

УДК 543.51; 58.085; 615.322

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ГИПЕРИЦИНА, ПСЕВДОГИПЕРИЦИНА И ГИПЕРФОРИНА В КУЛЬТУРНОМ И ДИКОРАСТУЩЕМ *HYPERICUM PERFORATUM* L. *IN VIVO* И *IN VITRO*

© В.Н. Овчинникова¹, И.С. Гончарова², П.Н. Харченко¹, Т.Г. Леонова^{1*}, А.К. Буряк²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550 (Россия),
e-mail: tleon2007@yandex.ru

²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Ленинский проспект, 31, к. 4, Москва, 119071 (Россия)

Исследовали способность к образованию гиперического, псевдогиперического и гиперического в интактных (*in vivo*) растениях *Hypericum perforatum* L. (зверобой продырявленный) и полученных методом микроклонального размножения (*in vitro*). В качестве объектов исследования использовали дикорастущие и культурные (сорт Солнечный) растения. Надземную часть растений, полученных *in vivo*, а также листья, стебли и каллусную ткань растений, полученных *in vitro*, подвергали лиофильной сушке. Перед началом измерений проводили экстракцию метанолом в течение 1 ч. Для обнаружения указанных химических соединений применяли времяпролетный масс-спектрометр с лазерной десорбцией/ионизацией (ЛДИ). В метанольном экстракте лиофильно высушенных дикорастущих и культурных растениях, выращенных *in vivo*, были обнаружены все исследуемые соединения. При выращивании *in vitro* в дикорастущем зверобое были также определены все вышеуказанные соединения, однако в растениях сорта Солнечный гиперический масс-спектрометрически идентифицировать не удалось. После хранения лиофильно высушенных растений в эксикаторе в темноте при 20 °С в течение 2,5 месяца в темноте удалось обнаружить все изучаемые соединения только у растений, выращенных *in vivo*. В растениях дикорастущего и культурного зверобоя, выращенных *in vitro*, был обнаружен только псевдогиперический.

Ключевые слова: зверобой, микроклональное размножение, гиперический, псевдогиперический, гиперический, лазерная десорбция/ионизация (ЛДИ).

Введение

Лекарственные растения синтезируют огромный спектр вторичных метаболитов, которые находят применение в фармакологической промышленности. Зверобой – источник важных биологически активных соединений, таких как нафтодиантроны (гиперический, псевдогиперический и др.), флороглюцины (гиперический) [1]. Кроме растений гиперический был обнаружен и в грибах эндофитах, которые обитают в зверобое [2].

Род *Hypericum* включает 484 вида, но наиболее интенсивно используется в медицинской практике *Hypericum perforatum* L. (зверобой продырявленный) [3]. Предпочтение этому виду отдается в связи с тем, что именно в этом виде в достаточном количестве найдены соединения, которые представляют интерес для медиков и фармацевтов.

Клинические исследования показали, что зверобой представляет наибольший интерес в качестве антидепрессанта, но также изучается противовирусная, противовоспалительная, антиоксидантная актив-

Овчинникова Вера Николаевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
e-mail: tleon2007@yandex.ru

Гончарова Ирина Сергеевна – аспирант,
e-mail: tleon2007@yandex.ru

Харченко Петр Николаевич – академик РАН,
e-mail: tleon2007@yandex.ru

Леонова Татьяна Геннадиевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
e-mail: tleon2007@yandex.ru

Буряк Алексей Константинович – доктор химических наук, заведующий лабораторией, профессор,
e-mail: akburyak@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

ность. В последнее время обнаружено, что гиперин является одним из самых мощных фотосенсибилизаторов в природе и это его свойство может быть использовано в фотодинамической терапии рака [4]. Интенсивно изучается свойство гиперфорина стимулировать рост и дифференциацию кератиноцитов [1]. Следует отметить, что впервые структура гиперфорина была определена советскими исследователями [5]. Количество вторичных метаболитов зверобоя зависит не только от вида зверобоя, но и от сезона, погодных условий и других факторов окружающей среды. Многочисленные исследования посвящены изучению способности зверобоя синтезировать вторичные метаболиты в культуре *in vitro* [6, 7]. Культура тканей растений имеет определенные преимущества перед традиционным растительным сырьем, так как биологически активный продукт можно получать независимо от распространения растения, сезона, погодных условий, почвы. Если учесть быстрое истощение естественных ресурсов, а также загрязнение растений естественными и антропогенными веществами, то преимущества использования клеточных технологий становится очевидным. Кроме того, использование методов биотехнологии, в том числе генной и метаболической инженерии, позволит увеличить образование фармакологически активных соединений в промышленном производстве [8].

В зверобое определен набор генов, предположительно ответственных за синтез активных ингредиентов [9]. Одним из главных подходов для выращивания растений *in vitro* является выбор наиболее продуктивных с точки зрения синтеза вторичных метаболитов видов, сортов лекарственного растения. Состав и стабильность фармацевтических препаратов зверобоя в значительной степени варьируется в зависимости от способов подготовки растительного материала, липофильности растворителя и условий хранения [10–12]. Хорошо известна нестабильность гиперина и гиперфорина под действием света, температуры и т.д. [13]. В настоящее время в литературе описаны разные способы подготовки растений зверобоя к химическому анализу, а также представлены различные методы определения гиперина и гиперфорина [14]. Среди этих методов наиболее привлекательным является метод лазерной десорбции/ионизации (ЛДИ) и его варианты – методы матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ/ПАЛДИ), благодаря экспрессности определения и, в ряде случаев, отсутствия сложной пробоподготовки. С нашей точки зрения, правильнее указывать оба метода вместе, поскольку часто трудно исключить влияние поверхности даже при использовании инертных подложек [15]. Метод ЛДИ может быть применен для изучения распределения вторичных метаболитов (гиперин, псевдогиперин) в различных видах зверобоя [16]. Кроме того, эти методы обладают высокой чувствительностью, позволяя обнаруживать соединения в концентрации на уровне 1 фемтомоля, что позволяет использовать незначительные навески растений.

Цель данного исследования – определить методом ЛДИ способность культурного (сорт Солнечный) и дикорастущего зверобоя к синтезу гиперина, псевдогиперина и гиперфорина в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили растения *Hypericum perforatum* L. культурные (сорт Солнечный зверобоя продырявленного) и дикорастущий (семена собраны в Московской области). Для проведения опытов *in vitro* использовали метод микроклонального размножения. Семена в течение 7 мин стерилизовали в 0,1%-ном диациде [17], три раза промывали стерильной деионизованной водой и помещали их для прорастания на среду Мурасига-Скуга (МС) с 2% сахарозы, 0,7% агара, pH – 5,7 [18]. После образования 2–3 листьев двуузловые апикальные черенки для индукции побегообразования пересаживали на среду МС, содержащую индолилмасляную кислоту (ИМК) в концентрации 0,1 мг/л. Среды были автоклавированы (20 мин, 120 °С). Растения выращивали в климатической камере WLR-351 (Япония) при 25 °С днем, 16 °С ночью и продолжительности светового дня 16 ч. Через месяц культивирования растения использовали для химического анализа.

Для получения растений *in vivo* стерилизованные семена высевали в рассадные горшочки диаметром 10 см с торфогрунтом («ФАРТ», Россия). Растения выращивали в теплице при 25 °С днем, 16 °С – ночью и продолжительностью светового дня 16 ч. Растения использовали для масс-спектрометрического анализа после выращивания в течение 1 месяца с момента прорастания.

После фиксации жидким азотом надземные части растения, полученные *in vivo*, а также листья, стебли и каллусную ткань растений, полученные *in vitro*, лиофильно высушивали. Пробы состояли из 6–8 растений. Первую серию растений анализировали сразу после высушивания, другую серию – после 2,5 месяца хранения в эксикаторе при температуре не выше 20 °С, без доступа света и воздуха. Гиперин,

псевдогиперицин и гиперфорин определяли в вытяжках, полученных при растирании 30 мг лиофилизированного растительного материала с последующей экстракцией в 5 мл метанола (HPLC-grade) в течение 1 ч при 24 °С.

Для исследования образцов поверхности использовали времяпролетный масс-спектрометр Bruker Daltonics Ultraflex II (Bruker, Германия), оборудованный азотным лазером с рабочей длиной волны 337 нм и максимальной энергией 110 мкДж. Эксперименты проводились в режиме рефлектрона и регистрации положительных и отрицательных ионов. Диапазон масс – 20–3600 дальтон (Да). Для получения и обработки масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker «Flex Control 3.4» и «Flex Analysis 3.4». Все три определяемых компонента способны депротонироваться в условиях лазерной десорбции/ионизации с образованием отрицательно заряженных молекулярных ионов без использования матрицы, что упрощает процедуру пробоподготовки. Пример полученного спектра ЛДИ в режиме регистрации отрицательных ионов представлен на рисунке.

Статистическое сравнение экспериментально полученного изотопного распределения с теоретически рассчитанным с помощью доступной в Интернете программы IsoPro 3.0 проводили на основе простого теста Стьюдента, показавшего соответствие полученных изотопных распределений с их расчетными значениями. Таким образом проводили идентификацию всех групп пиков в полученных масс-спектрах.

Обсуждение результатов

В дикорастущих и культурных растениях *in vivo* были обнаружены гиперицин, псевдогиперицин и гиперфорин (табл. 1). Следует подчеркнуть, что содержание гиперфорина в растениях сорта Солнечный было выше, чем в дикорастущих растениях. В дикорастущих растениях, полученных *in vitro*, также были найдены все изучаемые соединения. Однако выращивание растений сорта Солнечный в системе *in vitro* приводило к возникновению различий по сравнению с растениями, выращенными *in vivo*. В образцах сорта Солнечный в условиях *in vitro* гиперфорин не был определен масс-спектрометрически. Наибольшее содержание псевдогиперицина наблюдали при выращивании растений *in vitro*.

Исследование растительных экстрактов, полученных при хранении лиофилизированных образцов в течение 2,5 месяца в эксикаторе при температуре 20 °С (табл. 2), показало, что в растениях, выращенных *in vivo*, присутствуют все соединения, но содержание гиперфорина снизилось, а псевдогиперицина и гиперфорина – возросло. Однако в растениях, выращенных *in vitro*, был найден только псевдогиперицин.

Масс-спектр экстракта зверобоя (сорт Солнечный, *in vivo*), полученный в режиме регистрации отрицательных ионов, где А – гиперицин ($m/z [M-H]^- = 503,4$), В – псевдогиперицин ($m/z [M-H]^- = 519,5$), С – гиперфорин ($m/z [M-H]^- = 535,8$)

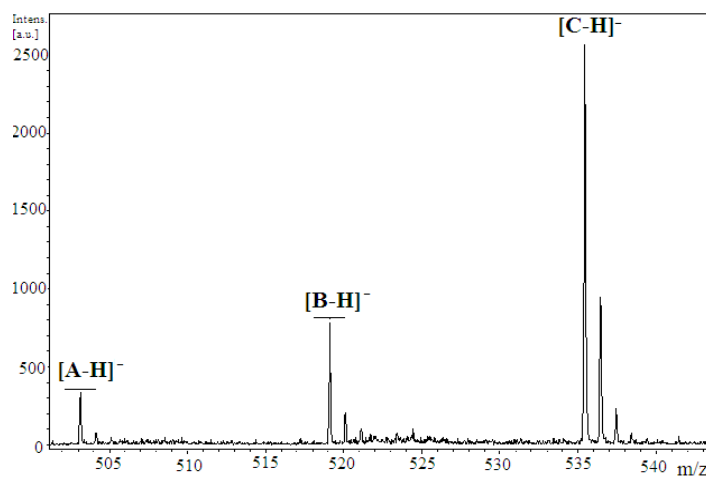


Таблица 1. Определение методом ЛДИ МС гиперидина, псевдогиперицина и гиперфорина в образцах, полученных *in vivo* и *in vitro*

Образец	Гиперицин	Псевдогиперицин	Гиперфорин
Сорт Солнечный <i>in vivo</i>	2,1%	5,8%,	92,1%
Сорт Солнечный <i>in vitro</i>	9,5%	90,5%	–
Дикорастущий <i>in vivo</i>	15,3%	23,7%	60,8%
Дикорастущий <i>in vitro</i>	6,9%	68,8%	24,2%

Таблица 2. Определение методом ЛДИ МС гиперцицина, псевдогиперцицина и гиперфорина в образцах после 2,5 месяца хранения

Образец	Гиперцицин	Псевдогиперцицин	Гиперфорин
Сорт Солнечный <i>in vivo</i>	17,8%	17,9%	64,2%
Сорт Солнечный <i>in vitro</i>	–	100%	–
Дикорастущий <i>in vivo</i>	24,3%	35,5%	46,1%
Дикорастущий <i>in vitro</i>	–	100%	–

Таким образом, гиперфорин был найден только в дикорастущих растениях, выращенных *in vivo* и *in vitro*, а также в растениях сорта Солнечный в условиях выращивания *in vivo*. Гиперцицин и псевдогиперцицин присутствуют во всех образцах независимо от условий выращивания. Хранение лиофилизованного растительного материала, полученного *in vivo* в течение 2,5 месяца в темноте при температуре 20 °С, не оказывало влияния на сохранность изучаемых соединений. Однако хранение в этих условиях растений, полученных *in vitro*, способствовало образованию только псевдогиперцицина.

Расчет относительного содержания компонентов проводили по выборке интенсивностей сигналов, определяемых *m/z* из 3 спектров для каждого из образцов, нормируя относительно максимального пика. Во всех случаях предполагалось, что сечение ионизации всех исследованных соединений одинаково. Это довольно грубое приближение достаточно для сравнительной классификации различных образцов.

Выводы

1. Среди других методов анализа вариант лазерной десорбции/ионизации представляется оптимальным по простоте, экспрессности и информативности для сравнительного анализа таких сложных объектов, как культурный и дикорастущий зверобой *in vivo* и *in vitro*.

2. На основании полученных результатов можно предположить, что для биотехнологических исследований следует отдавать предпочтение дикорастущим растениям *Hypericum perforatum* L. (зверобоя продырявленного).

Список литературы

1. Wolfle U., Schempp C., Seelinger C. Topical Application of St John s Wort // *Planta Med.* 2014. Vol. 8. Pp. 109–120.
2. Kusari S., Lamshoft M., Zuhlke S., Spitteller M. An – endophytic fungus from *Hypericum perforatum* L that produces hypericin // *J. Nat. Prod.* 2008. Vol. 71. Pp. 159–162.
3. Stojanovic G., Dordevic A., Smelcerovic A. Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)? // *Curr. Med. Chem.* 2013. Vol. 20. Pp. 2273–2295.
4. Karioti A., Bilia A. Hypericins as potential leads for new therapeutics // *Int. j. Mol. Sci.* 2010. Vol. 11. Pp. 562–594.
5. Быстров Н.С., Гупта Ш.П., Добрынин В.Н., Колосов М.Н., Чернов Б.К. Химия гиперфорина // *Биоорганическая химия.* 1978. Т. 4, №2. С. 943–947.
6. Gadzovska S., Maury S., Ounnar S., Righezza M., Kascakova S., Refregiers M., Spasenoski M., Joseph C., Hagege D. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L *in vitro* cultures // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2005. Vol. 43. Pp. 591–601.
7. Savio L.E.B., Astarita L.V., Santarem E.R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L grown in no aerated liquid medium // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2012. Vol. 108. Pp. 465–472.
8. Gandhi S.G., Mahajan V., Bedi Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants // *Planta.* 2015. Vol. 241. Pp. 303–317.
9. Kosuth J., Smelcerovic A., Borsch T., Zuehlke S., Karppinen K., Spitteller M., Hohtola A., Cellarova E. The hyp-1 gene is not a limiting factor for hypericin biosynthesis in the genus *Hypericum* // *Funct. Plant Biol.* 2011. Vol. 38. Pp. 35–43.
10. Smelcerovic A., Spitteller M., Zuehlke S. Exhaustive extraction of hypericin, flavonoids, hyperforin from *Hypericum perforatum* L. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. Pp. 2750–2754.
11. Cossuta L., Vata T., Bathri M., Hohmann J., Keve T., Simandi B. Extraction of hypericin and hyperforin from St John s Wort *Hypericum perforatum* with different solvents // *J. of Food Process Engineering.* 2012. Vol. 32. Pp. 222–235.
12. Ломовский И.О. Влияние условий механохимической обработки на экстракцию гиперцицина из травы зверобоя // *Химия растительного сырья.* 2012. №3. С. 93–99.
13. Ang C.Y., Hu L., Heinze T.M., Cui Y., Freeman J.P., Kozak K., Luo W., Liu F.F., Mattia A., Dinovr M. Instability of St. John s Wort (*Hypericum perforatum*) and degradation of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52. Pp. 6156–6164.

14. Kusari S., Sergin S., Nigutova K., Cellarova E., Spitteller M. Spatial chemo-profiling of hypericin and related phytochemicals in species using MALDI-HRMS imaging // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. Vol. 407. Pp. 4779–4791.
15. Буряк А.К., Сердюк Т.М. Физико-химические основы применения масс-спектрометрии с иницированной матрицей/поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией для исследования ингибиторов // *Коррозия: материалы, защита*. 2010. №9. С. 38–47.
16. Holsher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B, Heckel D.G., Schubert U.S., Svatos A. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass-spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. // *The Plant Journal*. 2009. Vol. 60. Pp. 907–918.
17. Leonova T., Ovchinnikova V., Souer E., de Boer A., Kharchenko P., Babakov A. Isolated *Thellungiella* shoots do not require roots to survive NaCl and Na₂SO₄ salt stress // *Plant Signaling Behavior*. 2009. Vol. 4. Pp. 1059–1062.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. Pp. 473–497.

Поступило в редакцию 18 апреля 2016 г.

После переработки 4 июня 2016 г.

Ovchinnikova V.N.¹, Goncharova I.S.², Kharchenko P.N.², Leonova T.G.^{2*}, Buryak A.K.¹ LDI MASS-SPECTROMETRY ASSESSMENT OF HYPERICIN, HYPERFORIN AND PSEUDOHYPERICIN IN CULTIVAR AND WILD *HYPERICUM PERFORATUM* L. *IN VIVO* AND *IN VITRO*

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 (Russia), e-mail: tleon2007@yandex.ru

²A.N. Frumkin Institute of Physical chemistry and Electrochemistry of the Russian academy of sciences, Leninsky prospect, 31 k.4, Moscow, 119071 (Russia)

The abilities to form hypericin, pseudohypericin and hyperforin *in vivo* *Hypericum perforatum* L. and *in vitro* microclonal propagation were investigated. Wild and cultural (cultivar Solnechny) plants were used as the research objects. The aerial parts of the plants, which had been obtained *in vivo*, as well as the leaves, stems and plant callus tissue which had been obtained *in vitro*, were freeze-dried. Before the start of measurement methanol extraction was being carried out for 1 hour. TOF mass spectrometer with laser desorption/ionization (LDI) were used for detecting certain chemical compounds. All research chemicals were found in the methanol extract of freeze-dried lyophilized wild and cultivated plants, grown *in vivo*. All of the mentioned compounds were also detected *in vitro* in wild grown *Hypericum perforatum* L., however mass spectrometry couldn't detect hyperforin in cultivar Solnechny plants. After freeze-dried lyophilized plants storing in desiccator in the dark place at 20 °C for 2,5 month all compounds were found only *in vivo* grown plants. In plants of wild and cultivated *Hypericum* grown *in vitro* only pseudohypericin was detected.

Keywords: *Hypericum perforatum* L., cultivar, wild plant, microclonal propagation, LDI-MS.

References

1. Wolffe U., Schempp C., Seelinger C. *Planta Med.*, 2014, vol. 8, pp. 109–120.
2. Kusari S., Lamshoft M., Zuhlke S., Spiteller M. *J. Nat. Prod.*, 2008, vol. 71, pp. 159–162.
3. Stojanovic G., Dordevic A., Smelcerovic A. *Curr. Med. Chem.*, 2013, vol. 20, pp. 2273–2295.
4. Karioti A., Bilia A. *Int. j. Mol. Sci.*, 2010, vol. 11, pp. 562–594.
5. Bystrov N.S., Gupta Sh.R., Dobrynin V.N., Kolosov M.N., Chernov B.K. *Bioorganicheskaya khimiya*, 1978, vol. 4, no. 2, pp. 943–947. (in Russ.).
6. Gadzovska S., Maury S., Ounnar S., Righezza M., Kascakova S., Refregiers M., Spasenoski M., Joseph C., Hagege D. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, vol. 43, pp. 591–601.
7. Savio L.E.B., Astarita L.V., Santarem E.R. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2012, vol. 108, pp. 465–472.
8. Gandhi S.G., Mahajan V., Bedi Y.S. *Planta*, 2015, vol. 241, pp. 303–317.
9. Kosuth J., Smelcerovic A., Borsch T., Zuehlke S., Karppinen K., Spiteller M., Hohtola A., Cellarova E. *Funct. Plant Biol.*, 2011, vol. 38, pp. 35–43.
10. Smelcerovic A., Spiteller M., Zuehlke S. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, vol. 54, pp. 2750–2754.
11. Cossuta L., Vata T., Bathri M., Hohmann J., Keve T., Simandi B. *J. of Food Process Engineering*, 2012, vol. 32, pp. 222–235.
12. Lomovskii I.O. *Khimiya rastitel'nogo syr'ia*, 2012, no. 3, pp. 93–99. (in Russ.).
13. Ang C.Y., Hu L., Heinze T.M., Cui Y., Freeman J.P., Kozak K., Luo W., Liu F.F., Mattia A, Dinovr M. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, pp. 6156–6164.
14. Kusari S., Sergin S., Nigutova K., Cellarova E., Spiteller M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, vol. 407, pp. 4779–4791.
15. Buriak A.K., Serdiuk T.M. *Korroziya: materialy, zashchita*, 2010, no. 9, pp. 38–47.
16. Holsher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B, Heckel D.G., Schubert U.S., Svatos A. *The Plant Journal*, 2009, vol. 60, pp. 907–918.
17. Leonova T., Ovchinnikova V., Souer E., de Boer A., Kharchenko P., Babakov A. *Plant Signaling Behavior*, 2009, vol. 4, pp. 1059–1062.
18. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.

Received April 18, 2016

Revised June 4, 2016

* Corresponding author.