

ЭЛЛАГОТАННИНЫ *RUBUS MATSUMURANUS*: КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ И ПРОДУКЦИЯ УРОЛИТИНОВ

Н.И. Кащенко

к.фарм.н., науч. сотрудник, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)
E-mail: ninkk@mail.ru

М.Ю. Круглова

к.фарм.н., доцент, Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ (г. Новосибирск)

Т.Г. Горностай

вед. инженер, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск)

И.В. Свиридов

к.м.н., мл. науч. сотрудник, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)

Исследован состав фенолов листьев *Rubus matsumuranus* H.L.v. & Vaniot (*Rosaceae*). Впервые установлено присутствие эллаготаннинов, включая сангуины Н-6 и Н-11, ламбертианин С, теллимаграндин II. Показано, что уролитины являются продуктами микробной трансформации эллаготаннинов *R. matsumuranus*.

Ключевые слова: *Rubus matsumuranus*, эллаготаннины, флавоноиды, уролитины.

Для цитирования: Кащенко Н.И., Круглова М.Ю., Горностай Т.Г., Свиридов И.В. Эллаготаннины *Rubus matsumuranus*: компонентный состав и продукция уролитин. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(10):72–76. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-14>

Малина, рубус (*Rubus* L.) – род растений космополитного семейства розоцветные (*Rosaceae*), распространенного практически во всех областях земного шара. Представители данного семейства широко применяются в официальной и народной медицине многих стран мира. Наукометрические исследования свидетельствуют о постоянно растущем интересе к изучению рода *Rubus* со стороны ученых различных отраслей науки – биологов, фармакологов, фитохимиков и др. [1, 2] Особого внимания заслуживает растительный вид *Rubus matsumuranus* H.L.v. & Vaniot (малина Мацумуры), широко используемый в различных медицинских системах и обладающий удовлетворительными сырьевыми запасами. Однако, согласно данным о химическом составе данного вида, известно лишь об идентификации трех соединений – 2,6-диметокси-4-гидроксифенол-1-*O*-β-*D*-глюкопиранозида, процианидина В₄ и изовитексин-7-*O*-глюкозида [3]. *R. matsumuranus* относится к подсемейству *Rosoidae*, для которого характерно присутствие эллаготаннинов – высокомолекулярных полифенольных соединений, обладающих широким спектром биологической активности [4, 5].

Ц е л ь р а б о т ы – изучение состава фенольных соединений, в частности эллаготаннинов,

листьев *R. matsumuranus* и исследование состава их микробных метаболитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительное сырье (листья *R. matsumuranus*) было собрано в различных районах Республики Бурятия в фазу цветения: окрестности г. Улан-Удэ (10.VII.2017, 51°49'31.3531" N, 107°36'5.3031" E); п. Заиграево, Заиграевский район (12.VII.2017, 51°50'29.9141" N, 108°15'34.6077" E); п. Татаурово, Прибайкальский район (16.VII.2017, 52°8'16.5009" N, 107°25'56.0082" E).

Общие экспериментальные условия. Для колоночной хроматографии (КХ) применяли обращенно-фазовый силикагель (ОФ-SiO₂) и SiO₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Summit (Dionex, Sunnyvale, CA, США); колонка LiChrospher PR-18 (250×10 мм, Ø 10 мкм; Supelco, Bellefonte, PA, США); v 1 мл/мин; температура колонки 35 °С. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург, Россия); МС-анализ – на 3Q-масс-спектрометре LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, США). Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (Varian, Palo Alto, CA, США).

Экстракция и выделение. Измельченное растительное сырье (1,2 кг) последовательно экстрагировали этанолом (96, 70, 50%) (1:10) в УЗ-ванне (100 Вт, частота 35 кГц) при 60 °С. Спиртовое извлечение отфильтровывали, концентрировали до водного остатка, который подвергали жидкофазной экстракции гексаном (фракция 1; 84 г), этилацетатом (фракция 2; 93 г) и н-бутанолом (фракция 3; 67 г). Фракции 2 и 3 хроматографировали на ОФ-SiO₂ (КХ, 5×30 см, элюент H₂O – ацетонитрил 100 : 0 → 0 : 100) и SiO₂ (КХ, 5 × 50, элюент гексан – этилацетат 100 : 0 → 50 : 50), Сефадексе LH-20 (КХ, 3 × 70 см, элюент этанол – вода 96 : 4 → 0 : 100). Фракции близкого состава объединяли, рехроматографировали на ОФ-SiO₂ и далее на препаративной ВЭЖХ [подвижная фаза H₂O (А), ацетонитрил (В); градиентный режим (% В): 0–6 мин 5–15%, 6–10 мин 15%, 10–16 мин 15–25%, 16–40 мин 25–90%; v 1 мл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор 273 нм]. В результате было выделено восемь соединений, идентифицированных на основании данных УФ-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии: галловая кислота (14 мг), сангуинин Н-11 (18 мг), ламбертианин С (104 мг), сангуинин Н-6 (1,32 г), теллимаграндин II (34 мг), рутин (1,4 г), эллаговая кислота (11 мг), изокверцитрин (1,69 г).

Инкубация выделенных эллаготаннинов с микробиотой кишечника человека. Образцы содержимого кишечника (микробиота) были отобраны у здоровых доноров в возрасте от 25 до 30 лет без истории заболеваний желудочно-кишечного тракта. Доноры не использовали антибиотики за шесть месяцев до сбора проб. Потребление продуктов, содержащих эллаготаннины, строго запрещалось за одну неделю до сбора проб. Образцы обрабатывали в течение 30 мин после дефекации. Культуральная среда для выращивания микробиоты на основе сердечно-мозгового бульона (СМБ) была подготовлена в соответствии с инструкциями производителя. Для получения анаэробных условий СМБ кипятили и охлаждали непосредственно перед экспериментом. Фекальную суспензию (ФС) получали суспендированием 1 г фекалий человека в 10 мл СМБ (37 °С). Далее 10 мг эллаготаннинов (ламбертианин С, сангуинин Н-6) растворяли в 1 мл дистиллированной воды и стерилизовали пропусканием через шприцевые фильтры диаметром 0,2 мкм; 1 мл ФС и 0,5 мл раствора эллаготаннинов добавляли к 8,5 мл СМБ (37 °С). В контрольный образец добавляли 0,5 мл дистиллированной воды.

Серии культур инкубировали в герметичном контейнере в анаэробных условиях при 37 °С в течение 72 ч. В качестве контроля была проведена инкубация эллаготаннинов без добавления ФС и ФС без эллаготаннинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенольные соединения листьев *R. matsumuranus*. В результате хроматографического разделения из листьев *R. matsumuranus* было выделено восемь фенольных соединений: галловая кислота, эллаговая кислота, два флавоноида (рутин, изокверцитрин) и четыре эллаготаннина (сангуинины Н-6 и Н-11, ламбертианин С, теллимаграндин II), строение которых было установлено на основании данных УФ-, ИК-, МС-, ЯМР-спектроскопии (рис. 1). Структурные формулы выделенных соединений приведены на рис. 2.

По классификации Okuda et al., типичные эллаготаннины семейства *Rosaceae* содержат в структуре остатки галловой, дегидрогалловой, валоневой и сангвисорбовой кислот [6]. Для исследуемого объекта было впервые выявлено присутствие сангвисорбоильных эллаготаннинов (сангуинины Н-6, Н-11, ламбертианин С) и эллаготаннинов подгруппы гексагидроксибензоил-галлоилглюкоз (теллимаграндин II), характерных для подсемейства *Rosoideae* [7, 8].

Согласно последним данным научной литературы, эллаготаннины обладают низкой биодоступностью и за проявление биологических эффектов в живом организме ответственны их метаболиты [9, 10].

Было изучено влияние кишечной микробиоты человека на трансформацию выделенных эллаготаннинов из листьев *R. matsumuranus*. Анализ ВЭЖХ пробы, инкубированной с культуральными микроорганизмами кишечника человека, выявил образование соединений уролитинов (производных дибензо[b,d]пиран-6-она) из эллаготанниновой фракции. Пики уролитинов идентифицировали в зависимости от времени их удерживания, данных УФ-спектроскопии и МС-спектрометрии в сравнении с исходными соединениями и литературными данными. Выявлено пять метаболитов, включая эллаговую кислоту, уролитин D (3,4,8,9-тетрагидрокси-6Н-дибензо[b,d]пиран-6-он), уролитин С (3,8,9-тригидрокси-6Н-дибензо[b,d]пиран-6-он), уролитин А (3,8-дигидрокси-6Н-дибензо[b,d]пиран-6-он) и уролитин В (8-гидрокси-6Н-дибензо[b,d]пиран-6-он).

ВЫВОДЫ

1. Изучен состав фенольных соединений листьев *R. matsumuranus*. Впервые были выделены галловая кислота, эллаговая кислота, флавоноиды рутин и изокверцитрин и эллаготаннины сангуины Н-6 и Н-11, ламбертианин С и теллимаграндин II.

2. Установлено, что под влиянием кишечной микрофлоры происходила трансформация всех выделенных эллаготаннинов в урוליтины, причем процесс микробного распада эллаготаннинов начинался с накопления в кишечной среде эллаговой кислоты с последующей деградацией до урוליтинов D, С, А и В.

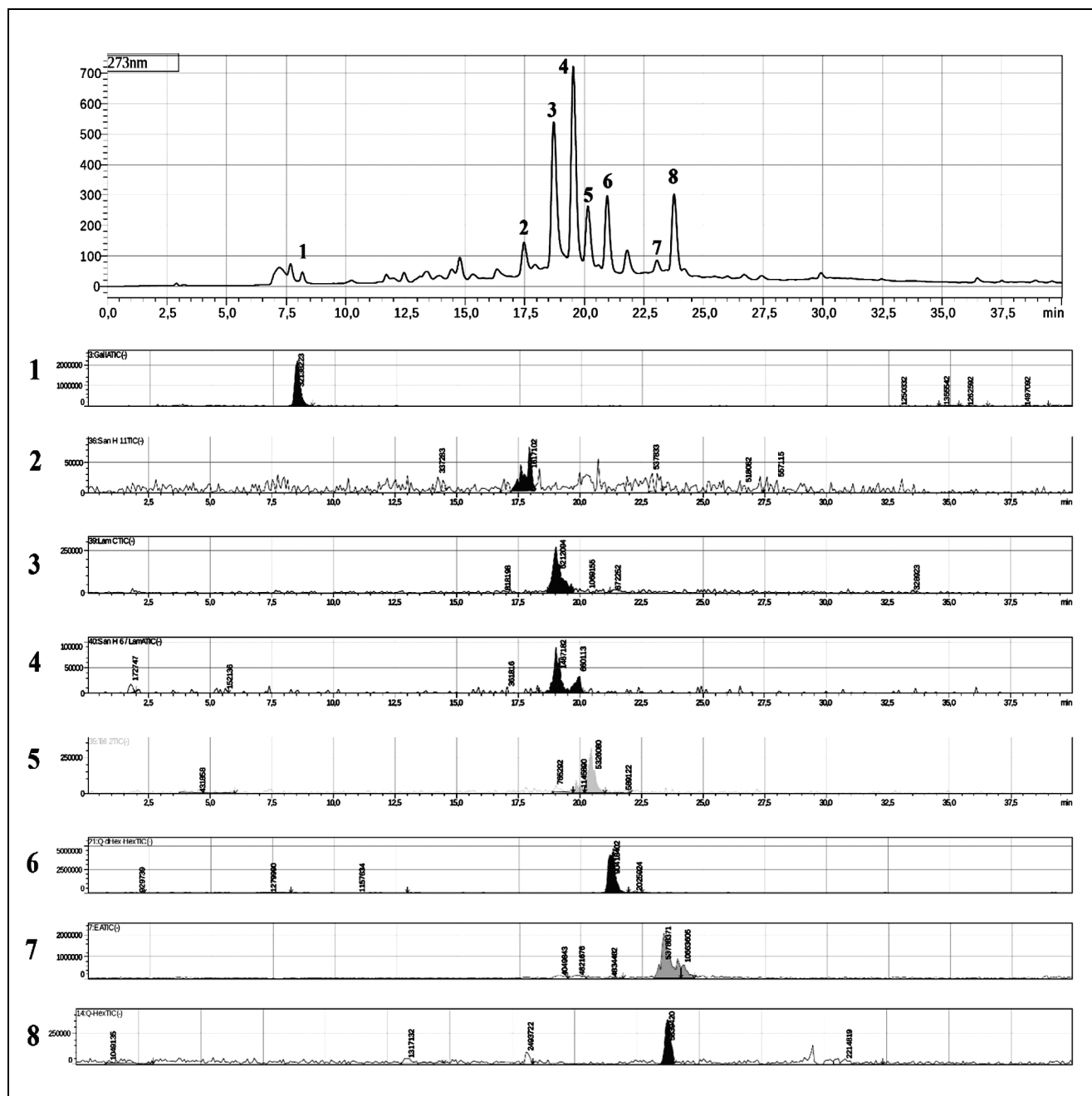


Рис. 1. Хроматограмма спиртового извлечения из листьев *R. matsumuranus* при длине волны 273 нм. Числами обозначены положения соединений: **1** – галловая кислота; **2** – сангуинин Н-11; **3** – ламбертианин С; **4** – сангуинин Н-6; **5** – теллимаграндин II; **6** – рутин; **7** – эллаговая кислота; **8** – изокверцитрин

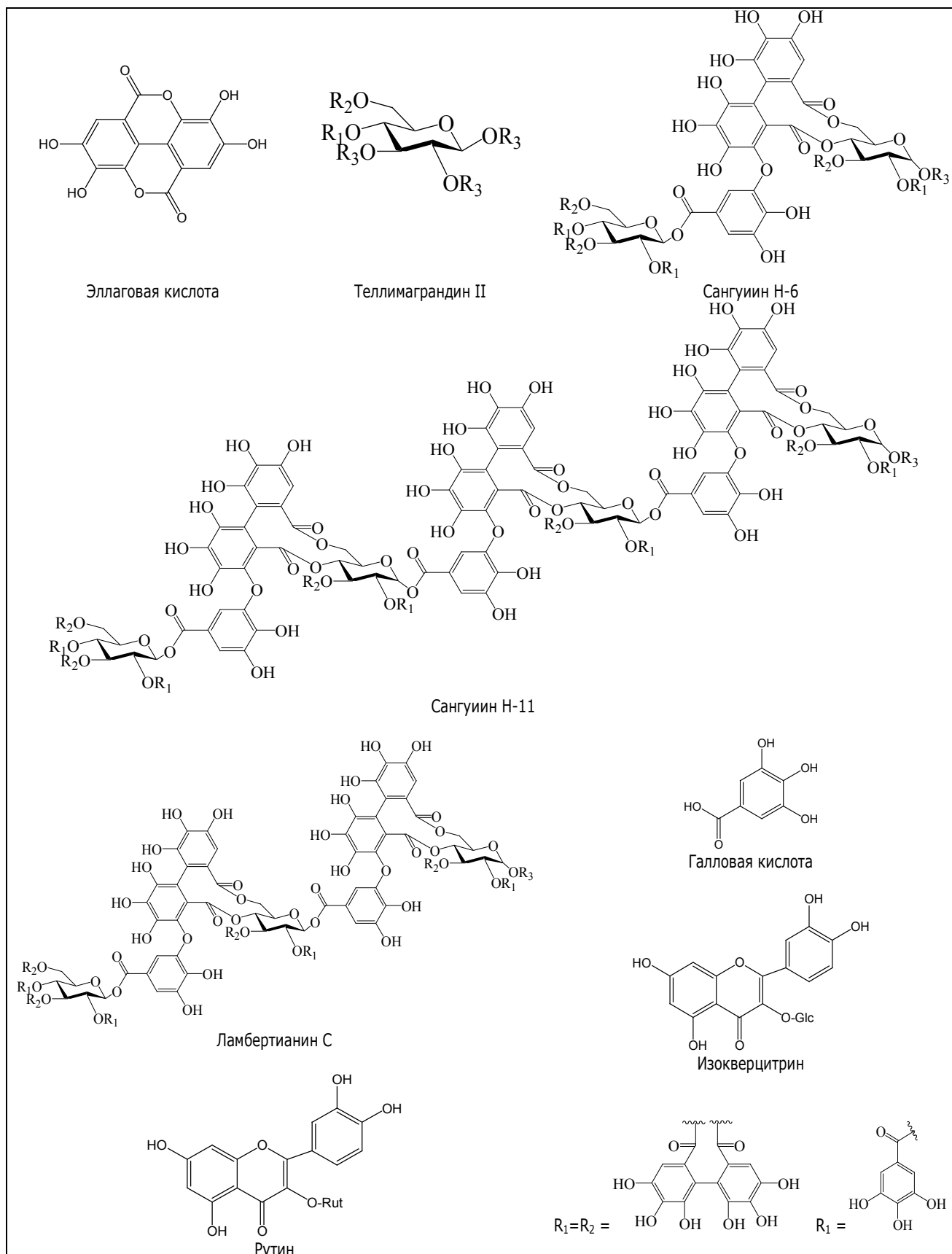


Рис. 2. Структурные формулы соединений, выделенных из листьев *R. matsumuranus*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-00414 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Moreno-Medina B.L., Casierra-Posada F., Cutler J. Phytochemical composition and potential use of *Rubus* species // *Gesunde Pflanzen*. 2018. № 70. P. 65–74.
2. Burton-Freeman B.M., Sandhu A.K., Edirisinghe I. Red raspberries and their bioactive polyphenols: Cardiometabolic and neuronal health links // *Adv. Nutr.* 2016. № 7. P. 44–65.
3. Caidan R., Cairang L., Pengcui J., et al. Comparison of compounds of three *Rubus* species and their antioxidant activity // *Drug. Discov. Ther.* 2015. № 9. P. 391–396.
4. Ekambaram S.P., Perumal S.S., Balakrishnan A. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent // *Phytother. Res.* 2016. № 30. P. 1035–1045.
5. Ismail T., Calcabrini C., Diaz A.R., et al. Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy // *Toxins*. 2016. № 8. P. 151.
6. Okuda T., Yoshida T., Hatano T. Correlation of oxidative transformation of hydrolysable tannins and plant evolution // *Phytochemistry*. 2000. № 55. P. 513–529.
7. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., et al. Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae // *Phytochemistry*. 1992. № 31. P. 3091–3096.
8. Piwowarski J.P., Granica S., Zwierzynska M., et al. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant material // *J. Ethnopharmacol.* 2014. № 155. P. 801–809.
9. Stevens J.F., Maier C.S. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols // *Phytochem. Rev.* 2016. № 15. P. 425–444.
10. Tomás-Barberán F.A., González-Sarriás A., García-Villalba R., et al. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status // *Mol. Nutr. Food Res.* 2017. № 61. P. 1500901.

Поступила 13 августа 2018 г.

THE ELLAGITANNINS OF *RUBUS MATSUMURANUS*: THE COMPONENTIAL COMPOSITION AND PRODUCTION OF UROLITHINS

© Authors, 2018

N.I. Kashchenko

Ph.D. (Pharm.), Research Scientist, Institute of General and Experimental Biology (Ulan-Ude)

E-mail: ninkk@mail.ru

M.Yu. Kruglova

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Novosibirsk State Medical University

T.G. Gornostay

Leading Engineer, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (Irkutsk)

I.V. Sviridov

Ph.D. (Med.), Junior Research Scientist, Institute of General and Experimental Biology (Ulan-Ude)

Raspberry (*Rubus* L.) is a genus of plants of the cosmopolitan family Rosaceae, common in almost all areas of the globe. Representatives of this family are widely used in officinal and folk medicine in many countries of the world, particularly *Rubus matsumuranus* H.L.v. & Vaniot. However, according to the literature data on the chemical composition of this species, only three identified compounds is known. The composition of phenolic compounds of *R. matsumuranus* leaves was investigated.

As a result of chromatographic separation eight phenolic compounds were isolated from the leaves of *R. matsumuranus*: gallic acid, ellagic acid, 2 flavonoids (rutin, isoquercitrin) and 4 ellagitannins (sanguins H-6 and H-11, lambertianin C, tellimagrandin II). It is known that ellagitannins have low bioavailability and their metabolites are responsible for the manifestation of biological effects in living organisms.

The effect of the human intestinal microbiota on the transformation of isolated ellagitannins from *R. matsumuranus* leaves was studied. HPLC analysis of the sample incubated with human intestinal microbiota revealed the formation of urolithin compounds (dibenzo[b,d]pyran-6-one derivatives) from the ellagitannin fraction. Five metabolites were identified including ellagic acid and urolithins D, C, A and B.

Key words: *Rubus matsumuranus*, ellagitannins, flavonoids, urolithins.

For citation: Kashchenko N.I., Kruglova M.Yu., Gornostay T.G., Sviridov I.V. The ellagitannins of *Rubus matsumuranus*: the componential composition and production of urolithins. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2018;21(10):72–76. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-14>