

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЛИКОЗИДОВ ФЕНИЛЭТИЛАМИДОВ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *Mandragora turcomanica*

© 2021 г. Д. В. Кочкин^{а, с, *}, Б. А. Галишев^б, М. В. Титова^с, Е. В. Попова^с, А. М. Носов^{а, с}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

^бУральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

^сИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.

После доработки 25.12.2020 г.

Принята к публикации 25.12.2020 г.

Проведено подробное хромато-масс-спектрометрическое изучение вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток мандрагоры туркменской (*Mandragora turcomanica* Mizgir.), которая поддерживается в активно растущем состоянии более 30 лет. Идентифицированы как широко распространенные у растений соединения (амиды гидроксикоричных кислот с путресцином и ферулоилтирамин), так и весьма редкие метаболиты (гликозиды фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот). Идентификацию соединений проводили с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения при ионизации электрораспылением (УЭЖХ-ИЭР-МС) и детектировании положительно и отрицательно заряженных ионов. Структурный анализ гликозидов фенилэтиламидов феруловой кислоты осуществлен на основании расщипки МС-спектров, полученных при фрагментации протонированных молекулярных ионов $[M + H]^+$ этих соединений в источнике ионизации. На основании полученных результатов показано наличие в клетках *M. turcomanica*, культивируемых *in vitro*, пяти гексозидов феруловой кислоты, три из которых с остатками тирамина, и по одному с остатками метокситирамина и октопамина соответственно. Один из обнаруженных гликозидов относится к очень редкой группе метаболитов растений – дигексозиды ферулоилтирамина. Полученные результаты подтверждают разрабатываемую в наших работах концепцию об изменении специализированного обмена в культивируемых *in vitro* клетках высших растений, свидетельствуют о сохранении в дедифференцированных пролиферирующих клетках способности к образованию сложного набора вторичных метаболитов, что противоречит сложившимся представлениям об утрате или снижении интенсивности специализированного метаболизма в культурах клеток высших растений.

Ключевые слова: *Mandragora turcomanica*, суспензионная культура клеток, тирамин, гликозиды фенилэтиламидов феруловой кислоты, вторичный метаболизм

DOI: 10.31857/S0015330321050080

ВВЕДЕНИЕ

Растения являются одними из самых сложных по своему химическому составу организмов. Вариабельная часть этого состава определяется, прежде всего, образованием и накоплением веществ “специализированного” обмена (вторичных метаболитов), роль которых в жизнедеятельности растения является предметом многочисленных дискуссий. В настоящее время преобладающей точкой зрения — участие вторичных метаболитов во взаимодействии растения с окружающей средой: формирование и регуляция связей в различных типах сосуществования растений с другими организмами (симбиотические, антагонистические и другие варианты

отношений организмов), реакция растительного организма на изменения абиотических факторов среды и т.д. [1]. Одним из перспективных подходов к выяснению функциональной значимости вторичного метаболизма является его изучение в культуре клеток высших растений — уникальной биологической системе, в которой многие биохимические процессы (включая и вторичный метаболизм) реализуются отличным от интактных растений образом [1, 2]. Сопоставление закономерностей специализированного обмена в растительных клетках *in vivo* и *in vitro* при знании специфики и условий их жизнедеятельности позволяет делать обоснованные выводы о функциональной роли этого процесса [1].

В настоящее время фитохимическое изучение клеток растений *in vitro* в большинстве случаев осуществляется путем сопоставления хроматографических профилей экстрактов из биомассы культур клеток с хроматограммами стандартных образцов характерных для конкретного растения вторичных метаболитов (эту стратегию фитохимического изучения культур клеток растений условно можно обозначить как “классическую”) [2]. Такой подход не позволяет обнаружить весь спектр образуемых в культурах клеток соединений, что, по-видимому, лежит в основе широко распространенного мнения об ограниченности специализированного метаболизма в клетках растений *in vitro* [1–3]. В то же время, тщательное химическое изучение культур клеток растений с применением всего арсенала фитохимических методов (различные варианты тонкослойной хроматографии, препаративное выделение индивидуальных соединений и описание их структуры с помощью спектроскопии ЯМР и т.д.) свидетельствует о возможности образования в культивируемых клетках растений нехарактерных и/или “минорных” (встречающиеся редко и в исчезающе малых количествах) для интактных растений метаболитов, коммерческие стандартные образцы которых в подавляющем большинстве случаев отсутствуют [2, 4]. Таким образом, “классическая” стратегия фитохимического анализа не всегда предоставляет корректные сведения о разнообразии вторичных метаболитов в клетках растений *in vitro*.

Современный этап развития фитохимии характеризуется активным использованием при описании структурного разнообразия вторичных метаболитов в интактных растениях различных видов хромато-масс-спектрометрии [5]. В наиболее универсальном варианте этот экспериментальный подход основан на совместном применении жидкостной хроматографии (высоко- или ультраэффективной – ВЭЖХ или УЭЖХ соответственно) с квадрупольной-времяпролетной масс-спектрометрией при электрораспылительной ионизации. В англоязычной литературе этот экспериментальный подход именуется как LC-ESI-Q-TOF-MS (liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry) [5]. Применение LC-ESI-Q-TOF-MS при фитохимическом анализе позволило существенно расширить представления о сложности химического состава растений. В одной из пионерских работ этого направления было показано, что LC-ESI-Q-TOF-MS позволяет обнаружить и структурно описать в различных образцах видов женьшеня (*Panax spp.*) более 600 тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов) разной структуры [6]. При этом возможна надежная структурная идентификация метаболитов, содержание которых исчезающе мало – до $10^{-4}\%$ от сухой массы растительных образцов, что было

подтверждено с помощью “классических” методов фитохимии: препаративного выделения индивидуальных соединений и изучения их структуры с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [6].

Однако если при исследовании интактных растений хромато-масс-спектрометрия (в том числе и LC-ESI-Q-TOF-MS) в настоящее время является уже рутинным методом, то для фитохимического анализа культивируемых *in vitro* клеток растений этот экспериментальный подход используется достаточно редко [7]. На основании изложенного можно предположить, что использование хромато-масс-спектрометрии, прежде всего LC-ESI-Q-TOF-MS, при изучении культур клеток растений позволит получить более объективную информацию о биохимических особенностях этой уникальной биологической системы, и поэтому подобные работы имеют несомненное фундаментальное и прикладное значение.

Мандрагора (*Mandragora spp.*) – род травянистых многолетних растений семейства Solanaceae. Является легендарным растением средневековой Европы, упоминается в Библии. В настоящее время установлено, что многие свойства мандрагоры обусловлены наличием тропановых алкалоидов – гиосциамина, атропина, скополамина и ряда других [8–10].

Эндемичный вид горных районов юго-запада Туркмении *Mandragora turcomanica* Mizgir. был описан в 1942 году и является, пожалуй, одним из наиболее редких лекарственных растений [8]. Природная популяция *M. turcomanica* насчитывает всего несколько сотен экземпляров растений. При этом особенности биологии этого растения затрудняют интродукцию вида (например, в условиях ботанических садов) и/или плантационное выращивание [8–10]. Эти обстоятельства предопределяют актуальность работ по получению и подробному изучению культур клеток *M. turcomanica in vitro*.

В 1981 году в ИФР РАН Р.Г. Бутенко и Н.А. Мясовым из листа интактного растения *M. turcomanica* была получена культура клеток, которая поддерживается в растущем состоянии методом пересева по настоящее время.

Целью настоящей работы было фитохимическое изучение с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения при ионизации электрораспылением (УЭЖХ-ИЭР-МС, один из вариантов LC-ESI-Q-TOF-MS), биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*, поддерживаемой в культуре *in vitro* более 30 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток мандрагоры туркменской (*Mandragora turcomanica* Mizgir.), которая поддерживается в активно растущем состоянии с 1981 г. во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений ИФР РАН под № 31 [11].

Условия выращивания культуры клеток. Культуру клеток *M. turcomanica* выращивали (в соответствии с коллекционным паспортом) на модифицированной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге-Скугу [12] с добавлением глюкозы (4%), тиамин (1 мг/л), α -НУК (3 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) [13]. Культивирование проводили в темноте, при 26°C, на качалке (90 об./мин), в колбах объемом 250 мл с укупоркой двойным слоем алюминиевой фольги и слоем офсетной бумаги (30–40 мл суспензии в колбе). Цикл субкультивирования составлял две недели. Для химического анализа использовали биомассу на 10 сут после пересева (экспоненциальная фаза роста культуры).

Подготовка проб для УЭЖХ-ИЭР-МС анализа. Навеску воздушно-сухого растительного материала (31 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70% (по объему) водного этилового спирта в течение 30 минут под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 минут (Микроцентрифуга МЦФ, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 55°C). Полученный экстракт суспендировали в 1 мл дистиллированной воды и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл дистиллированной воды, анализы смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 55°C. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1 : 1, по объему).

УЭЖХ-ИЭР-МС. Анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенный гибридным квадрупольным время-пролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Пробу в объеме 1 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, Ирландия). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин –

от 15 до 30%, 5 – 15 мин – от 30 до 38%, 15 – 15.5 мин – от 38 до 45%, 15.5 – 23 мин – 45%, 23 – 23.5 мин – от 45 до 95%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон m/z 100–2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации 120°C, температура десольвации 250°C, напряжение на капилляре 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/час. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы был проведен УЭЖХ-ЭР-МС анализ спиртового экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* в режиме детектирования положительно-заряженных ионов. Выбор этого режима обусловлен тем фактом, что при ионизации электрораспылением для положительно-заряженных ионов (прежде всего, протонированных молекул ($[M + H]^+$) многих природных соединений наблюдается фрагментация (с образованием характеристических осколочных ионов) уже в источнике ионизации [14, 15]. Анализ полученных таким образом масс-спектров позволяет провести достаточно быструю первичную структурную идентификацию соединений без осуществления дополнительных тандемных масс-спектрометрических экспериментов [15]. Для хроматографического разделения использовали градиентную программу элюирования, разработанную ранее для анализа природных соединений широкого диапазона полярности на хроматографических колонках с обращенной фазой [15].

Полученная УЭЖХ-ЭР-МС хроматограмма (полный ионный ток) представлена на рисунке 1. В общей сложности в экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* было обнаружено 9 хроматографических пиков соединений (элюируются с хроматографической колонки в пределах 0.5–4.0 мин), которые в порядке увеличения времени удерживания на хроматографической колонке были обозначены номерами от 1 до 9.

Для структурной идентификации обнаруженных соединений использовали следующую информацию: расшифровка результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул соединений в источнике ионизации), определение (на основании сравнения расчетного и экспериментально-измеренного значений точной мономерной массы) элементного состава соединений [16] и сравнение масс-спектрометрического и относительного хроматографического поведения соединений с данными литературы [17–22]. Данные масс-спектров и результаты иден-

тификации обнаруженных соединений представлены в табл. 1.

Общий анализ масс-спектров положительных ионов обнаруженных соединений (табл. 1) позволяет предположить, что все они относятся к группе амидов гидроксикоричных кислот [17]. На основании структурных особенностей эти метаболиты можно разделить на четыре группы: метаболиты 1–3 – производные алифатического диамина путресцина, ацилированные остатками гидроксикоричных кислот; метаболит 9 – амид феруловой кислоты с ароматическим моноамином тирамином; метаболиты 5–8 – гексозиды амидов феруловой кислоты с тирамином (метаболиты 5–7) и метокситирамином (метаболит 8); метаболит 4 – гексозид амида феруловой кислоты с ароматическим моноамином октопамином (содержит гидроксильную группу в алифатической части моноамина). Для масс-спектров положительных ионов каждой из этих групп соединений отмечаются определенные особенности.

В масс-спектрах положительных ионов метаболитов 1–3 присутствуют три интенсивных сигнала: ион протонированной молекулы $[M + H]^+$ (справедливость идентификации этого иона подтверждается наличием иона аддукта $[M + Na]^+$) и два осколочных иона, образующихся в результате нейтральной потери 17 Да (отщепление концевой аминогруппы (в виде NH_3 , ион $[M + H - 17]^+$) остатка путресцина) и 88 Да (отщепление целого остатка путресцина, $C_4H_{12}N_2$, ион $[M + H - 88]^+$). Характеристический ион $[M + H - 88]^+$ соответствует остатку гидроксикоричной кислоты, ацилирующей одну из аминогрупп путресцина: для соединений 1 и 2 этот ион имеет значение m/z 163 (характеристический ион остатка кофейной кислоты, $C_9H_7O_3^+$); для соединения 3 – m/z 177 (характеристический ион остатка феруловой кислоты, $C_{10}H_9O_3^+$). Таким образом, метаболиты 1, 2 и 3, по всей видимости, имеют структуру путресцина, ацилированного остатками кофейной (метаболиты 1 и 2) и феруловой (метаболит 3) кислот. Описанные закономерности фрагментации в источнике ионизации $[M + H]^+$ данных соединений вполне согласуются с данными литературы [17, 21].

В масс-спектре соединения 9 присутствуют два интенсивных сигнала: $[M + H]^+$ и осколочный характеристический ион (m/z 177), соответствующий остатку феруловой кислоты. Разница между значениями m/z этих ионов соответствует нейтральной потере остатка тирамина (нейтральная потеря 137 Да, $C_8H_{11}NO$) [17, 18, 22]. На основании этих результатов соединение 9 идентифицировано как амид феруловой кислоты и тирамина.

Фрагментация в источнике ионизации протонированных молекул $[M + H]^+$ соединений 5–8

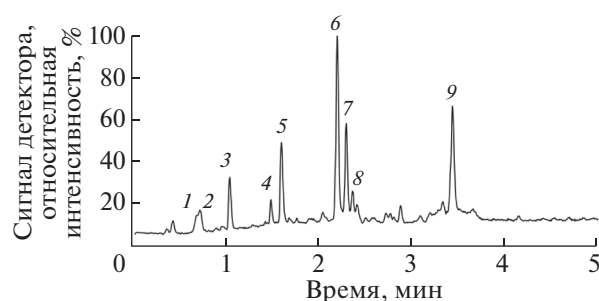


Рис. 1. УЭЖХ ЭР МС хроматограмма (записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* (линия 31, 10 сут выращивания). Номера 1–9 – пики идентифицированных соединений (табл. 1 и 2).

сопровождается образованием серии осколочных ионов, соответствующих последовательному отщеплению одного или двух остатков дегидрированной гексозы (нейтральная потеря 162 Да, $C_6H_{10}O_5$). В масс-спектрах положительных ионов соединений 5–8 присутствует характеристический ион с m/z 177. Анализ закономерностей фрагментации этих метаболитов также позволяет заключить, что в качестве “амино-компоненты” у соединений 5–7 выступает тирамин (нейтральная потеря 137 Да), а у соединения 8 – метокситирамин (нейтральная потеря 167 Да, $C_9H_{13}NO_2$). Таким образом, на основании изложенных результатов можно предположить, что соединения 5–8 соответствуют гликозидам (точнее – гексозидам) амидов феруловой кислоты с тирамином/метокситирамином. На основании данных только масс-спектрометрии невозможно установить, каким в точности моносахаридам соответствуют остатки гексоз, обнаруженных в составе соединений 5–8 [17, 22]. У растений встречаются гексозиды ферулоилтирамина с глюкопиранозой, галактопиранозой или аллопиранозой [17, 20, 22, 23]. Кроме того, на основании полученных масс-спектров нельзя делать выводы о позиции гликозилирования – гидроксильная группа гидроксикоричной кислоты или моноамина (у растений встречаются оба варианта присоединения углеводных цепочек к молекулам фенилэтил-амидов феруловой кислоты) [17, 24, 25]. Остается также нерешенным вопрос о конфигурации двойной связи (в природе встречаются как цис-, так и транс-изомеры) остатка феруловой кислоты [17, 24]. Для уточнения этих элементов структуры соединений 5–8 требуются дополнительные исследования.

Особенностью масс-спектра положительных ионов соединения 4 (по сравнению с масс-спектрами соединений 5–8) является наличие интенсивного иона – продукта отщепления остатка воды (нейтральная потеря 18 Да) непосредственно

Таблица 1. Результаты УЭЖХ-ЭР-МС анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. tirsoanica* (линия 31, 10 сут выращивания в колбах)

Номер пика*	t_R , мин**	Масс-спектры, m/z ***			Результаты идентификации****
		$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	Другие ионы	
1	0.68	251.1381 $C_{13}H_{19}N_2O_3$ (-6.0 ppm)	273.1264 $C_{13}H_{18}N_2O_3Na$ (более 10 ppm)	234.11 $[M + H - 17]^+$ 163.03 $[M + H - 88]^+$	N-кофеоил-путресцин
2	0.72	251.1374 $C_{13}H_{19}N_2O_3$ (-8.8 ppm)	273.1220 $C_{13}H_{18}N_2O_3Na$ (1.8 ppm)	234.11 $[M + H - 17]^+$ 163.03 $[M + H - 88]^+$	Изо-N-кофеоил-путресцин
3	1.04	265.1542 $C_{14}H_{21}N_2O_3$ (-3.8 ppm)	287.1386 $C_{14}H_{20}N_2O_3Na$ (4.9 ppm)	248.13 $[M + H - 17]^+$ 177.03 $[M + H - 88]^+$	N-ферулоил-путресцин
4	1.48	492.1873 $C_{24}H_{30}NO_{10}$ (-0.6 ppm)	514.1654 $C_{24}H_{29}NO_{10}Na$ (-1.6 ppm)	474.18 $[M + H - 18]^+$ 312.12 $[M + H - 18 - 162]^+$ 177.05 $[M + H - 162 - 18 - 135]^+$	N-ферулоил-октопамин-Нex
5	1.60	638.2429 $C_{30}H_{40}NO_{14}$ (-3.1 ppm)	660.2264 $C_{30}H_{39}NO_{14}Na$ (-0.6 ppm)	476.19 $[M + H - 162]^+$ 314.13 $[M + H - 162 - 162]^+$ 177.05 $[M + H - 162 - 162 - 137]^+$	N-ферулоил-тирамин-Нex-Нex
6	2.20	476.1908 $C_{24}H_{30}NO_9$ (-2.7 ppm)	498.1713 $C_{24}H_{29}NO_9Na$ (-5.4 ppm)	314.14 $[M + H - 162]^+$ 177.05 $[M + H - 162 - 137]^+$	N-ферулоил-тирамин-Нex
7	2.29	476.1887 $C_{24}H_{30}NO_9$ (-7.1 ppm)	498.1696 $C_{24}H_{29}NO_9Na$ (-8.8 ppm)	314.13 $[M + H - 162]^+$ 177.06 $[M + H - 162 - 137]^+$	Изо-N-ферулоил-тирамин-Нex
8	2.36	506.1852 $C_{25}H_{32}NO_{10}$ (более 10 ppm)	528.1866 $C_{25}H_{31}NO_{10}Na$ (3.8 ppm)	344.15 $[M + H - 162]^+$ 177.05 $[M + H - 162 - 167]^+$	N-ферулоил-метокситирамин-Нex
9	3.43	314.1385 $C_{18}H_{20}NO_4$ (-2.2 ppm)	336.1226 $C_{18}H_{19}NO_4Na$ (4.2 ppm)	177.03 $[M + H - 137]^+$	N-ферулоил-тирамин

Примечание: * нумерация пиков соответствует таковой на рис. 1; ** время удерживания на хроматографической колонке, мин; *** данные масс-спектров (указаны: значения m/z для обнаруженных ионов, элементарный состав и ошибка определения массы (указана в скобках в единицах миллионной доли (ppm)) ионов $[M + H]^+$ и $[M + Na]^+$); ***** остатки гидроксикоричных кислот, входящие в состав обнаруженных соединений, могут иметь как цис-, так и транс-конфигурацию двойной связи в боковой цепи. Обозначения: Нex — остаток гексозы.

Таблица 2. Результаты УЭЖХ ЭР МС анализа (регистрация отрицательных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* (линия 31, 10 сут выращивания в колбах)

Номер пика*	t_R , мин**	Масс-спектры, m/z ***		Результаты идентификации****
		$[M - H]^-$	Другие ионы	
1	0.68	249.12	499.25 $[2M - H]^-$	N-кофеоил-путресцин
2	0.72	249.12	499.26 $[2M - H]^-$	Изо-N-кофеоил-путресцин
3	1.04	263.16	–	N-ферулоил-путресцин
4	1.48	490.16	981.34 $[2M - H]^-$ 328.12 $[M - H - 162]^-$	N-ферулоил-октопамин-Нex
5	1.60	636.21	1273.46 $[2M - H]^-$ 1319.47 $[2M - H + HCOOH]^-$ 474.16 $[M - H - 162]^-$	N-ферулоил-тирамин-Нex-Нex
6	2.20	474.17	1424.53 $[3M - H]^-$ 949.34 $[2M - H]^-$ 995.37 $[2M - H + HCOOH]^-$ 312.12 $[M - H - 162]^-$ 520.18 $[M - H + HCOOH]^-$ 542.16 $[M - H + HCOONa]^-$ 537.16 $[M - H + HCOONH_4]^-$	N-ферулоил-тирамин-Нex
7	2.29	474.17	949.34 $[2M - H]^-$ 312.12 $[M - H - 162]^-$ 542.16 $[M - H + HCOONa]^-$ 537.17 $[M - H + HCOONH_4]^-$	Изо-N-ферулоил-тирамин-Нex
8	2.36	504.18	1009.38 $[2M - H]^-$ 342.13 $[M - H - 162]^-$ 572.17 $[M - H + HCOONa]^-$ 567.19 $[M - H + HCOONH_4]^-$	N-ферулоил-метокситирамин-Нex
9	3.43	312.12	625.25 $[2M - H]^-$ 380.11 $[M - H + HCOONa]^-$	N-ферулоил-тирамин

Примечание: * нумерация пиков соответствует таковой в табл. 1; ** время удерживания на хроматографической колонке, мин; *** данные масс-спектров (указаны значения m/z для обнаруженных ионов); **** остатки гидроксикоричных кислот, входящие в состав обнаруженных соединений, могут иметь как цис-, так и транс-конфигурацию двойной связи в боковой цепи. Обозначения: Нex – остаток гексозы.

от протонированной молекулы $[M + H]^+$. В масс-спектре также присутствуют осколочные ионы, образующиеся в результате нейтральной потери остатка гексозы и характеристический ион с m/z 177. В совокупности изложенные результаты позволяют предположить, что соединение 4 соответствует гексозиду амида феруловой кислоты с моноамином октопамином (содержит гидроксильную группу в алифатической части молекулы моноамина; наличие двух нейтральных потерь 18 Да и 135 Да (H_2O и C_3H_9NO соответственно)) [18].

Справедливость проведенной интерпретации масс-спектров положительных ионов соединений 1–9 подтверждается результатами УЭЖХ-

ЭР-МС анализа спиртового экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* в режиме детектирования отрицательно-заряженных ионов (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Идентифицированные в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* амиды гидроксикоричных кислот с путресцином (компоненты 1–3) довольно широко распространены у растений и в настоящее время рассматриваются как запасные формы, участвующие в регуляции гомеостаза этого диамина в растительных клетках

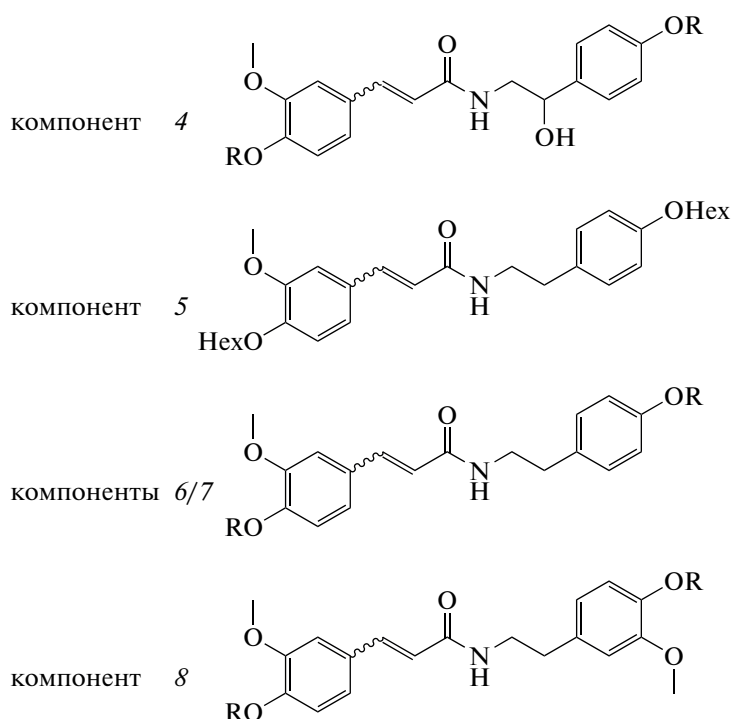


Рис. 2. Структурные формулы идентифицированных (на основании результатов УЭЖХ ЭР МС) в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* гликозидов фенилэтиламидов феруловой кислоты. Обозначения: R – H или Hex. Hex – остаток гексозы.

[26, 27]. Ферулоилтирамин (компонент 9) относится к небольшой группе широко распространенных у растений фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот – индуцибельных метаболитов, участвующих в биохимических реакциях растений на воздействие стресс-факторов различной природы, а также предшественников обширного класса лигнанаминов [26]. В то же время, обнаруженные в культивируемых *in vitro* клетках *M. turcomanica* гликозиды фенилэтиламидов феруловой кислоты (компоненты 4 – 8; рис. 2) относятся к одной из самых редких групп вторичных метаболитов растений. Действительно, если закономерности распространения и биосинтеза фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот изучены достаточно подробно и с завидной частотой обобщаются в обзорных статьях [26, 27], то структурное разнообразие их конъюгатов с остатками сахаров изучено значительно хуже. В настоящее время из растений выделено около 10 моногексозидов (глюкозидов, галактозидов и аллозидов) фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот, а для дигексозидов этих соединений (подобный метаболит идентифицирован в настоящей работе (соединение 5)) описана лишь единственная структура [20, 23–25, 28]. Гликозиды фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот распространены в растительном мире спорадически (зафиксировано их присутствие в представителях семейств *Amaranthaceae*/

Chenopodiaceae, *Aristolochiaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* и *Solanaceae*) и накапливаются в растительных тканях в следовых количествах (содержание этих метаболитов в листьях, стеблях, корнях и корневищах растений редко превышает 0.0008% от сухой массы) [20, 23–25, 28, 29]. Имеющиеся в литературе данные позволяют выдвинуть предположение о запасной и/или транспортной функции гликозидов фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот в клетках растений [29, 30].

Следует подчеркнуть, что все описанные в настоящей работе соединения обнаружены для вида *M. turcomanica* впервые, однако для их более точной структурной идентификации требуются дополнительные исследования.

Важно, что в результате проведенного анализа не удалось обнаружить в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* характерных для растений рода *Mandragora* spp. (и многих других представителей семейства *Solanaceae*) вторичных метаболитов – тропановых алкалоидов, кумаринов и/или витанолидов [10].

Таким образом, в настоящей работе впервые проведено подробное хромато-масс-спектрометрическое изучение вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*. При этом идентифицированы как широко распространенные у растений соединения (амиды гидрокси-

коричных кислот с путресцином и ферулоилтирамин), так и весьма редкие метаболиты (гликозиды фенолэтиламидов гидроксикоричных кислот). Важно, что значительное структурное разнообразие гликозилированных фенолэтиламидов гидроксикоричных кислот обнаружено в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*, которая поддерживается в активно растущем состоянии более 30 лет [11]. Этот результат свидетельствует о сохранении в длительно культивируемых *in vitro* клетках растений способности к образованию весьма сложного набора вторичных метаболитов и противоречит сложившимся представлениям [3] о закономерностях специализированного метаболизма в культурах растительных клеток.

Работа по анализу биохимического состава культуры клеток выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 18-54-06021 Аз_а.

Работы по выращиванию культуры клеток проводили с использованием оборудования “Научно-производственного комплекса на основе разработки природосберегающей Hi-Tech биотехнологии получения высококачественного сырья фармацевтического и пищевого назначения с использованием культивируемых клеток и органов высших растений или микроводорослей”, включая оборудование Уникальных научных установок “Всероссийская коллекция культур клеток высших растений” и “Опытный биотехнологический комплекс” Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН) при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.
2. 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 / Eds. Paek K.-Y. et al. Netherlands: Springer, 2014. P. 563.
3. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnol. Adv. 2002. V. 20. P. 101.
4. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Kuznetsov V.V., Nosov A.M. Detection of Taxuyunnanin C in Suspension Cell Culture of *Taxus canadensis* // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 485. № 1. P. 129.
5. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics // Mass Spectrom. Rev. 2007. V. 26. № 1. P. 51.
6. Yang W.Z., Ye M., Qiao X., Liu C.F., Miao W.J., Bo T., Tao H.Y., Guo D.A. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides // Anal. Chim. Acta. 2012. V. 739. P. 56.
7. Chun S.C., Gopal J., Iyyakannu S., Muthu M. An analytical retrospection of mass spectrometric tools established for plant tissue culture: Current endeavours and future perspectives // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020. V. 126. P. 115843. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115843>
8. Akhani H., Ghorbani A.B. *Mandragora turcomanica* (Solanaceae) in Iran: A new distribution record for an endangered species // Systematics and Biodiversity. 2003. V. 1. № 2. P. 177.
9. Sinev I.E. The history of *Mandragora turkomanica* (Solanaceae) // Isr. J. Plant Sci. 2016. V. 63. № 3. P. 176.
10. Hanuš L.O., Řezanka T., Spížek J., Dembitsky V.M. Substances isolated from *Mandragora* species // Phytochemistry. 2005. V. 66. № 20. P. 2408.
11. Pakhlavouni I.K., Khaibullina L.A., Serebryakova V.N. Carotenoid composition and chloroplast ultrastructure in two cell lines of *Mandragora turcomanica* (Solanaceae) // Russ. J. Plant Physiol. 2000. V. 47. P. 38.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
13. ВРККК ВР. *Mandragora turcomanica* Mizgir. // Паспорт Всероссийской коллекции культур клеток высших растений: ИФР РАН, 1984.
14. Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2011. V. 46. № 5. P. 478.
15. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 649.
16. Brenton A.G., Godfrey A.R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. V. 21. № 11. P. 1821.
17. Nikolić D., Gödecke T., Chen S.-N., White J., Lankin D.C., Pauli G.F., van Breemen R.B. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) // Fitoterapia. 2012. V. 83. № 3. P. 441.
18. Zhang J., Guan S., Sun J., Liu T., Chen P., Feng R., Chen X., Wu W., Yang M., Guo D.A. Characterization and profiling of phenolic amides from *Cortex Lycii* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 2. P. 581.

19. Li Z., Zhao C., Zhao X., Xia Y., Sun X., Xie W., Ye Y., Lu X., Xu G. Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and its *in silico* database // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 24. P. 14321.
20. Yim S.-H., Kim H., Jeong N., Deok K., Lee Y.J., Cho S., Lee I.-S. Novel phenolic and phenolic amide allosides structure-guided identification of novel phenolic and phenolic amide allosides from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia* // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012. V. 33. P. 1253.
21. Sun J., Song Y.L., Zhang J., Huang Z., Huo H.X., Zheng J., Zhang Q., Zhao Y.F., Li J., Tu P.F. Characterization and quantitative analysis of phenylpropanoid amides in eggplant (*Solanum melongena* L.) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 13. P. 3426.
22. Geng P., Harnly J.M., Sun J., Zhang M., Chen P. Feruloyl dopamine-O-hexosides are efficient marker compounds as orthogonal validation for authentication of black cohosh (*Actaea racemosa*) – an UHPLC-HRAM-MS chemometrics study // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. № 10. P. 2591.
23. Zhang F., Han L.-F., Pan G.-X., Peng S., Ndagijimana A. A new phenolic amide glycoside from *Cimicifuga dahurica* // *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica.* 2013. V. 48. P. 1281.
24. Yahagi T., Yamashita Y., Daikonnya A., Wu J.B., Kitanaoka S. New feruloyl tyramine glycosides from *Stephania hispidula* YAMAMOTO // *Chem. Pharm. Bull.* 2010. V. 58. № 3. P. 415.
25. Yang L., Jiang H., Wang Q.H., Yang B.Y., Kuang H.X. A new feruloyl tyramine glycoside from the roots of *Achyranthes bidentata* // *Chin. J. Nat. Med.* 2012. V. 10. № 1. P. 16.
26. Bassard J.E., Ullmann P., Bernier F., Werck-Reichhart D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. № 16. P. 1808.
27. Edreva A.M., Velikova V.B., Tsonev T.D. Phenylamides in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. P. 287.
28. Wu P.L., Su G.C., Wu T.S. Constituents from the stems of *Aristolochia manshuriensis* // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. № 7. P. 996.
29. Sun G., Strebl M., Merz M., Blumberg R., Huang F.C., McGraphery K., Hoffmann T., Schwab W. Glucosylation of the phytoalexin N-feruloyl tyramine modulates the levels of pathogen-responsive metabolites in *Nicotiana benthamiana* // *Plant J.* 2019. V. 100. № 1. P. 20.
30. Mhlongo M.I., Piater L.A., Madala N.E., Steenkamp P.A., Dubery I.A. Phenylpropanoid defences in *Nicotiana tabacum* cells: overlapping metabolomes indicate common aspects to priming responses induced by lipopolysaccharides, chitosan and flagellin-22 // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3: e0151350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151350>