

Майя Петровна Разгонова¹✉, Валентина Ивановна Куликова², Вера Петровна Ходаева³, Александр Михайлович Захаренко⁴, Кирилл Сергеевич Голохваст⁵

¹Дальневосточная опытная станция – филиал Федерального исследовательского центра «Всероссийский институт генетических исследований растений им. Н.И. Вавилова», Владивосток, Россия

²Кемеровский научно-исследовательский институт – филиал Сибирского федерального научного центра агrobiотехнологий РАН, п. Новостройка, Кемеровский р-н, Кемеровская область, Россия

^{3,5}Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирский р-н, Новосибирская область, Россия

⁴Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

¹m.razgonova@vir.nw.ru

²kulikova.potato@yandex.ru

³vera.asheulova@yandex.ru

⁴rarf@yandex.ru

⁵golokhvast@sfsca.ru

МЕТАБОЛОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОАЛКАЛОИДОВ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ВОСЬМИ СОРТАХ ЦВЕТНОГО КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* L.¹⁰

Цель – метаболомное исследование гликоалкалоидов методом тандемной масс-спектрометрии в восьми сортах цветного картофеля. В данной работе исследуются экстракты цветного картофеля, селекционные образцы которого получены из Сибирского федерального научного центра агrobiотехнологий РАН, на предмет присутствия разнообразия гликоалкалоидов. Использовано восемь сортообразцов: Тулеевский, Кузнечанка, Памяти Антошкиной, Томичка, Гибрид 15/F-2-13, Гибрид 22103-10, Гибрид 17-5/6-11, Синильга. Гликоалкалоиды представляют собой растительные метаболиты, содержащие олигосахарид, стероид С27 и гетероциклический компонент азота. Первоначальный скрининг методом ВЭЖХ-МС показал, что среди сотен соединений, обнаруженных в клубнях, состав гликоалкалоидов был особенно разнообразным. Картофельные гликоалкалоиды можно разделить на два основных класса: соланидановые или спиросолановые агликоны. Считается, что соланин и чаконин составляют более 90 % от общего количества гликоалкалоидов одомашненного картофеля, при этом чаконина часто больше, чем соланина. Методом тандемной масс-спектрометрии (высокоэффективная жидкостная экстракция и ионная ловушка BRUKER DALTONIKS) проанализированы экстракты данных сортообразцов на присутствие в них соединений из семейства гликоалкалоидов. Результаты исследования показали присутствие 22 гликоалкалоидов в предложенных сортообразцах, некоторые из выявленных гликоалкалоидов пока не описаны в мировой научной литературе.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, ВЭЖХ-МС/МС, тандемная масс-спектрометрия, картофель, гликоалкалоиды

Для цитирования: Метаболомное исследование гликоалкалоидов методом тандемной масс-спектрометрии в восьми сортах цветного картофеля *Solanum tuberosum* L. / М.П. Разгонова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 2. С. 81–87. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-81-87.

Благодарности: работа выполнена по плану научно-исследовательской работы ФБГНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» по НИОКТР (РК) «Коллекция вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, виноград) и их диких родичей ВИР – изучение и рациональное использование № 0662-2019-0004».

Maya Petrovna Razgonova^{1✉}, Valentina Ivanovna Kulikova², Vera Petrovna Khodaeva³,
Alexander Mikhailovich Zakharenko⁴, Kirill Sergeevich Golokhvast⁵

¹The Far Eastern Experimental Station – a branch of the Federal Research Center All-Russian Institute for Plant Genetic Research named after N.I. Vavilov, Vladivostok, Russia

²Kemerovo Research Institute – Branch of the Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novostroyka village, Kemerovo District, Kemerovo Region, Russia

^{3,5}Siberian Federal Research Center for Agrobiotechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk District, Novosibirsk Region, Russia

⁴National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

¹m.razgonova@vir.nw.ru

²kulikova.potato@yandex.ru

³vera.asheulova@yandex.ru

⁴rarf@yandex.ru

⁵golokhvast@sfsca.ru

METABOLIC RESEARCH OF GLYCOALKALOIDS BY TANDEM MASS SPECTROMETRY IN EIGHT VARIETIES OF COLORED POTATOES *SOLANUM TUBEROSUM* L.

The purpose of research is a metabolomic study of glycoalkaloids by tandem mass spectrometry in eight varieties of colored potatoes. In this work, extracts of colored potatoes, the breeding samples of which were obtained from the Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, are studied for the presence of a variety of glycoalkaloids. Eight varieties were used: Tuleevskij, Kuznechanka, Pamyati Antoshkinoj, Tomichka, Gibrid 15/F-2-13, Gibrid 22103-10, Hybrid 17-5/6-11, Sinilga. Glycoalkaloids are plant metabolites containing an oligosaccharide, a C27 steroid, and a heterocyclic nitrogen component. Initial screening by HPLC-MS showed that among the hundreds of compounds found in tubers, the composition of glycoalkaloids was particularly diverse. Potato glycoalkaloids can be divided into two main classes: solanidane or spirosolan aglycones. It is believed that solanine and chaconine make up more than 90 % of the total glycoalkaloids of domesticated potatoes, with chaconine often more than solanine. Using tandem mass spectrometry (high-performance liquid extraction and BRUKER DALTONIKS ion trap), extracts of these varieties were analyzed for the presence of compounds from the glycoalkaloids family. The results of the study showed the presence of 22 glycoalkaloids in the proposed varieties, some of the identified glycoalkaloids have not yet been described in the world scientific literature.

Keywords: *Solanum tuberosum*, HPLC-MS/MS, tandem mass spectrometry, potato, glycoalkaloids

For citation: Metabolic research of glycoalkaloids by tandem mass spectrometry in eight varieties of colored potatoes *Solanum tuberosum* L. / M.P. Razgonova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(2): 81–87. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-81-87.

Acknowledgments: the work has been carried out according to the research plan of the FSBRI Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources according to R&D (RK) Collection of vegetatively propagated crops (potatoes, fruits, berries, grapes) and their wild relatives VIR – study and rational use No. 0662-2019-0004".

Введение. Зародышевая плазма картофеля характеризуется обширным генетическим разнообразием, включающим около 200 диких видов, обитающих в чрезвычайно разнообразных местообитаниях по всей Америке [1]. Однако лишь небольшая часть этого генетического разнообразия была включена в выведение современных сортов картофеля, что привело к очень узкому генетическому коридору. Следовательно, дикие виды представляют собой в значительной степени неиспользованный ресурс, который, вероятно, содержит много новых генов,

полезных для улучшения свойств одомашненного картофеля. Относительно мало известно о степени разнообразия метаболитов, присутствующих в зародышевой плазме картофеля. Методы метаболомного исследования дают возможность понять изобилие и разнообразие полифенольного состава и соединений других классов в растениях. Было показано, что методы метаболомного исследования нескольких сортов картофеля с помощью ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС являются эффективным инструментом исследования [2, 3].

Предварительный анализ семи генотипов в исследовании [4] показал, что гликоалкалоиды являются большим источником разнообразия метаболитов. Гликоалкалоиды представляют собой растительные метаболиты, содержащие олигосахарид, стероид С27 и гетероциклический компонент азота. Считается, что соланин и чаконин составляют более 90 % от общего количества гликоалкалоидов одомашненного картофеля, при этом чаконина часто больше, чем соланина.

Пути биосинтеза гликоалкалоидов не полностью очерчены, даже для основных гликоалкалоидов картофеля, соланина и чаконина. Гликоалкалоиды, полученные из мевалонатного пути через холестерин, встречаются по всему клубню, но в основном синтезируются в феллодерме [5]. На удивление мало известно о генах и энзимологии, участвующих в превращении холестерина в различные гликоалкалоиды. Идентификация генов биосинтеза гликоалкалоидов позволила использовать трансгенные подходы к снижению содержания гликоалкалоидов в картофеле, поскольку гликоалкалоиды обычно считаются антипитательными соединениями [6]. Карто-

фель со сверхэкспрессией стеролметилтрансферазы *soi* показал снижение количества как холестерина, так и гликоалкалоидов [7].

Первоначальный скрининг методом ВЭЖХ-МС показал, что среди сотен соединений, обнаруженных в клубнях, состав гликоалкалоидов был особенно разнообразным. Картофельные гликоалкалоиды можно разделить на два основных класса: соланидановые или спиросолановые агликоны, в связи с этим исследование [8] было сосредоточено на соланидиновых или соланиданоподобных гликоалкалоидах.

В данном исследовании был использован метод тандемной масс-спектрометрии для определения метаболомного профиля присутствующих гликоалкалоидов в восьми сортах цветного картофеля, выращенного Сибирским федеральным научным центром агробиотехнологий (Краснообск Новосибирской области) Российской академии наук. Внешний вид сортов цветного картофеля Гибрид 15/F-2-13 и Синильга из Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий представлен на рисунке 1.



А



В

Рис.1. Внешний вид сортов цветного картофеля: А – Гибрид 15/F-2-13; В – Синильга

Цель исследования – метаболомное исследование гликоалкалоидов методом тандемной масс-спектрометрии в восьми сортах цветного картофеля *Solanum Tuberosum* L.

Объекты и методы. Объектом исследования являлись восемь сортов сибирского цветного картофеля *S. tuberosum*, полученные методом селекционного отбора из Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Россий-

ской академии наук. Это сорта: Тулеевский, Кузнечанка, Памяти Антошкиной, Томичка, Гибрид 15/F-2-13, Гибрид 22103-10, Гибрид 17-5/6-11, Синильга. Картофель был собран на полях Сибирского федерального научного центра агроботехнологий РАН в конце сентября 2020 г.

Для получения высококонцентрированных экстрактов применяли фракционную мацерацию. При этом общее количество экстрагента (спирт метиловый ХЧ) делили на 3 части и последовательно настаивали на картофеле первую часть, затем вторую и третью. Время настаивания каждой части экстрагента составило 7 сут.

Для выполнения разделения многокомпонентных смесей использовался жидкостный хроматограф высокого давления Shimadzu LC-20 Prominence HPLC (Shimadzu, Япония), оборудованный UV-детектором и обратнофазной колонкой Shodex ODP-40 4E. Программа элюции градиента следующая: 0,0 – 4 мин, 100 % CH₃CN; 4 – 60 мин, 100 % – 25 % CH₃CN; 60 – 75 мин, 25 % – 0 % CH₃CN; контрольная промывка 75–120 мин 0 % CH₃CN. Весь ВЭЖХ-анализ сделан с UV-VIS-детектором SPD-20A (Kanda-Nishikicho 1-chrome, Shimadzu, Chiyoda-ku, Токио, Япония) при длинах волн 230 и 330 нм; температура 17 °С. Объем впрыска составлял 1 мл.

Масс-спектрометрические данные получены с помощью ионной ловушки amaZon SL (производство фирмы «BRUKER DALTONIKS», Германия), оснащенной источником ионизации электрораспылением ESI в режимах отрицательных и положительных ионов. Оптимизированные параметры получены следующим образом: температура источника ионизации – 70 °С, поток газа – 4 л/мин, газ-небулайзер (распылитель) – 7,3 psi; капиллярное напряжение – 4500 V; напряжение на изгибе торцевой пластины – 1500 V; фрагментатор – 280 V; энергия столкновения – 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1,700 для MS и MS/MS.

Результаты и их обсуждение. Для экспериментальных исследований были отобраны восемь наиболее эффективных сортов, полученных методом селекционного отбора из Сибирского федерального научного центра агроботехнологий Российской академии наук. Это сорта: Тулеевский, Кузнечанка, Памяти Антошкиной, Томичка, Гибрид 15/F-2-13, Гибрид 22103-10, Гибрид 17-5/6-11, Синильга. Картофель был собран на полях в конце сентября 2020 г.

Данные масс-спектрометрии высокой точности регистрировали на ионной ловушке amaZon SL BRUKER DALTONIKS, оснащенной источником ESI в режиме отрицательных и положительных ионов. Реализован четырехступенчатый режим разделения ионов (режим MS/MS). Все химические профили образцов были получены методом ВЭЖХ – ESI – MS/MS. Сочетание обоих режимов ионизации (положительного и отрицательного) в режиме полного сканирования MS дает дополнительную достоверность определения молекулярной массы (рис. 2.). Данное сочетание режимов ионизации обеспечивает самую высокую чувствительность и приводит к ограниченной фрагментации, что делает этот метод наиболее подходящим для определения молекулярной массы разделяемых гликоалкалоидов, особенно в случаях, когда концентрация низкая. Идентификация производилась путем сравнения значений m/z , RT и моделей фрагментации со спектральными данными MS2, взятыми из научной литературы, или путем поиска в базах данных (MS2T, MassBank, HMDB).

Полученные масс-спектрометрические данные позволяют составить подробную таблицу присутствия и относительной скорости ионизации идентифицированных соединений у разных сортов сибирского картофеля *S. tuberosum* (табл.). Примененный в жидкостной хроматографии градиент замещения ацетонитрила водой позволил расщепить все стероидные алкалоиды-гликозиды за достаточно короткое время.

Присутствие и относительная скорость ионизации гликоалкалоидов в экстрактах восьми сортов картофеля *S. tuberosum*

Класс соединения	Химическая формула	Тулеевский	Памяти Антошкиной	Кузнечанка	Синильга	Гибрид 15/F-2-13	Гибрид 22103-10	Гибрид 17-5/6-11	Томичка
Solanidine	C ₂₇ H ₄₃ NO	17096740	795053	115080056	7042635	5311000 823000	6035235		
Tomatidinol	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂								
Неизвестный гликоалкалоид	C ₃₂ H ₃₃ NO ₈	4743783		156799776			367534112		
Beta-chaconine	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₀	21305856	609200	20585252	2710060	21622096	8149021		183508960
Неизвестный гликоалкалоид	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₁	6155471							
Dehydrochaconine	C ₄₅ H ₇₁ NO ₁₄	6702001	89178		4086531				4452084
Alpha-chaconine	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄	421975456	39029	65948552	553120512	984176256	334465696	483301952	2707656448
Solanidadienol chacotriose	C ₄₅ H ₇₁ NO ₁₅		386528						
Solanidadiene solatriose	C ₄₅ H ₇₁ NO ₁₅				3091057		1518641		
Solanidone chacotriose	C ₄₅ H ₇₁ NO ₁₅				3091057				
Alpha-solanine	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	164941056		172020928	258771296	472516576	144006848	112939576	409770592
Leptinine I	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅			332765	258771296			112939576	
Solanidenol chacotriose	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	164941056	110534	172020928	258771296		144006848	112939576	
Solanidadiene solatriose	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅					472516576	144006848	112939576	
Solanidadienol solatriose	C ₄₅ H ₇₁ NO ₁₆				237438				
Leptinine II	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	3832333			5262421	540000	593110		
Solanidenol solatriose	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆		520382						
Неизвестный гликоалкалоид	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₆		117000	112000			118629	109000	
Неизвестный гликоалкалоид	C ₄₅ H ₇₇ NO ₁₆		40241				70493		1609522
Неизвестный гликоалкалоид	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₆			87000					
Неизвестный гликоалкалоид	C ₄₅ H ₇₆ NO ₁₇		260306		193927		46531		72000
Неизвестный гликоалкалоид	C ₄₉ H ₇₉ NO ₁₈			91000			94401		

Разрешение отдельных пиков стероидных алкалоидных гликозидов в применяемом градиенте жидкостной хроматографии было удовлетворительным, и идентификация соединений на основе зарегистрированных масс-спектров была од-

нозначной. В экстрактах в качестве основных гликоалкалоидных компонентов идентифицированы α -чаконин и α -соланин, их пики легко распознавались в суммарном ионном токе (рис. 2, 3).

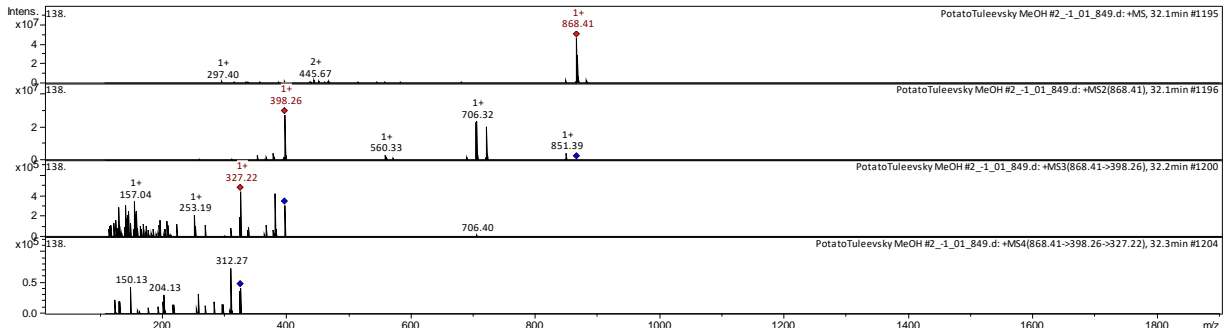


Рис. 2. Масс-спектр α -соланина из экстракта *S. Tuberosum* (сорт Тулеевский), m/z 868.41

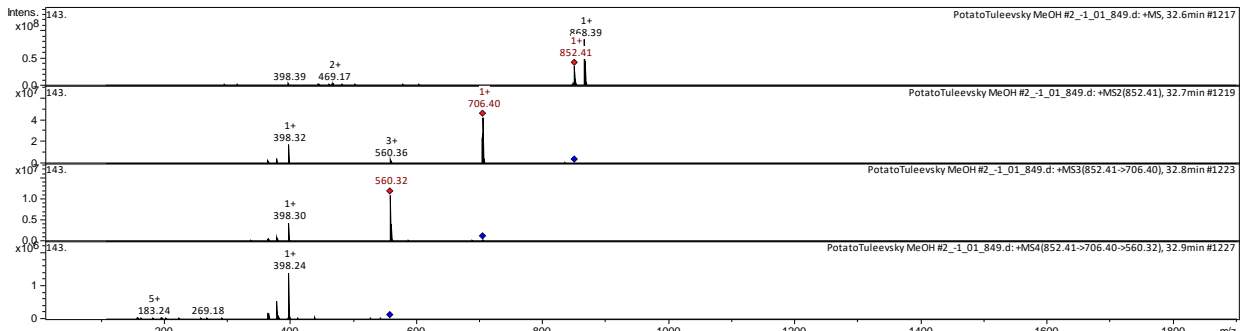


Рис. 3. Масс-спектр α -чаконина из экстракта *S. Tuberosum* (сорт Тулеевский), m/z 852.41

Заключение. Научные исследования, представленные в данной работе, показали присутствие большой разновариантности гликоалкалоидов в сортах сибирского цветного картофеля *S. tuberosum* L. Это сорта: Тулеевский, Кузнечанка, Памяти Антошкиной, Томичка, Гибрид 15/F-2-13, Гибрид 22103-10, Гибрид 17-5/6-11, Синильга. Все селекционные образцы получены в Сибирском федеральном научном центре агробиотехнологий Российской академии наук. Для идентификации целевых аналитов из экстрактов картофеля была использована tandemная масс-спектрометрия (высокоэффективная жидкостная экстракция в соединении с ионной ловушкой BRUKER DALTONIKS). Данный метод позволил идентифицировать 22 соединения, относящихся к группе гликоалкалоидов.

Список источников

1. Spooner D.M., Hijmans R.J. Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000 // *Am. J. Potato Res.* 2001. Т. 78. P. 237–268.
2. Roessner U., Willmitzer L., Fernie A.R. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies // *Plant Physiol.* 2001. Т. 127. P. 749–764.
3. Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry / M. Stobiecki [et al.] // *Phytochem.* 2003. Т. 62. P. 959–969.
4. Griffiths D.W., Bain H., Dale M.F.B. The effect of low-temperature storage on the glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers // *J. Sci. Food Agric.* 1997. Т. 74. P. 301–307.
5. Krits P., Fogelman E., Ginzberg I. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes // *Planta.* 2007. Т. 227. P. 143–150.
6. Shakya R., Navarre D.A. LC-MS Analysis of Solanidane Glycoalkaloid Diversity among Tubers of Four Wild Potato Species and Three Cultivars (*Solanum tuberosum*) // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Т. 56. P. 6949–6958.

7. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA / L. Arnqvist [et al.] // *Plant Physiol.* 2003. T. 131. P. 1792–1799.
8. Friedman M., McDonald G.M. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit. Rev // Plant Sci.* 1997. T. 16. P. 55–132.
4. Griffiths D.W., Bain H., Dale M.F.B. The effect of low-temperature storage on the glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers // *J. Sci. Food Agric.* 1997. T. 74. P. 301–307.
5. Krits P., Fogelman E., Ginzberg I. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes // *Planta.* 2007. T. 227. P. 143–150.
6. Shakya R., Navarre D.A. LC-MS Analysis of Solanidane Glycoalkaloid Diversity among Tubers of Four Wild Potato Species and Three Cultivars (*Solanum tuberosum*) // *J. Agric. Food Chem.* 2008. T. 56. P. 6949–6958.
7. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA / L. Arnqvist [et al.] // *Plant Physiol.* 2003. T. 131. P. 1792–1799.
8. Friedman M., McDonald G.M. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit. Rev // Plant Sci.* 1997. T. 16. P. 55–132.

References

1. Spooner D.M., Hijmans R.J. Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000 // *Am. J. Potato Res.* 2001. T. 78. P. 237–268.
2. Roessner U., Willmitzer L., Fernie A.R. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies // *Plant Physiol.* 2001. T. 127. P. 749–764.
3. Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry / M. Stobiecki [et al.] // *Phytochem.* 2003. T. 62. P. 959–969.

Статья принята к публикации 29.12.2022 / The article accepted for publication 29.12.2022.

Информация об авторах:

Мая Петровна Разгонова¹, директор, кандидат технических наук

Валентина Ивановна Куликова², старший научный сотрудник лаборатории картофелеводства, биотехнологии и агротехники, кандидат биологических наук

Вера Петровна Ходаева³, старший научный сотрудник лаборатории картофелеводства, биотехнологии и агротехники, кандидат биологических наук

Александр Михайлович Захаренко⁴, заведующий лабораторией исследования и применения сверхкритических флюидных технологий в агропищевых биотехнологиях, кандидат химических наук

Кирилл Сергеевич Голохваст⁵, директор, доктор биологических наук, профессор

Information about the authors:

Maya Petrovna Razgonova¹, Director, Candidate of Technical Sciences

Valentina Ivanovna Kulikova², Senior Researcher at the Laboratory of Potato Breeding, Biotechnology and Agrotechnics, Candidate of Biological Sciences

Vera Petrovna Khodaeva³, Senior Researcher at the Laboratory of Potato Breeding, Biotechnology and Agrotechnics, Candidate of Biological Sciences

Alexander Mikhailovich Zakharenko⁴, Head of the Laboratory for Research and Application of Supercritical Fluid Technologies in Agro-Food Biotechnologies, Candidate of Chemical Sciences

Kirill Sergeevich Golokhvast⁵, Director, Doctor of Biological Sciences, Professor