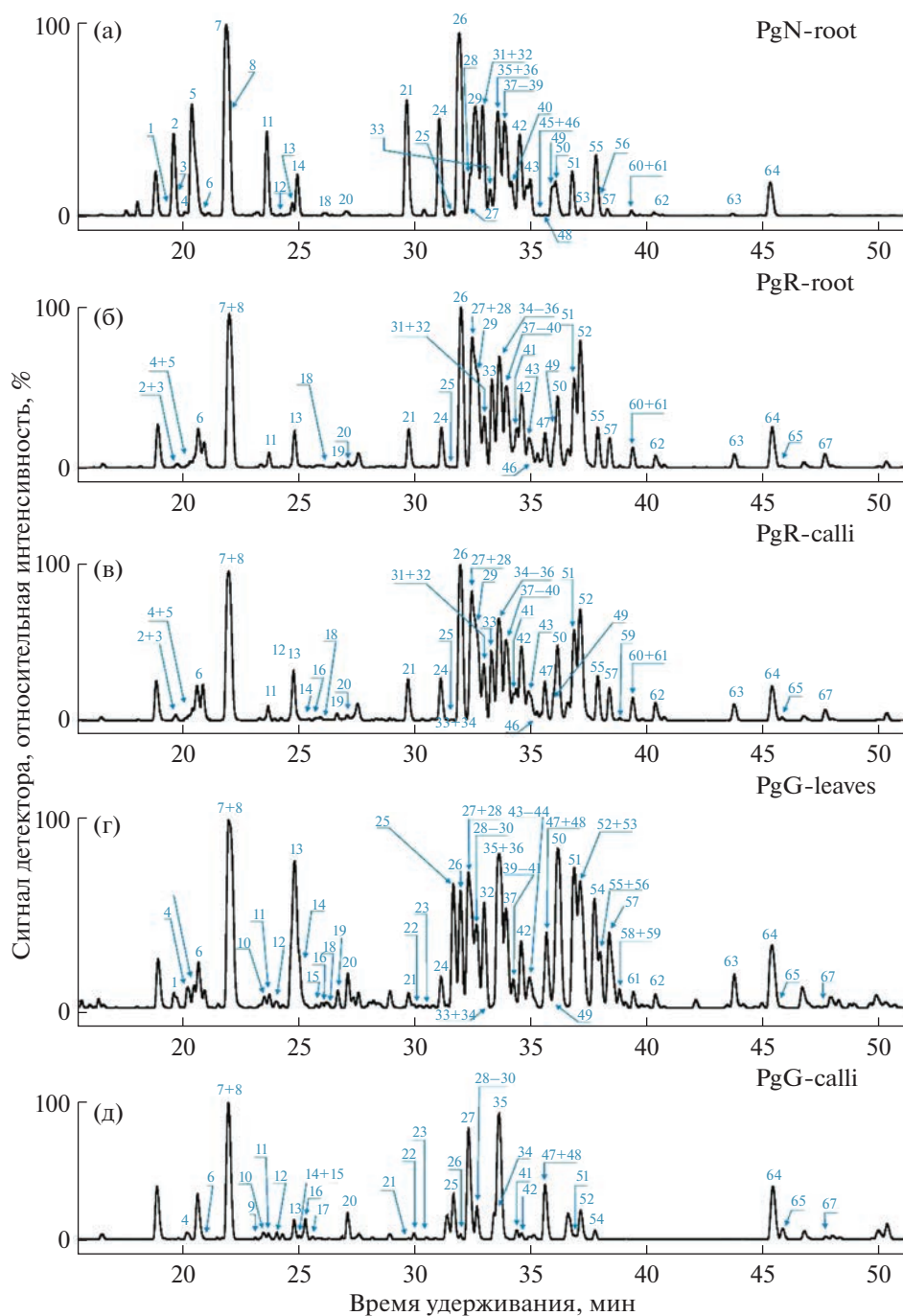


Рис. 2. Хроматографические профили ВЭЖХ-МС анализа (полный ионный ток, регистрация отрицательных ионов) неочищенных метанольных экстрактов из нативных корней и морфогенных линий *Panax ginseng*: а — нативный корень (PgN-root); б — образец PgR-root; в — образец PgR-calli; г — образец PgG-leaves; д — образец PgG-calli. Нумерация пиков на хроматограмме соответствует номерам веществ из табл. 1 (Дополнительные материалы).

диентного элюирования. Муравьиная кислота, используемая как добавка к подвижной фазе, не только улучшила разрешение и форму хроматографических пиков, но также усилила ионизацию, вызвала образование ионов-аддуктов, что облегчило обнаружение и подтверждение молекулярного иона. Для идентификации компонен-

тов экстрактов было решено использовать масс-спектрометрию высокого разрешения (с ошибкой определения брутто-формулы не более 8 мДа) с одновременной регистрацией отрицательных и положительных ионов (хромато-масс-спектрометр Shimadzu LCMS-IT-TOF). В режиме полного сканирования гинзенозиды определялись как депро-

Таблица 1. Соотношение суммарного содержания гинзенозидов типов протопанаксацидиола (PPD) и протопанаксатриола (PPT) (PPD/PPT) и соотношение суммарного содержания нейтральных гинзенозидов к малонилированным гинзенозидам (PPD/m-PPD; PPT/m-PPT) соответствующих структурных типов

Образец	Соотношения содержания сумм гинзенозидов		
	PPD/PPT*	PPD/m-PPD*	PPT/m-PPT*
PgNroot (нативные корни)	0.71	1.46	10.03
PgR-root (корни <i>in vitro</i>)	1.07	1.10	22.16
PgR-calli (базальный каллус ризогенной линии)	1.12	1.30	16.71
PgG-leaves (листья <i>in vitro</i>)	0.66	2.17	9.93
PgG-calli (базальный каллус геммогенной линии)	0.04	0.18	29.48

Примечание. Звездочками (*) обозначено отношение сумм определенных типов гинзенозидов.

тонируемые ионы $[M-H]^-$ и ионы-аддукты с муравьиной кислотой $[M + HCOO]^-$ (всегда для нейтральных гинзенозидов). Это часто подтверждалось обнаружением натриевых аддуктов $[M + Na]^+$ (табл. 1, Дополнительные материалы), причем соотношения интенсивностей молекулярных ионов и ионов-аддуктов были индивидуальны для каждого компонента и сохранялись от анализа к анализу. Отрицательный режим сканирования оказался более чувствительным, тогда как МС/МС спектры показали больше информации о фрагментации ионов предшественников состава $[M-H]^-$ и/или $[M + HCOO]^-$. Для получения МС/МС спектров в настоящем исследовании использовали масс-спектрометрию низкого разрешения (масс-спектрометр низкого разрешения Bruker HCT ultra, функционирующий в режиме регистрации отрицательных ионов и автоматическом выборе ионов-прекурсоров), благодаря его высокой чувствительности и хорошо различимым масс-спектрам в этом режиме. Характерный путь фрагментации стандартных образцов был полностью изучен и продемонстрировал картину, как правило, соответствующую последовательной потере гликозидных остатков до образования ионов сапогенина/агликона (Agl) $[Agl-H]^-$. Условия фрагментации были оптимизированы таким образом, чтобы получить сигнал ионов сапогенина для каждого компонента за один цикл анализа. Соответственно различные группы гинзенозидов хорошо дифференцировались и характеризовались при помощи МС/МС спектров. Основные группы гинзенозидов, обнаруженных в экстрактах — производные протопанаксацидиола (PPD-тип), протопанаксатриола (PPT-тип) и олеаноловой кислоты (Ole-тип). При МС/МС-фрагментации эти гликозиды продуцировали ионы сапогенинов: $[PPD-H]^-$ с m/z 459 ($C_{30}H_{51}O_3$), $[PPT-H]^-$ с m/z 475 ($C_{30}H_{51}O_4$) и $[Ole-H]^-$ с m/z 455 ($C_{30}H_{47}O_3$) соответственно (табл. 1, Дополнительные материалы). Также сахарные цепочки легко идентифицировались путем определения моле-

кулярной массы последовательных нейтральных потерь от ионов $[M-H]^-$ (и/или $[M + HCOO]^-$) до ионов сапогенина $[Agl-H]^-$, обычно это 162, 146, 132 и 176 Да, что в основном соответствует элиминированию дегидрированных остатков глюкозы (Glc), рамнозы (Rha), пентозы (Pent), арабинопиранозы (Arap), арабинофуранозы (Araf) или ксиллозы (Xyl) и глюкуроновой кислоты (GlcA), соответственно (рис. 1–4, Дополнительные материалы).

В исследуемых объектах были обнаружены 2 ацетилированных (пики 45 и 54) и 18 малонилированных производных гликозидов (пики 11, 13, 14, 29, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 46, 49, 51, 53, 56, 57, 59 и 60), причем три из них идентифицированы как дважды малонилированные (табл. 1, Дополнительные материалы). Характерной особенностью малонилированных производных, как и всех кислых гинзенозидов, можно считать отсутствие в отрицательном спектре полного сканирования сигнала аддуктов с муравьиной кислотой и наличие сигналов депротонированных ионов в паре с ионами фрагментами состава $[M-H]^-$, образованными благодаря нейтральной потере CO_2 [4]. Причем интенсивность ионов $[M-H-CO_2]^-$ обычно была в 2 и более раз выше, чем интенсивность ионов $[M-H]^-$, что обусловлено нестабильностью молекулы. Также обычно присутствовал сигнал и натриевых аддуктов $[M + Na]^+$. Следует отметить, что некоторые малонил-гликозиды присутствовали в исследуемых экстрактах в виде нескольких изомерных форм, которые вероятно различаются положением малонильного остатка [26–29].

Необходимо отметить, что существует множество изомерных форм гинзенозидов. В частности, в изученных образцах были выявлены несколько гликозидов, которые имели близкие (в пределах ошибки в 8 мДа) значения m/z и идентичную молекулярную формулу. Только с помощью анализа МС/МС для этих гликозидов удалось выявить различия в структуре и провести их разграничение на основании гипотетического строения агликонов (несколько примеров идентификации

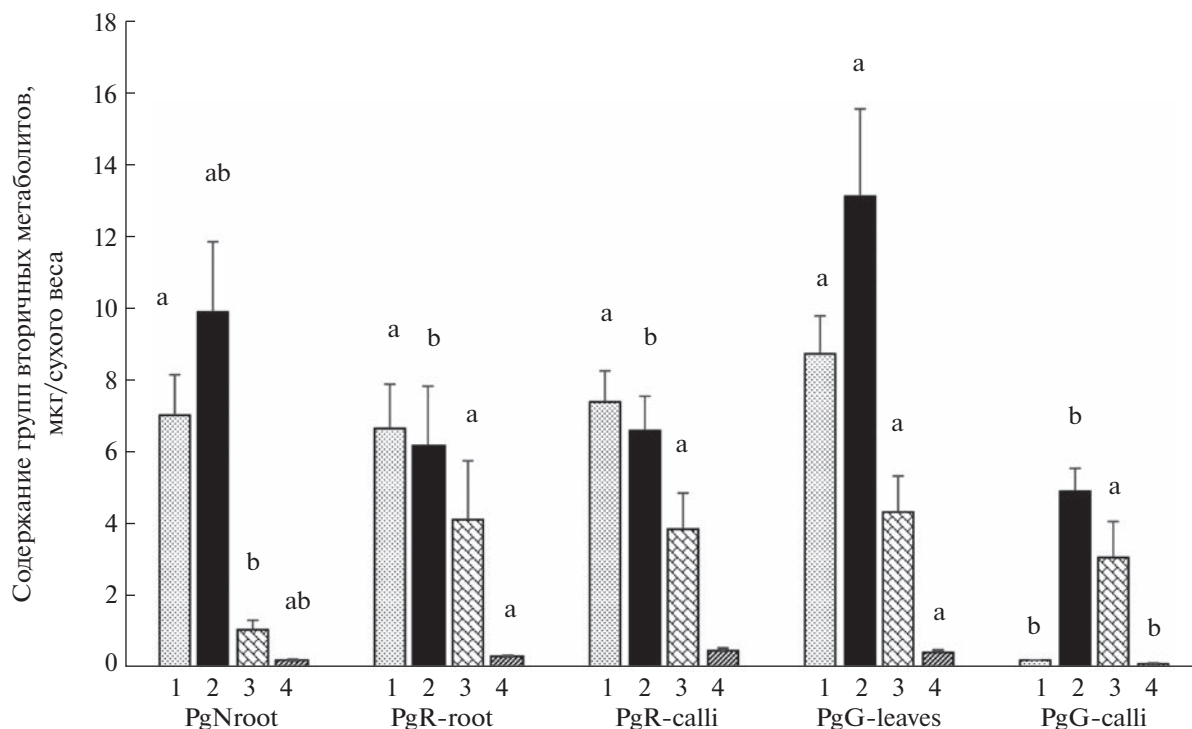


Рис. 3. Распределение разных типов гинзенозидов в пяти исследуемых образцах *Panax ginseng*. Разными буквами обозначены достоверные отличия значений по каждой группе гинзенозидов. 1 — суммарное содержание протопанаксодиолов (PPD); 2 — суммарное содержание протопанаксатриолов (PPT); 3 — суммарное содержание производных окотиллолов (Oct); 4 — суммарное содержание производных олеаноловой кислоты (Ole).

гинзенозидов с одинаковой молекулярной формулой представлены рис. 2 и 3, Дополнительные материалы). Примечательно, что некоторые три-терпеновые гликозиды типа окотиллола (Oct-тип) также были обнаружены и идентифицированы в исследованных образцах. МС/МС спектры соединений № 6, 10 и 15 содержали сигнал иона с m/z 491 ($C_{30}H_{51}O_5$), соответствующий депротонированному агликону окотиллолового типа [Oct-H]⁻ [2, 27]. Также восемь производных олеаноловой кислоты были обнаружены в исследуемых экстрактах (пики 34, 35, 41, 47, 52, 64, 65, 67). В режиме полного сканирования гинзенозиды типа Ole обнаруживали интенсивные сигналы депротонированных ионов [M-H]⁻ и натриевых аддуктов [M + Na]⁺ (некоторые примеры идентификации гинзенозидов производных олеаноловой кислоты представлены на рис. 4, Дополнительные материалы).

В результате проделанной работы в неочищенных экстрактах суммарных образцов нативных корней и морфогенных линий *P. ginseng* были идентифицированы 66 гинзенозидов, из которых 13 компонентов (пики № 7 (G-Rg1), 8 (G-Re), 21 (G-Rf), 24 (NG-R2), 26 (G-Rb1), 28 (G-Rg2), 31 (G-Rh1), 32 (G-Rc), 35 (G-Ro), 37 (G-Rb2), 48 (G-F1), 50 (G-Rd) и 63 (G-F2)) были идентифицированы путем сравнения их хроматографического и масс-спектрометрического поведения с

эталонными стандартами, а остальные соединения были определены путем сравнения эмпирических молекулярных формул, а также информации о фрагментации и последовательности их удерживания на обращенной фазе с данными из литературы [2, 4, 5, 26–33]. Все хроматографические и масс-спектрометрические данные, использованные для идентификации, собраны в табл. 1 (Дополнительные материалы).

Анализ распределения гинзенозидов, обнаруженных в морфогенных клеточных линиях женьшеня и нативных плантационных корней. Для анализа распределения гинзенозидов в морфогенных клеточных линиях, материал был разделен на ткани: базальные — без признаков дифференциации на ткани, органогенные — формирующие определенные органы. Ризогенная линия PgR была разделена на две части: корни (PgR-root) и утолщенный базальный каллус (PgR-calli). Геммогенная линия PgG (рис. 1а, 1б) также была разделена на листья (PgG-leaves) и базальный каллус, на котором формировались почки, из которых развивались листья (PgG-calli). На основе полученной ранее идентификации был проанализирован качественный состав разделенных образцов в сравнении с образцом, полученным из нативных корней.

Таким образом, в плантационном корне и культивированных *in vitro* тканях (корни (PgR-root) и их

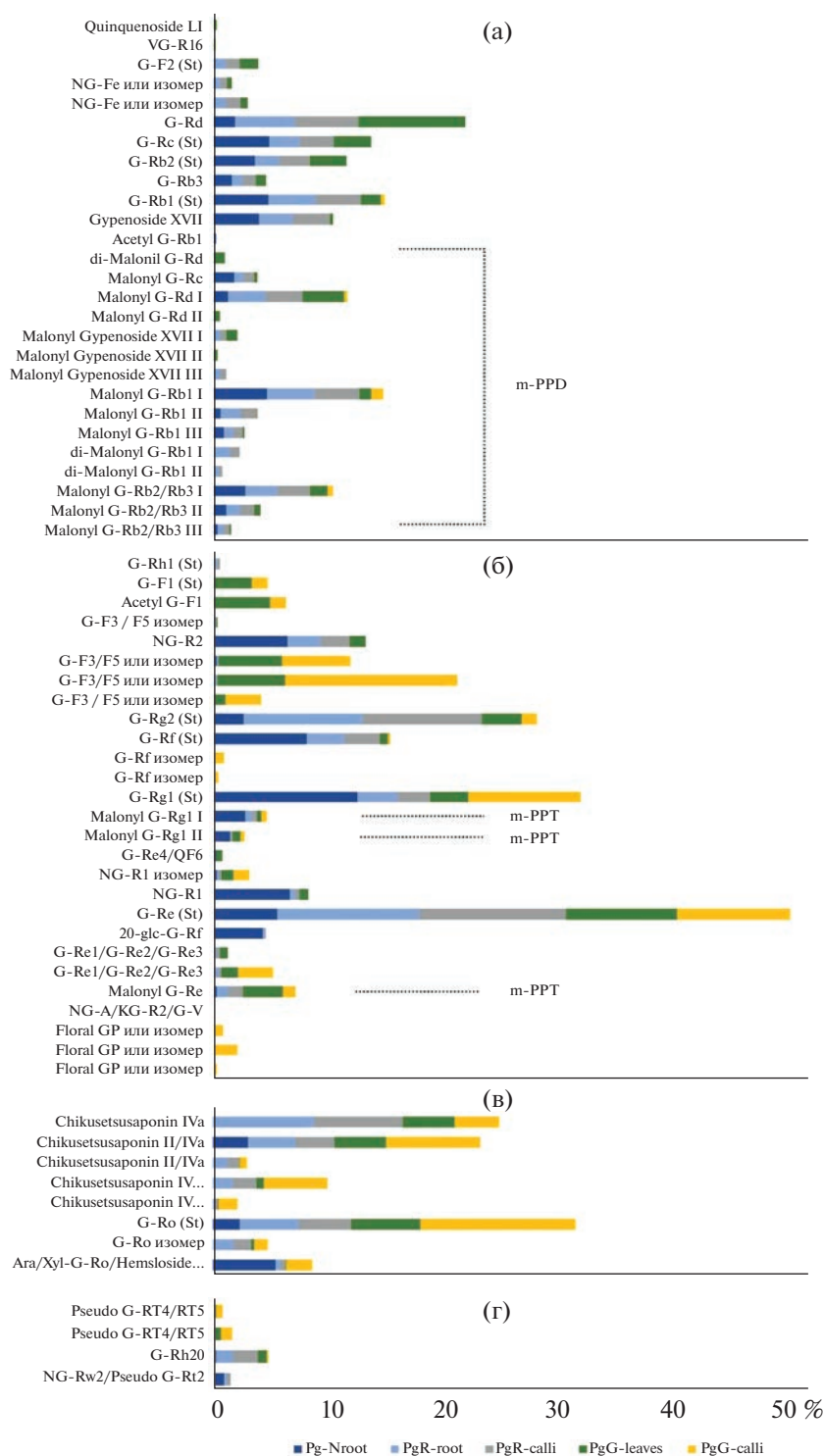


Рис. 4. Соотношение 66 определенных гинзенозидов в образцах морфогенных линий и нативных плантационных корней, % от сухого веса веществ: а — протопанаксадиолы (PPD); б — протопанаксатриолы (PPT); в — производные олеаноллола (Ole); г — производные олеаноловой кислоты (Ole).

базальный каллус (PgR-calli); листья (PgG-leaves) и их базальный каллус, из которого формировались почки и листья (PgG-calli)) было идентифицировано 66 гинзенозидов (рис. 4 и табл. 1, Дополнительные материалы). Наибольшее разнообра-

зие в составе гинзенозидов было обнаружено в листьях геммогенной линии — 57 соединений. Качественный состав плантационных корней и корней в культуре ткани практически совпадал и был представлен 47 соединениями. Базальный

каллус PgR-calli содержал 50 гинзенозидов, представленных в плантационных и культивируемых *in vitro* корнях, при этом корни *in vitro* содержали более разнообразные формы Ole-типа соединений (пик № 41, 47, 52, 65, 67), не обнаруженных в плантационных корнях (рис. 4). Самым бедным по разнообразию гинзенозидов являлся морфогенный базальный каллус, из которого формировались листья (рис. 3, 4). В нем было найдено всего 35 гинзенозидов. При этом он содержал достаточно редкие для нативных корней гинзенозиды олеанолового и окатиолового типов (рис. 4). Несколько соединений были обнаружены исключительно в этом типе каллуса.

Для изучения распределения индивидуальных гинзенозидов в нативных корнях и различных тканях и органах морфогенных клеточных линий был использован полуколичественный анализ с применением метода внешней калибровки относительно стандартных образцов гинзенозидов G-Rg3 и G-Rh1. Результаты представлены на рис. 3, 4.

Суммарное содержание гинзенозидов в плантационном 6-летнем корне и клеточных линиях составляло: в интактных корнях — 18.13 ± 2.72 мг/г сухого веса; в корнях ризогенной клеточной линии — 17.24 ± 3.45 мг/г сухого веса; в базальном каллусе ризогенной клеточной линии 18.29 ± 2.74 мг/г сухого веса; в листьях геммогенной линии — достигало достоверно максимальных значений 26.65 ± 4.78 мг/г сухого веса; в базальном каллусе геммогенной клеточной линии было достоверно минимальным — 8.26 ± 1.07 мг/г сухого веса (рис. 3). Кроме общего содержания гинзенозидов, было проанализировано соотношение типов PPD и PPT (PPD/PPT) и соотношение нейтральных гинзенозидов к малонил-гинзенозидам (табл. 1). Установлено, что соотношение PPD-типа и PPT-типа гинзенозидов было близко к единице, что отражало примерно равное количество данных веществ во всех образцах, за исключением инициального каллуса, формирующего листья (PgG-calli). В этом образце (PgG-calli) производные протопанаксадиола практически отсутствовали и были представлены только 4 гинзенозидами (рис. 4), при этом 3 из них находились в малонилированной форме (m-PPD). Интересен и тот факт, что содержание малонил-эфиров гликозидов протопанаксадиола было одинаково с нейтральными формами этих соединений, в то время как малонилированные производные протопанаксатриола встречались в существенно меньшем количестве (рис. 4).

Несмотря на то, что качественное разнообразие гинзенозидов в клетках базального геммогенного каллуса листьев PgG-calli было беднее, чем в других образцах, ряд веществ (№ 7, 8, 27, 35) (табл. 1, Дополнительные материалы) были обнаружены в большем количестве по сравнению с остальными

гинзенозидами именно в этих клетках (15.05; 13.5; 9.84; 9.85% от сухого веса) соответственно (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Имеются работы, где используются методы, комбинированные с ВЭЖХ-МС для определения разных видов гинзенозидов, органов и тканей растений по составу гинзенозидов [4, 27]. При этом показано, что концентрации гинзенозидов резко меняются в ответ на изменение внешних условий: смена сезона, освещения, полива, засоление почв, добавление удобрений или стимуляторов роста [34, 35]. Считается, что физиологическая роль этих многоцелевых молекул в растениях сводится в основном к защитной функции от патогенов. Однако, новые данные по динамике изменений соотношения и распределения этих веществ в процессе роста растений у разных видов этого рода указывают на более сложную картину синтеза и физиологических функций этих веществ [36]. Для других видов двудольных растений показано, что простые и сложные тритерпеноиды влияют на фундаментальные клеточные процессы (пролиферация клеток, изменения направления дифференциации, пути передачи сигналов), но молекулярные мишени, на которые распространяется действие этих соединений, пока не идентифицированы [37].

Первоначально мы ожидали, что состав гинзенозидов базальных каллусов, из которых формировались органы (корни и почки), будет одинаков, так как в этих тканях протекают начальные стадии морфогенеза (рис. 1). При этом соотношение клеточных типов в тканях различного возраста и происхождения значительно отличается. В базальных тканях ризогенной клеточной линии (PgR-calli) большое количество паренхимных запасающих клеток, количество же меристематических клеток было относительно небольшим (рис. 1в, 1д). Превалирующими оказались паренхимные клетки. В то же время количество меристематических клеток в базальном каллусе геммогенной линии (PgG-calli) достигало $82 \pm 4\%$. В эмбриональных тканях растений вторичные метаболиты обычно не синтезируются, т.к. вся энергия меристематических клеток тратится на процессы регуляции морфогенеза и пролиферацию [38]. Это подтверждается и нашими данными о том, что общее количество гинзенозидов в этих тканях снижалось по сравнению с другими образцами почти в 2 раза, вероятно, за счет количества протопанаксадиола (рис. 3). Максимальное содержание гинзенозидов наблюдалось в листьях геммогенной линии (рис. 3). В литературе показано, что содержание гинзенозидов в листьях и корневых волосках нативных растений *P. ginseng* выше, а в стебле и других частях ниже, по сравнению с центральной частью основных корней [39].

У растений *P. notoginseng* тип 20(S)-протопанаксатриола был распространен преимущественно в подземных частях, тогда как 20(S)-протопанаксациол — в надземных частях [40]. Для американского женьшеня *P. quinquefolium* [8] показано такое же соотношение основных гинзенозидов в надземных частях и завязях растений, как в листьях *in vitro*, представленных в нашей работе. Напротив, в культуре ткани линии PgR-root и PgR-calli было увеличение протопанаксатриола Re в 2 раза, по сравнению с нативным корнем.

Примечательно, что, несмотря на бедный по разнообразию состав гинзенозидов в базальной части геммогенного каллуса, количество редких гинзенозидов олеанолового типа (Ro и изомеров Chikusetsusaponin IVa) значительно превышало таковое не только в нативных корнях, но и в листьях. В американском женьшене было показано достоверное увеличение гинзенозида Ro в цветочных почках [8]. Возможно, у женьшеня в процессе развития инициальных тканей почек в каллусе и на начальных стадиях развития тканей завязей у интактных растений вырабатываются одинаковые вещества, которые относятся к Ole-типу гинзенозидов. В этом же типе каллуса PgG-calli наблюдалось максимальное количество изомеров G-F3 (до 29% сухого веса всех гинзенозидов).

Необходимо отметить, что морфогенные клеточные линии повторяют не только паттерн качественного состава гинзенозидов, по сравнению с отдельными частями нативных корней и листьев, но и увеличивают их разнообразие и количество, часто за счет накопления промежуточных соединений. При этом, несмотря на наличие небольшого разнообразия редких гинзенозидов во всех исследуемых образцах, значительное увеличение по количеству отдельных типов гинзенозидов протопанаксатриолов и олеаноловых наблюдалось в базальных каллусах PgR-calli и PgG-calli. Гистологический анализ показал, что базальные каллусы двух линий имеют в своем составе много меристематической ткани, которой необходимо поддерживать высокое число клеточных делений, что замедляет накопление конечных продуктов. Накопление определенных типов гинзенозидов в делящихся видах ткани косвенно указывает на пролиферативное действие данных веществ, т.к. они практически отсутствуют в зрелых дифференцированных тканях.

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 2326-00213.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлев Ю.Н., Томских А.А., Горпенченко Т.Ю. История и перспективы генетических исследований женьшеня на Дальнем Востоке России // Вестник ДВО РАН. 2022. № 4. С. 101. https://doi.org/10.37102/0869-7698_2022_224_04_9
2. Chen W., Balan P., Popovich B.G. Ginsenosides analysis of New Zealand-grown forest *Panax ginseng* by LC-QTOF-MS/MS // J. Ginseng Res. 2020. V. 44. P. 552. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.04.007>
3. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Z. Phytochemical analysis of *Panax* species: a review // J. Ginseng Res. 2021. V. 45. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.009>
4. Du Z., Li J., Zhang X., Pei J., Huang L. An integrated LC-MS-based strategy for the quality assessment and discrimination of three *Panax* species // Molecules. 2018. V. 23. P. 2988. <https://doi.org/10.3390/molecules23112988>
5. Li F., Lv C., Li Q., Wang J., Song D., Liu P., Zhang D., Lu J. Chemical and bioactive comparison of flowers of *Panax ginseng* Meyer, *Panax quinquefolius* L., and *Panax notoginseng* Burk // J. Ginseng Res. 2017. V. 41. P. 487. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.008>
6. Lee J.W., Choi B.-R., Kim Y.-C., Choi D.J., Lee Y.-S., Kim G.-S., Baek N.-I., Kim S.-Y., Lee D.Y. Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS // Molecules. 2017. V. 22 P. 2147. <https://doi.org/10.3390/molecules22122147>
7. Lee J., Han H., Yuan X., Park E., Lee J., Kim J.H. A rapid, simultaneous and quantitative analysis of 26 ginsenosides in white and red *Panax ginseng* using LC-MS/MS // Appl. Biol. Chem. 2021. V. 64:13. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00588-w>
8. Di P., Yan Y., Wang P., Yan M., Wang Y.-P., Huang L.-Q. Integrative SMRT sequencing and ginsenoside profiling analysis provide insights into the biosynthesis of ginsenoside in *Panax quinquefolium* // Chin. J. Nat. Med. 2022. V. 20. P. 614. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(22\)60198-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(22)60198-5)
9. Gantait S., Mitra M., Chen J.-T. Biotechnological interventions for ginsenosides production // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 538. <https://doi.org/10.3390/biom10040538>
10. Xu F., Valappil A.K., Mathiyalagan R., Tran T.N.A., Ramadhan Z.M., Awais M., Yang D.C. *In vitro* cultivation and ginsenosides accumulation in *Panax ginseng*: a review // Plants. 2023. V. 12. P. 3165. <https://doi.org/10.3390/plants12173165>
11. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation

- and scaling-up to bioreactors // Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology / Ed. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J.J. Dordrecht: Springer-Verlag. 2014. P. 563.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
12. Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1582.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
 13. Nakonechnaya O.V., Gafitskaya I.V., Grigorchuk V.P., Gorpenchenko T.Y., Bezdelev A.B., Zhuravlev Y.N. Polyphenol composition of *Dracocephalum charkeviczii* Prob. plants in *in situ* and *in vitro* conditions // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69:27.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722010149>
 14. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg 1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 649.
<https://doi.org/10.1134/S102144371705003X>
 15. Glagoleva E.S., Konstantinova S.V., Kochkin D.V., Ossipov V., Titova M.V., Popova E.V., Nosov A.M., Paek K.Y. Predominance of oleanane-type ginsenoside R0 and malonyl esters of protopanaxadiol-type ginsenosides in the 20-year-old suspension cell culture of *Panax japonicus* C.A. Meyer // Ind. Crops Prod. 2022. V. 177 P. 552114417
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114417>
 16. Wu J., Zhong J.-J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects // J. Biotechnol. 1999. V. 68. P. 89.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(98\)00195-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(98)00195-3)
 17. Kochkin D.V., Glagoleva E.S., Galishev B.A., Spiridovich E.V., Nosov A.M., Reshetnikov V.N. Analysis of ginsenosides in the roots of *Panax ginseng* introduced in the central botanical garden of NAS of Belarus // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus. 2018. V. 62. P. 447.
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-4-447-454>
 18. Балеев Д.Н., Осипов В.И., Савин П.С., Байкова Ю.П., Сидельников Н.И. Сравнительный анализ состава и содержания гинзенозидов в каллусной культуре клеток и корне женьшеня обыкновенного, *Panax ginseng* // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 2. С. 57.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822020028>
 19. Song X., Wu H., Piao X., Yin Z., Yin Ch. Microbial transformation of ginsenosides extracted from *Panax ginseng* adventitious roots in an airlift bioreactor // Electron. J. Biotechnol. 2017. V. 26. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.005>
 20. Журавлев Ю.Н., Гетманова Е.С., Музарок Т.И., Булгаков В.П. Способ микроразмножения женьшеня. Патент SU1824114A1, 1993.
 21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 22. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботанический журнал. 2000. Т. 85. С. 168.
 23. Gorpenchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Bragina E.A., Khodakovskaya M.V., Koren O.G., Batygina T.B., Zhuravlev Y.N. The *Agrobacterium rhizogenes* rolC-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses // Planta. 2006. V. 223. P. 457.
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0102-2>
 24. Уварова Н.И., Маханьков В.В., Малиновская Г.В., Самошина Н.Ф., Атопкина Л.Н., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Анисимов М.М., Еляков Г.Б. Химическая характеристика, сравнительное количественное определение и биологическая активность тритерпеновых гликозидов из дикого и плантационного женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мейер, произрастающих в Приморском крае // Химико-фармацевтический журнал. 2000. Т. 34. С. 19.
 25. Маханьков В.В., Бурундукова О.Л., Музарок Т.И., Уварова Н.И., Журавлев Ю.Н. Содержание гинзенозидов в листьях *Panax ginseng* С.А. Мейер в зависимости от возраста и условий произрастания // Растительные ресурсы. 2007. Т. 3. С. 107.
 26. Chen Y., Zhao Z., Chen H., Yi T., Qin M., Liang Z. Chemical differentiation and quality evaluation of commercial asian and american ginsengs based on a UHPLC-QTOF/MS/MS metabolomics approach // Phytochem. Anal. 2015. V. 26 P. 145.
<https://doi.org/10.1002/pca.2546>
 27. Qiu S., Yang W.Z., Shi X.J., Yao C.L., Yang M., Liu X., Jiang B.-H., Wu W.-Y., Guo D.A. A green protocol for efficient discovery of novel natural compounds: characterization of new ginsenosides from the stems and leaves of *Panax ginseng* as a case study // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 893 P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.048>
 28. Wang H.P., Zhang Y.B., Yang X.W., Zhao D.Q., Wang Y.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 // J. Ginseng Res. 2016. V. 40 P. 382.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.12.001>
 29. Minh Duc N., Thoi Nham N., Kasai R., Ito A., Yamasaki K., Tanaka O. Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* HA et GRUSHV. Collected in Central Vietnam. I. // Chem. Pharm. Bull. 1993. V. 41. P. 2010.
<https://doi.org/10.1248/cpb.41.2010>
 30. Dictionary of food compounds additives, flavors, and ingredient / Ed. Sh. Yannai. 2004. A CRC press Company Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 1782 p.
 31. Van Le T.H., Lee G.J., Vu H.K.L., Kwon S.W., Nguyen N.K., Park J.H., Nguyen M.D. Ginseng saponins in different parts of *Panax vietnamensis* // Chem. Pharm. Bull. 2015. V. 63 P. 950.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00369>
 32. Peng M., Zhang T., Ding Y., Yi Y., Yang Y., Le J. Structure-based prediction of CAD response factors 1 of dammarane-type tetracyclic triterpenoid saponins and

- its application to the analysis of saponin contents in raw and processed *Panax notoginseng* // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 36987.
<https://doi.org/10.1039/C6RA03193E>
33. Wang H.-P., Wang Z.-J., Du J., Lin Z.-Z., Zhao C., Zhang R., Yin Q., Fan C.-L., Peng P., Wang Z.-B. Comprehensive identification of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* based on their molecular features-oriented precursor ions selection and targeted MS/MS analysis // Molecules. 2023. V. 28. P. 941.
<https://doi.org/10.3390/molecules28030941>
34. Oh J.Y., Kim Y.J., Jang M.G., Joo S.C., Kwon W.S., Kim S.Y., Jung S.-K., Yang D.C. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng* // J. Ginseng Res. 2014. V. 38. P. 270.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.04.004>
35. Rahimi S., Kim Y.J., Yang D.C. Production of ginseng saponins: elicitation strategy and signal transductions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 6987.
36. Chopra P., Chhillar H., Kim Y.J., Jo I.H., Kim S.T., Gupta R. Phytochemistry of ginsenosides: recent advancements and emerging roles // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2023. V. 63. P. 613.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952159>
37. Moses T., Papadopoulou K.K., Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2014. V. 40. P. 439.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>
38. Fehér A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 536.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
39. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Z. Phytochemical analysis of *Panax* species: a review // J. Ginseng Res. 2021. V. 45. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.009>
40. Yao C.L., Pan H.Q., Wang H., Yao S., Yang W.Z., Hou J.J., Jin Q.H., Wu W.Y., Guo D.A. Global profiling combined with predicted metabolites screening for discovery of natural compounds: characterization of ginsenosides in the leaves of *Panax notoginseng* as a case study // J. Chromatogr. 2018. V. 1538. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.040>