

СОСТАВ ПОЛИФЕНОЛОВ РАСТЕНИЙ *DRACOCEPHALUM CHARKEVICZII* PROB. В УСЛОВИЯХ *IN SITU* И *IN VITRO*

© 2022 г. О. В. Наконечная^а, *, И. В. Гафицкая^а, В. П. Григорчук^а,
Т. Ю. Горпенченко^а, А. Б. Безделев^б, Ю. Н. Журавлев^а

^аФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^бФилиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

“Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского” Дальневосточного отделения
Российской академии наук – Научно-образовательный комплекс “Приморский океанариум”, Владивосток, Россия

*e-mail: markelova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.

После доработки 03.06.2021 г.

Принята к публикации 07.06.2021 г.

Определен состав полифенолов змееголовника Харкевича (*Dracocephalum charkeviczii* Prob., сем. Lamiales) у растений из природной популяции и микрорастений, полученных *in vitro*. В метанольных экстрактах растений методом ВЭЖХ с УФ- и масс-селективным детектированием обнаружено 15 компонентов полифенольной природы, преимущественно, производные кофейной кислоты, а также три гликозилированных флавоноидов – производные акацетина (дигидрокси-метокси-флавоноид). Профили полифенолов в экстрактах микрорастений и растений из природной популяции совпадали. В микрорастениях преобладали розмариновая кислота (в листьях – 63 мкмоль/г сухой массы, в корнях – 11 мкмоль/г сухой массы), кофейная кислота (в корнях – 2 мкмоль/г), рабдозиин (в корнях – 8 мкмоль/г). В корнях растений из природной популяции преобладал рабдозиин в гликозилированной форме (в виде моногликозида – 13 мкмоль/г сухой массы и дигликозида – 4 мкмоль/г сухой массы).

Ключевые слова: *Dracocephalum charkeviczii*, вторичные метаболиты, микроклонирование, *in vitro*

DOI: 10.31857/S0015330322010146

ВВЕДЕНИЕ

Вторичные метаболиты растений являются биологически активными веществами, которые уже много веков использует человек в народной медицине. Они являются основой многих фармакологически важных препаратов и косметических средств. В природе растения производят эти вещества для защиты от неблагоприятных условий среды, что способствует их выживанию [1]. По своему строению “вещества вторичного метаболизма” представлены широким спектром соединений, среди которых многочисленная группа веществ с фенольной структурой [2].

Представители рода *Dracocephalum* (сем. Lamiales) содержат большое разнообразие биологически активных вторичных метаболитов (терпеноиды, флавоноиды, алкалоиды, лигнаны, фенолы, кумарины, глюкозиды) [3], многие из которых находят свое применение в медицине. Одним из таких соединений является розмариновая кислота. Она обладает противовирусным и противовоспалительным действием [4], кроме того, ее используют

как противоопухолевое средство [5]. Имеются сообщения об активности розмариновой кислоты против вируса простого герпеса 1 (HSV-1), вируса иммунодефицита человека (HIV-1) и *Helicobacter pylori* [6]. Другое вещество – рабдозиин – обладает противоаллергической, антиоксидантной, нейропротекторной и анти-ВИЧ активностью [7]. Некоторые виды, например, *D. kotsychy* Boiss., благодаря наличию в них розмариновой кислоты, используются как противоопухолевое средство [8].

Известно, что у растений в стрессовых условиях повышается синтез вторичных метаболитов [9]. Растения морских побережий находятся в стрессовых условиях из-за воздействия критических факторов окружающей среды (засоленность почвы, влияние ветра определенной направленности, импัลверизация соленой водой, специфический температурный режим) [10]. Следовательно, виды, обитающие в таких экологических условиях, обладают повышенной устойчивостью к воздействию среды, и, вероятно, увеличивают биосинтетические процессы в сторону накопления защитных веществ (в том числе, вторичных метаболитов).

Одним из представителей рода *Dracocephalum* является змееголовник Харкевича (*D. charkeviczii* Prob.) — эндемичный (сихотэалинско-южнокурильский) вид [11]. *D. charkeviczii* встречается на склонах морских террас, на приморских песках и галечниках. Это циркум-япономорский прибрежно-морской луговой и псаммо-петрофильный вид [12]. *D. charkeviczii* произрастает на островах залива Петра Великого, в окрестностях г. Владивостока, Уссурийском, Партизанском, Хасанском и Тернейском районах Приморского края, в Сихотэ-Алинском заповеднике и г. Южно-Курильске (о. Кунашир) Сахалинской области. За пределами России вид встречается в приморских районах Японии и Китая [12].

Информации о вторичных метаболитах, находящихся в растениях *D. charkeviczii*, и о лекарственном применении частей растения в известной нам литературе не приведено. Но принадлежность *D. charkeviczii* к семейству Lamiaceae, где у растений разных видов наблюдается накопление ценных для человека вторичных метаболитов, а также приуроченность к морским побережьям позволяют предположить их наличие.

Микроклональное размножение редких и малоизученных видов растений является одним из методов, способствующих увеличению доступности биологического материала для всестороннего изучения, а также сохранения и воспроизведения его ресурсов. Литературные данные по клональному микроразмножению *D. charkeviczii* отсутствуют. К тому же смена условий произрастания и культивирования часто приводит к изменениям в биосинтетических процессах [13] и, как следствие, в продукции вторичных метаболитов.

Цель работы состояла в изучении качественного и количественного состава полифенолов у растений малоизученного вида *D. charkeviczii*, взятых из природной популяции *in situ* и полученных в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в Федеральном научном центре биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) в секторе микроклонального размножения лесных, сельскохозяйственных и декоративных растений (г. Владивосток) в 2018 г.

Объект исследования — змееголовник Харкевича (*Dracocephalum charkeviczii* Prob., сем. Lamiaceae) — многолетний летнезеленый травянистый короткостолбчатый симподиально нарастающий поликарпик с удлиненным приподнимающимся монокарпическим побегом [14]. Растения *D. charkeviczii* произрастали в природной популяции на пологих участках приморских щебнисто-камени-

стых обрывов, покрытых растительностью, характерной для приморских лугов, на полуострове Житкова (о. Русский). Для исследования полифенолов использовали растения из природной популяции и микрорастения, полученные в культуре *in vitro*.

Введение в культуру *in vitro*. Для введения в культуру *in vitro* в апреле 2018 г. были взяты экспланты с растений *D. charkeviczii*. В качестве эксплантов использовали листовую узел с пазушной почкой. Для стерилизации эксплантов использовали методику Р.Г. Бутенко [с. 27, 13], основанную на применении 0.1% раствора диацита (время обработки 4 мин). Для получения стерильных побегов из пазушных почек применяли агаризованную (0.4%) питательную среду с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (МС-среда) [15], взятую в половинной концентрации, с добавлением витаминов по Р.Г. Бутенко [с. 203, 13] и 2% сахарозы. Питательную среду автоклавировали при 0.8 атм в течение 20 мин. Пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде, освещении люминесцентными лампами с интенсивностью 4000 лк и 70% относительной влажности воздуха.

Микроклональное размножение. Для дальнейшего клонального размножения микропобегов *D. charkeviczii* использовали вышеприведенную питательную среду с добавлением 1.0 мг/л индолмасляной кислоты (ИМК), рН 4.6. Культивирование микропобегов проводили в условиях культуральной комнаты.

Исследование состава полифенолов. Для исследования профиля полифенолов использовали корни и листья микрорастений и растений *D. charkeviczii* из природной популяции. Сухой измельченный материал массой 100 мг (точная навеска) экстрагировали в 2 мл 80% метилового спирта в течение 30 мин на ультразвуковой бане и выдерживали при комнатной температуре в темноте 20 ч. Затем экстракты центрифугировали (15000 g, 10 мин) и полученный супернатант фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, Bedford, MA, США). Аликвоту (1.0 мкл) полученного раствора использовали для аналитической хроматографии.

Экстракты анализировали с помощью оборудования Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН: хроматографа 1260 Infinity (Agilent, США) и tandemного масс-спектрометра Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия), оснащенного ионной ловушкой. Разделение компонентов экстрактов проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США) при 40°C. УФ-спектры записывали в диапазоне длин

волн от 200 до 400 нм с использованием детектора на диодной матрице G1315D (Agilent, США). Подвижная фаза состояла из раствора муравьиной кислоты (0.1%) в деионизированной воде и ацетонитрила. Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0.2 мл/мин. УФ-сигнал для количественного определения записывали при $\lambda = 265$ и 330 нм. Масс-спектрометрический (МС) сигнал записывали в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных и положительных ионов в диапазоне значений m/z (отношение массы к заряду) 100–1000. Тандемную масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме при напряжении фрагментации 1.0 В.

Аналитическую ВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР) для подтверждения идентификации биологически активных веществ проводили в лаборатории сравнительной биохимии “Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского” ДВО РАН с использованием хроматомасс-спектрометра Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Япония), оснащенный жидкостным хроматографом высокого давления LC-20A Prominence и времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Условия хроматографического разделения оставили без изменений. МС данные получали в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных ионов с разрешением 12000.

Идентификацию компонентов проводили путем сравнения времени удерживания, УФ и МС данных, а также имеющихся в наличии стандартных образцов и/или литературных данных [7, 16–21].

Количественное определение идентифицированных компонентов экстрактов *D. charkeviczii* проводили методом абсолютной градуировки с использованием коммерчески доступных стандартных образцов кемпферола (Sigma, Германия) и кофейной кислоты (Sigma, США). Для идентификации использовали хлорогеновую кислоту (Sigma, США) и выделенные и описанные ранее розмариновую кислоту и рабдозиин [22].

Калибровочные кривые построены с использованием кофейной кислоты (для определения содержания кофейной кислоты и ее производных) и кемпферола (для определения содержания производных акацетина) в диапазоне концентраций 0.007–5.5 мкмоль/мл, с коэффициентом корреляции R^2 не менее 0.999. Содержание каждого индивидуального компонента представляет собой среднее значение из трех параллельно проведенных анализов и выражено в мкмоль/г сухого веса, а также пересчитано с поправкой на молярную массу искомого компонента и выражено в %/г сухого веса.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакета “Statistica” версии 10.0. Для вы-

явления отличий между группами микрорастений, выращенных на разных вариантах сред, использовали сравнение с контрольными растениями с учетом t -критерия Стьюдента для 95% уровня значимости. В эксперименте при проверке статистических гипотез критический уровень значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС исследованы метанольные экстракты *D. charkeviczii* и определены 15 биологически активных компонентов полифенольной природы (рис. 1). Использование МСВР позволило установить точные массы исследуемых компонентов и определить их элементный состав. В табл. 1 суммированы данные УФ и хроматомасс-спектрометрического обнаружения основных полифенолов *D. charkeviczii*, среди которых 12 компонентов – это кофейная кислота и ее производные, а также 3 гликозилированных флавонов – производные акацетина (дигидрокси-метокси-флавоны). Компоненты, соответствующие пикам 2, 4, 9 и 11 (рис. 1), были определены как хлорогеновая (2), кофейная (4), розмариновая (11) кислоты и тетрамер кофейной кислоты рабдозиин (9), благодаря их абсолютному сходству (времени удерживания, УФ и масс-спектры, профиль МС/МС фрагментации) с имеющимися в наличии стандартными образцами (рис. 1). Необходимо отметить, что кофейная и розмариновая кислоты были ранее обнаружены у представителей рода *Dracocephalum* [3, 6, 8, 16, 17, 21]. Исходя из сходного спектрального поведения компоненты 1 и 3 определены как изомеры хлорогеновой кислоты. Сравнение с литературными данными [18] профилей фрагментации их депротонированных ионов и порядка элюирования на обращенной фазе позволило идентифицировать компоненты 1 и 3 как 3-кофеоилхинная и 4-кофеоилхинная кислоты, соответственно. Вещества, соответствующие пикам 5, 6 и 8, продемонстрировали УФ профили, сходные со спектром рабдозиина. Рассчитанные при помощи МСВР брутто-формулы соединений 6 и 8 ($C_{42}H_{40}O_{21}$) отличались от формулы рабдозиина ($C_{36}H_{30}O_{16}$) на один фрагмент гексозы ($C_6H_{10}O_5$), а формула компонента 5 ($C_{48}H_{50}O_{26}$) – на два таких фрагмента. Согласно характеру МС/МС фрагментации $[M-H]^-$ ионов и порядку элюирования компоненты 6 и 8 были определены как два изомера гексозида рабдозиина, а компонент 5 как дигексозид рабдозиина. Компонент 7 в МСВР-спектре продемонстрировал интенсивный сигнал с m/z 521.1290, что соответствует молекулярной формуле $C_{24}H_{26}O_{13}$ и отличается от розмариновой кислоты ($[M-H]^-$ с m/z 359.0779, $C_{18}H_{16}O_8$) на один фрагмент гексозы. Фрагментация ионов с m/z 521 показала наличие дочерних ионов с

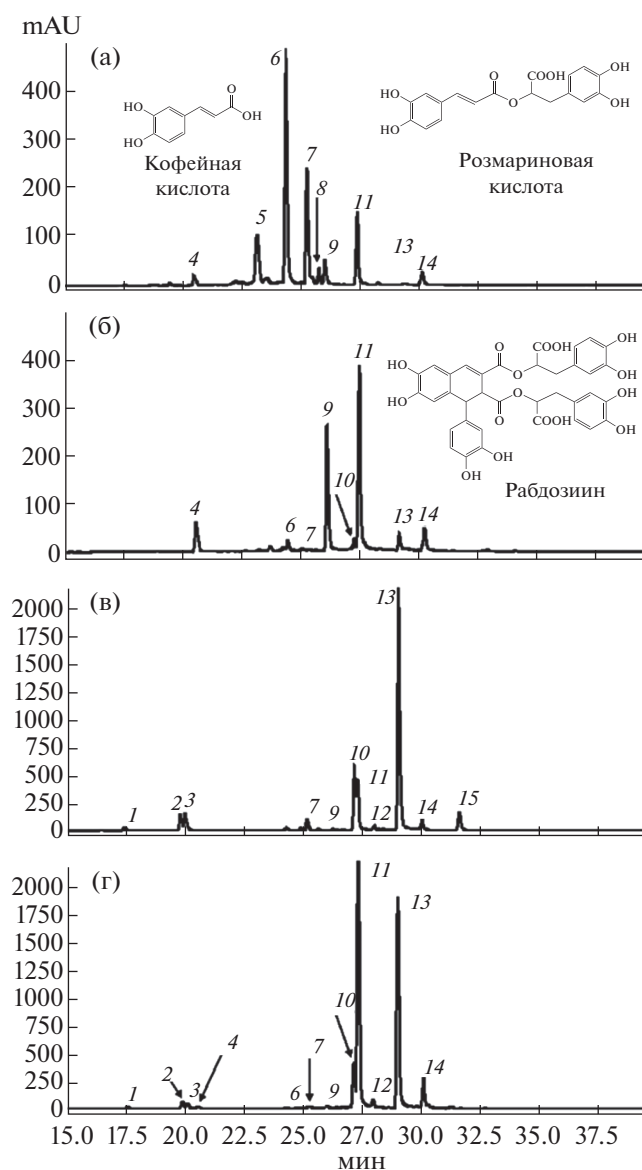


Рис. 1. Хроматографические профили ВЭЖХ-УФ анализа метанольных экстрактов из корней (а, б) и листьев (в, г) растений *D. charkeviczii* из природной популяции и микрорастений, соответственно, зарегистрированные при $\lambda = 330$ нм. Нумерация пиков соответствует табл. 1. 1 – 3-кофеоилхинная кислота, 2 – хлорогеновая кислота, 3 – 4-кофеоилхинная кислота, 4 – кофейная кислота, 5 – дигексозид рабдозиина, 6 – моногексозид рабдозиина, 7 – гексозид розмариновой кислоты, 8 – моногексозид рабдозиина изомер, 9 – рабдозин, 10 – акацетин рамнозил-тригексозид, 11 – розмариновая кислота, 12 и 13 – изомеры акацетина рамнозил-тригексозида ацетилированного, 14 – сальвианоловая кислота В, 15 – дегидрорабдозин.

m/z 359, что соответствует потере остатка гексозы (-162), а также наличие нескольких дочерних ионов меньшей интенсивности (с m/z 223, 197, 179, 161), что соответствует профилю фрагментации розмариновой кислоты. Так компонент 7 был иден-

тифицирован как гексозид розмариновой кислоты, что подтверждается ранее опубликованными литературными данными [7, 20]. МСВР-спектр соединения 14 показал наличие сигнала с m/z 717.1452 ($C_{36}H_{30}O_{16}$), что позволило определить его как изомер рабдозиина, идентифицированный ранее как сальвианоловая кислота В [16, 17]. Для компонента 15 ($[M-H]^-$ с m/z 715.1296, $C_{36}H_{28}O_{16}$), рассчитанная при помощи МСВР формальная непрелдельность оказалась на единицу больше, чем у рабдозиина ($[M-H]^-$ с m/z 717.1453, $C_{36}H_{30}O_{16}$), что позволило предположить наличие в его структуре еще одной двойной связи. Соединение 15 было предположительно идентифицировано как дегидрорабдозин (или изомер), описанный ранее в литературе [7].

Соединения, соответствующие пикам 10, 12 и 13, были отнесены к флавоноидам, согласно типичному для них УФ профилю. МС данные для этих пиков, записанные в режиме регистрации отрицательных ионов, оказались недостаточными для проведения идентификации. Поэтому было решено провести тандемную масс-спектрометрию для положительных ионов. Исследуемые компоненты в МС/МС спектрах ионов-прекурсоров $[M+H]^+$ обнаружили присутствие интенсивных сигналов фрагментов с m/z 285, что позволило допустить, что соединения 10, 12 и 13 являются производными акацетина, о наличии которых в различных видах *Dracosephalum* сообщалось ранее [19, 21]. Пик 10 ($[M-H]^-$ с m/z 915.2774, $C_{18}H_{16}O_8$) продемонстрировал содержательную фрагментацию протонированных ионов ($[M+H]^+$ с m/z 917) с образованием продуктов с m/z 771, 609, 447 и 285, что определяется последовательным элиминированием остатков дезоксигексозы (-146) и трех гексоз (-162), соответственно. Соединение 10 было идентифицировано как акацетин рамнозил-тригексозид, как было определено ранее [21]. Компоненты 12 и 13 показали сходные МС характеристики в положительном и отрицательном режимах и были определены как два изомера ацетилированного акацетина рамнозил-тригексозида, как было описано ранее [21].

Наши данные выявили неравномерный характер распределения биологически активных соединений в листьях и корнях растений *D. charkeviczii* (рис. 2). В корнях природных растений в небольшом количестве содержалась кофейная кислота. Это соединение является предшественником большого количества полифенолов и встречается практически во всех видах растений. Розмариновая кислота, являющаяся эфиром кофейной кислоты и 3,4-дигидроксибензил-молочной кислоты, и ее производные – тетрамеры кофейной кислоты: сальвианоловая кислота В и рабдозин, также присутствовали, но в большем количестве (рис. 1 и 2). При этом в корнях преобладали гликозилирован-

Таблица 1. Список основных соединений, идентифицированных в неочищенных экстрактах *Dracoscephalum charkeviczii* методом ВЭЖХ-УФ-МС

№ пика	$t_{уд}$, мин	λ_{max} , нм	МСНР, [M-H] ⁻ , m/z	МС/МС фрагментация, основные ионы выделены жирным шрифтом, m/z	Формула	МСВР, [M-H] ⁻ , m/z	Погрешность, mDa	Результаты идентификации
1	17.7	300sh, 325	353	191 , 179, 135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0884	0.6	3-кофеилхинная кислота
2	20.1	300sh, 325	353	191	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0872	0.6	хлорогеновая кислота
3	20.3	300sh, 327	353	191, 179, 173 , 135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0869	0.9	4-кофеилхинная кислота
4	20.8	298sh, 324	179	135	C ₉ H ₈ O ₄	179.0342	0.8	кофейная кислота
5	23.2	250, 284, 308, 340	1041	879, 717, 681 , 519 , 501 , 475, 339	C ₄₈ H ₅₀ O ₂₆	1041.2515	0.3	рабдозин ди- <i>O</i> -гексозид
6	24.5	250, 285, 308, 340	879	717 , 699, 655, 537, 519 , 475, 339	C ₄₂ H ₄₀ O ₂₁	879.1985	0.4	рабдозин- <i>O</i> -гексозид I
7	25.5	315	521	359 , 223, 197, 179, 161	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	521.129	1.1	розмариновой кислоты <i>O</i> -гексозид
8	25.9	247, 285, 340	879	717, 699, 681 , 637, 519, 501 , 475 , 365, 339	C ₄₂ H ₄₀ O ₂₁	879.1994	0.5	рабдозин- <i>O</i> -гексозид II
9	26.3	254, 283, 315sh, 346	717	537, 519 , 475, 365, 339	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.1453	0.8	рабдозин
10	27.5	267, 334	917*	771, 609, 447, 285	C ₄₀ H ₅₂ O ₂₄	915.2774	0.2	акацетин- <i>O</i> -рамнозил-три- <i>O</i> -гексозид
			915	753 , 283				
11	27.7	295sh, 328	359	223, 197 , 179 , 161 , 135	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.0779	0.7	розмариновая кислота
12	28.4	267, 335	959*	813, 797, 651 , 593, 447 , 285	C ₄₂ H ₅₄ O ₂₅	957.2885	0.4	акацетин- <i>O</i> -рамнозил-три- <i>O</i> -гексозид ацетилированный I
			957	915 , 897 , 753				
13	29.4	268, 333	959*	813 , 797, 651 , 593, 447 , 285	C ₄₂ H ₅₄ O ₂₅	957.2891	1.0	акацетин- <i>O</i> -рамнозил-три- <i>O</i> -гексозид ацетилированный II
			957	915 , 897 , 795, 753, 649, 445, 283				
14	30.6	288sh, 330	717	519 , 339	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.1452	0.9	сальвианоловая кислота B
15	32.1	290sh, 318	715	535 , 517, 491, 355, 311	C ₃₆ H ₂₈ O ₁₆	715.1296	0.9	дегидрорабдозин

* – протонированные ионы состава [M + H]⁺.

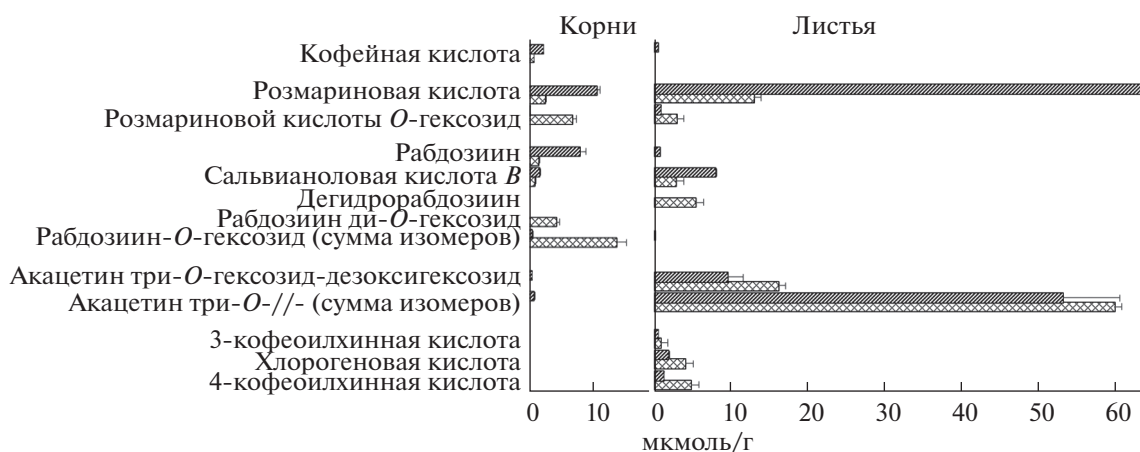


Рис. 2. Диаграмма распределения полифенольных соединений в органах растений *D. charkeviczii* *in vitro* (▨) и *in situ* (▩).

ные формы рабдозина (суммарно для гликозидов 18.3 мкмоль/г сухого веса (1.7% сухого веса)), тогда как в листьях эфиры хинной и кофейной кислот – хлорогеновая кислота, 3-кофеилхинная и 4-кофеилхинная кислоты, которые, как известно, участвуют в процессах дыхания растений [с. 265, 23]. Кроме того, в больших количествах в листьях присутствовал акацетин в гликозилированной форме (для ацетилированного производного до 59 мкмоль/г сухого веса, 5.6%/г сухого веса, соответственно). Другое уникальное вещество – дегидрорабдозин было идентифицировано только в листьях растений из природной популяции.

Анализ состава метаболических профилей экстрактов показал, что в целом в микрорастениях *in vitro* идентифицированы те же вещества, что и в растениях из природной популяции (рис. 1). Профиль распределения веществ в органах микрорастений значительно не менялся по сравнению с органами дикорастущих растений (рис. 2). Однако в микрорастениях преобладали вещества в виде свободных агликонов, тогда как в растениях из природной популяции эти вещества находились в гликозилированной форме (рис. 2). Например, в листьях микрорастений содержание розмариновой кислоты составляло 63 мкмоль/г сухого веса (2.3% сухого веса), что в 5 раз превышало ее содержание в листьях природных растений. Аналогичный эффект наблюдался и в корнях для рабдозина (в микрорастениях 8 мкмоль/г сухого веса (0.6% сухого веса), в природных растениях около 1.5 мкмоль/г сухого веса (0.1% сухого веса)). Можно предположить, что микрорастения *in vitro* более свободно осуществляют водно-солевой обмен между корневой системой и МС-средой. Это способствовало выходу веществ в среду культивирования и, вероятно, снижению цитотоксичности внутри микрорастений. Следует отметить, что в листьях микрорастений содержание хлорогено-

вой кислоты и ее изомеров было ниже в сравнении с природными растениями (рис. 2).

Содержание розмариновой кислоты в листьях микрорастений *D. charkeviczii* было выше (63.3 мкмоль/г или 22.8 мг/г сухого веса) (рис. 2), чем в культуре корней (19.97 мг/г сухого веса) и корнях однолетних растений *D. forrestii* (4.7 мг/г сухого веса), выращиваемых в поле [16]. Однако ее содержание было ниже, чем у клеточных культур, выращиваемых на средах с гормонами и различными элиситорами [24]. Особый интерес представляет исследование, в котором показано, что волосатые корни *D. moldavica* продуцировали розмариновую кислоту в концентрации до 78 мг/г сухого веса после оптимизации состава культуральной среды [6]. В работе Фатахи с соавт. [8] приводятся сведения о том, что содержание розмариновой кислоты в культуре корней *D. kotschyi*, полученных после заражения штаммом *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402, варьировало от 10 до 1500 мкг/г сухого веса, что в 15 раз выше, чем в интактных корнях. При исследовании листьев 96 видов сем. *Lamiaceae* было обнаружено, что концентрация розмариновой кислоты варьировала от 0.01 до 9.30 мг/г сухого веса, а содержание кофейной кислоты от 0 до 0.62 мг/г сухого веса [25].

Спектр вторичных метаболитов является отражением физиологического и биохимического состояния организма, и процессы синтеза веществ могут быть связаны с онтогенетическим развитием растения. Недавние исследования показали, что фенологические стадии являются одними из наиболее влиятельных факторов в вариациях вторичных метаболитов [26]. В нашем случае, исследуемые микрорастения находились в виргинильном онтогенетическом состоянии, тогда как растения из природной популяции – в среднем генеративном. Кроме того, для получения гликозилированных форм веществ необходима стадия биосинтеза, отвечающая за реакцию присоедине-

ния сахаров к агликонам и работа дополнительных ферментных систем, обеспечивающих переход веществ в активную или неактивную форму [27]. Возможно, микрорастения не успевали преобразовать вещества в гликозилированные формы из-за недостатка времени, необходимого для достижения генеративного состояния. Этим может объясняться и обнаружение в них достаточно большого количества кофейной кислоты, важной в дальнейших стадиях синтеза изомеров и эфиров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профили биологически активных веществ в микрорастениях *D. charkeviczii* сравнимы с таковыми в дикорастущих растениях, что открывает возможность их дальнейшего изучения с перспективой использования. Показано неравномерное распределение веществ в исследованных группах растений с преобладанием кофейной кислоты и рабдозиина в корнях, розмариновой кислоты и производных акацетина в листьях. В дикорастущих растениях преобладали гликозилированные формы веществ в отличие от микрорастений. Вероятно, это определено физиологическими процессами, связанными с фенологическими фазами развития микрорастений.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Demain A.L., Fang A.* The natural functions of secondary metabolites // History of modern biotechnology I (Advances in biochemical engineering/biotechnology) / Ed. A. Fiechter, Springer, Berlin, Heidelberg. 2000. V. 69. P. 1. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
2. *Bulgakov V.P., Inyushkina Y.V., Fedoreyev S.* Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications // Crit. Rev. Biotechnol. 2012. V. 32. P. 203. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.596804>
3. *Zeng Q., Jin H., Qin J., Fu J., Hu X., Liu J., Yan L., Zhang W.* Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum* // Chem. Biodivers. 2010. V. 7. P. 1911. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900188>
4. *Swarup V., Ghosh J., Ghosh S., Saxena A., Basu A.* Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. V. 51. P. 3367. <https://doi.org/10.1128/AAC.00041-07>
5. *Anusuya C., Manoharan S.* Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch car-cinogenesis // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2011. V. 30. P. 199. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v30.i3.30>
6. *Weremczuk-Jeżyna I., Grzegorzczak-Karolak I., Frydrych B., Królicka A., Wysokińska H.* Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 2095. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1244-7>
7. *Trifan A., Wolfram E., Esslinger N., Grubelnik A., Skalik-Woźniak K., Minceva M., Luca S.V.* Globoidnan A, rabdosiin and globoidnan B as new phenolic markers in European – sourced comfrey (*Symphytum officinale* L.) root samples // Phytochem. Anal. 2020. P. 1. <https://doi.org/10.1002/pca.2996>
8. *Fattahi M., Nazeri V., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Zamani Z., Palazon J.* A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss // Ind. Crops Prod. 2013. V. 50. P. 256. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.029>
9. *Winkel-Shirley B.* Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 218.
10. *Voronkova N.M., Burkovskaya E.V., Bezdeleva T.A., Burundukova O.L.* Morphological and biological features of plants related to their adaptation to coastal habitats // Russ. J. Ecol. 2008. V. 39. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S1067413608010013>
11. *Kozhevnikov A.E., Kozhevnikova Z.V., Kwak M., Lee B.Y.* Illustrated flora of the Primorsky Territory [Russian Far East]. National Institute of Biological Resources, Incheon, 2019. 1124 p.
12. *Пробатова Н.С., Баркалов В.Ю., Нечаев В.А.* Хромосомные числа сосудистых растений в Приморском крае: дальнейшее изучение // Ученые записки ЗабГУ. Серия: Естественные науки. 2016. Т. 11. № 1. С. 27.
13. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 272 с.
14. *Безделев А.Б., Безделева Т.А.* Жизненные формы семенных растений российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006. 296 с.
15. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
16. *Weremczuk-Jeżyna I., Skala E., Olszewska M.A., Kiss A.K., Balcerczak E., Wysokińska H., Kicel A.* The identification and quantitative determination of rosmarinic acid and salvianolic acid B in hairy root cultures of *Dracocephalum forrestii* W.W. Smith // Ind. Crops Prod. 2016. V. 91. P. 125. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.002>
17. *Weremczuk-Jeżyna I., Kuźma Ł., Kiss A.K., Grzegorzczak-Karolak I.* Effect of cytokinins on shoots proliferation and rosmarinic and salvianolic acid B production in shoot culture of *Dracocephalum forrestii* W.W. Smith // Acta Physiol. Plant. 2018. V. 40. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2763-z>
18. *Clifford M.N., Knight S., Kuhnert N.* Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 3821. <https://doi.org/10.1021/jf050046h>
19. *Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurabaquio A., López-Rubalcava C., Heinze G.* Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L.

- (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract // J. Ethnopharmacol. 2012. V. 141. P. 908.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.028>
20. Zhang J.L., Yan R.J., Yu N., Zhang X., Chen D.J., Wu T., Xin J.G. A new caffeic acid tetramer from the *Dracocephalum moldavica* L. // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32. P. 370.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1359168>
21. Weremczuk-Jeżyna I., Skąła E., Kuźma Ł., Kiss A.K., Grzegorzczak-Karolak I. The effect of purine-type cytokinin on the proliferation and production of phenolic compounds in transformed shoots of *Dracocephalum forrestii* // J. Biotechnol. 2019. V. 306. P. 125.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.014>
22. Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Krivoschekova O.E., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Glazunov V.P., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. Caffeic acid metabolites from *Eritrichium sericeum* cell cultures // Planta medica. 2005. V. 71. P. 446.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-864141>
23. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: в 2-х т. Т. 2. Пер. с англ. Москва: Мир, 1986. 312 с.
24. Bulgakov V.P., Vereshchagina Y.V., Veremeichik G.N. Anticancer polyphenols from cultured plant cells: production and new bioengineering strategies // Curr. Med. Chem. 2017. V. 24. P. 1.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666170609080357>
25. Janicsak G., Mathe I., Miklossy-Vari V., Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species // Biochem. Syst. Ecol. 1999. V. 27. P. 733.
[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00007-1)
26. Fattahi M., Bonfill M., Fattahi B., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Palazon J. Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschyi* Boiss at three phenological stages using uni- and multivariate methods // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2016. V. 3. P. 177.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.04.002>
27. Nosov A.M. Functions of plant secondary metabolites *in vivo* and *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. 1994. V. 41. P. 767.