

Метаболиты, метаболомные профили

УДК 615.322:582.621:581.192

doi: 10.15389/agrobiology.2024.1.106rus

**СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОБЕГАХ
Casuarina equisetifolia L.**Т.А. КРОЛЬ¹✉, Д.Н. БАЛЕЕВ¹, В.И. ОСИПОВ^{1, 2}

Вид *Casuarina equisetifolia* L. широко используется в лесоводстве во многих странах с тропическим климатом. Известно, что экстракты из побегов *C. equisetifolia* характеризуются высоким содержанием фенольных соединений, которые играют важную роль в процессах роста и развития растений, а также в адаптации к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды. Кроме того, они обладают противовирусной, антибактериальной, противовоспалительной, противоопухолевой, нейропротекторной и другими видами активности. В настоящей работе в побегах *C. equisetifolia* впервые подробно исследован состав фенольных соединений, которые были представлены в основном мономерными эллаготаннинами. Нашей целью было изучение состава и содержания фенольных соединений в побегах *Casuarina equisetifolia* методом ультра-эффективной жидкостной хроматографии в комбинации с фотодиодным и масс-спектрометрическим детекторами (УЭЖХ-ДД-МС). Объектом исследования были зеленые однолетние фотосинтезирующие побеги дерева *C. equisetifolia*, которое произрастает в оранжееве Ботанического сада Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва) в условиях защищенного грунта. Сбор образцов проводили в I декаде июля в 2019 году. Побеги замораживали, лиофильно высушивали и измельчали. Образец массой 15 мг экстрагировали 1 мл 80 % ацетона в течение 60 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Экстракт центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин и упаривали досуха при 45 °С. Экстракцию образца повторяли еще 2 раза. Полученный сухой экстракт растворяли в 1 мл деионизированной воды в течение 60 мин, центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин, разбавляли в 5 раз деионизированной водой и фильтровали. Для анализа фенольных соединений использовали ультра-эффективную жидкостную хроматографическую систему (УЭЖХ, Acquity UPLC® 2.9.0, «Waters Corporation», США), которая включала фотодиодный детектор (190-500 нм) и тройной квадрупольный масс-спектрометр (Xevo TQ, «Waters Corporation», США). Разделение проводили на колонке Acquity UPLC® BEH Phenyl (2,1×100 мм, 1,7 мкм, «Waters Corporation», Ирландия). Полученные данные анализировали с использованием программы DataAnalysis 4.0. При идентификации фенольных соединений использовали данные масс-спектрометрии, определяя m/z значение иона $[M-H]^-$ и его фрагментов. Содержание различных классов фенольных соединений — галлоил-глюкоз, эллаготаннинов, конденсированных танинов, флавоноидов (производных кверцетина и кемпферола) определяли методом мониторинга множественных реакций. В результате проведенных исследований в экстракте обнаружили 16 фенольных соединений, среди которых 14 относились к классу гидролизуемых танинов, 2 — к классу флаван-3-олов. Установлено, что побеги *C. equisetifolia* накапливают мономерные эллаготаннины с молекулярной массой от 784 до 1068 Да, имеющие в молекуле в качестве полиола циклическую или линейную форму глюкозы. Среди эллаготаннинов *C. equisetifolia* впервые идентифицированы казуаринин, два изомера педункулагина, страхиурин, чебулаговая кислота, казуаринин и казуариктин. Два соединения с молекулярной массой 1068 Да были предварительно идентифицированы как изомеры птерокаринина А. В побегах также были идентифицированы эллаговая кислота и ее производные: арабинозид эллаговой кислоты и рамнозид эллаговой кислоты. Общее содержание фенольных соединений составило 55 мг/г сухой массы. При этом основными фенольными соединениями были эллаготаннины, содержание которых достигало 42 мг/г, или 76 % от общего количества всех фенольных соединений. На долю галлоил-глюкоз и конденсированных танинов приходилось по 10 % от общего количества всех фенольных соединений. Полученные данные свидетельствуют о возможном использовании побегов *C. equisetifolia* в качестве исходного сырья для получения индивидуальных эллаготаннинов и изучения их противовирусной, противовоспалительной и противоопухолевой активности.

Ключевые слова: *Casuarina equisetifolia* L., ультра-эффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, фенольные соединения, гидролизуемые танины, эллаготаннины.

Casuarina equisetifolia L. — это быстрорастущее вечнозеленое древесное растение семейства *Casuarinaceae* (1) с сильно редуцированными чешуевидными листьями в мутовках на длинных тонких побегах, напоминающими хвою растений *Pinaceae* (2). В отличие от других видов рода, *C. equisetifolia* имеет наибольший естественный ареал распространения (3). Во многих странах с тропическим климатом растение используется для восстановления деградированных экосистем, предотвращения эрозии и закрепления

песков, при посадке прибрежных ветрозащитных полос, в лесоводстве в засушливых районах (4, 5).

Ранее была показана способность *C. equisetifolia* накапливать большие количества фенольных соединений. Например, в экстракте коры их общее содержание варьировало от 43 до 76 мг/г (6, 7), а в побегах достигало 100 мг/г (9). Среди фенольных соединений *C. equisetifolia* обнаружены флавоноиды, конденсированные и гидролизуемые танины (9). Основными флавоноидами были рутин, гесперетин, а также агликоны кверцетин, наренгинин и кемпферол (10).

Конденсированные танины представлены полимерами процианидина, продельфинидина и пропеларгонидина со степенью полимеризации до 30 (11). Кроме того, идентифицированы мономерные предшественники конденсированных танинов — эпикатехин и катехин (10). Состав гидролизуемых танинов у *C. equisetifolia* детально не исследован, но изучение близкого вида *C. stricta* показало, что эллаготанины служат основными фенольными соединениями (12). Выделены и идентифицированы педункулагин, казуаринин, стахиурин, теллимаграндин I, стриктинин, казуариин, казуариктин, 2,3-гексагидроксифеноил-глюкоза и 4,6-гексагидроксифеноил-глюкоза (12).

Фенольные соединения в растениях выполняют разнообразные физиологические и экологические функции. Они играют важную роль в процессах роста и развития, а также в адаптации к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды, таким как УФ-радиация, низкие температуры, фитопатогены, насекомые-фитофаги (13, 14). В настоящее время механизм устойчивости *C. equisetifolia* к засолению и засухе активно изучается на уровне транскриптома и метаболома (15, 16). Показано, что засухоустойчивость *C. equisetifolia* связана с изменениями в биосинтезе фенилпропаноидов и увеличением содержания конденсированных танинов (15, 17). Кроме того, многие фенольные соединения обладают фармакологической активностью — антиоксидантной, противомикробной, противовоспалительной, противоопухолевой, другими полезными свойствами (18-21). Следовательно, *C. equisetifolia* представляет значительный интерес как объект для эффективного выделения индивидуальных фенольных соединений и изучения их фармакологической активности.

В настоящей работе в побегах *C. equisetifolia* впервые подробно исследован состав фенольных соединений, которые были представлены в основном мономерными эллаготанинами.

Нашей целью было изучение состава и содержания фенольных соединений в побегах *Casuarina equisetifolia* методом ультра-эффективной жидкостной хроматографии в комбинации с фотодиодным и масс-спектрометрическим детекторами (УЭЖХ-ДД-МС).

Методика. Объектом исследования были зеленые однолетние фотосинтезирующие побеги дерева *C. equisetifolia*, которое произрастает в оранжерее Ботанического сада Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва) в условиях защищенного грунта. Побеги членистые, толщиной около 1 мм, с редуцированными сросшимися чешуевидными листьями, собранными по 6-8 в мутовки. Сбор образцов проводили в I декаде июля в 2019 году.

Побеги замораживали, лиофильно высушивали (FreeZone 2.5 L, «Labconco Corporation», США) и измельчали (MM 400, «Retsch GmbH», Германия). Образец сухого измельченного побега массой 15 мг (CPA 225D, «Sartorius AG», Германия) экстрагировали 1 мл 80 % ацетона (для хроматографии, «Компонент-Реактив», Россия) в течение 60 мин при комнатной

температуре и постоянном перемешивании (VORTEX Genie 2, «Scientific Industries, Inc.», США). Экстракт центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин (5430R, «Eppendorf AG», Германия) и упаривали досуха при 45 °С (концентратор CentriVar, «Labconco Corporation», США). Экстракцию образца повторяли еще 2 раза. Полученный сухой экстракт растворяли в 1 мл деионизированной воды (Direct-Q3, «Merck KGaA», Германия) в течение 60 мин, центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин, разбавляли в 5 раз деионизированной водой и фильтровали (PTFE filter Clean 2, 0,45 мкм, «Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

Для анализа фенольных соединений использовали ультра-эффективную жидкостную хроматографическую систему (УЭЖХ, Acquity UPLC® 2.9.0, «Waters Corporation», США), которая включала фотодиодный детектор (190–500 нм) и тройной квадрупольный масс-спектрометр (Xevo TQ, «Waters Corporation», США). Разделение проводили на колонке Acquity UPLC® BEH Phenyl (2,1×100 мм, 1,7 мкм, «Waters Corporation», Ирландия) в градиенте 0,1 % муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (Б) по программе: 0–0,5 мин, 0,1 % Б в А; 0,5–5,0 мин, 0,1–30,0 % Б в А (линейный градиент); 5,0–6,0 мин, 30–35 % Б в А (линейный градиент). Скорость потока элюента — 0,5 мл/мин, объем введенного образца — 5 мкл (22). Для регистрации фенольных соединений масс-спектрометр функционировал в режиме отрицательной ионизации. Полученные данные анализировали с использованием программы DataAnalysis 4.0.

При идентификации фенольных соединений использовали данные масс-спектрометрии, определяя m/z значение иона $[M-H]^-$ и его фрагментов, а также сравнивая полученные результаты с опубликованными в литературе (12, 23) и в базе масс-спектрометрических данных The Human Metabolome Database (HMDB) (24).

Содержание различных классов фенольных соединений — галлоил-глюкоз, эллаготаннинов, конденсированных таннинов, флавоноидов (производных кверцетина и кемпферола) — определяли методом мониторинга множественных реакций (22) и выражали в мг/г сухой массы побегов. Использовали калибровочные графики, полученные для стандартов фенольных соединений: 1,2,3,4,6-пентагаллоилглюкозы, эллаговой кислоты, галловой кислоты, (+)-катехина, кверцетина и кемпферола («Sigma-Aldrich», США). Общее содержание определяли как сумму всех классов фенольных соединений.

Результаты. УЭЖХ-ДД-МС анализ показал присутствие в экстракте побегов *C. equisetifolia* 16 фенольных соединений. По данным УФ-спектров, 14 фенольных соединений были классифицированы как гидролизуемые таннины или их предшественники и производные, а 2 соединения — как флаван-3-олы (рис. 1).

Соединение 1 со временем удерживания 1,26 мин показало УФ-спектр с двумя максимумами поглощения в области 218 и 274 нм, что характерно для галлоил-глюкоз (рис. 2). В масс-спектре определили депротонированный ион m/z 331 $[M-H]^-$, а также его фрагмент m/z 169 [галловая кислота-Н]⁻ (табл.). На основании этого соединение 1 было идентифицировано как моногаллоил-глюкоза, служащая предшественником гидролизуемых таннинов.

Соединения 2, 3, 4 со временем удерживания 2,14; 2,55 и 2,86 мин имели УФ-спектр с максимумом поглощения при 228–229 нм и небольшое плечо в области 260–280 нм, что характерно для эллаготаннинов, в структуре которых отсутствуют галлоильные группы (см. рис. 2). Эти соединения имели депротонированный ион m/z 783 $[M-H]^-$ и его фрагмент m/z 301

[Эллаговая кислота-Н]⁻ (см. табл.). В результате соединения 2 было идентифицировано как казуариин, а соединения 3 и 4 — как изомеры педункулагина (см. табл.). Все три эллаготаннина имеют одинаковую массу, но отличаются структурно. В молекуле казуариина глюкоза имеет линейную форму, тогда как в педункулагине — циклическую форму (12). По этой причине время удерживания казуариина при ВЭЖХ анализе на колонках с обращенной фазой меньше, чем у педункулагина (25).

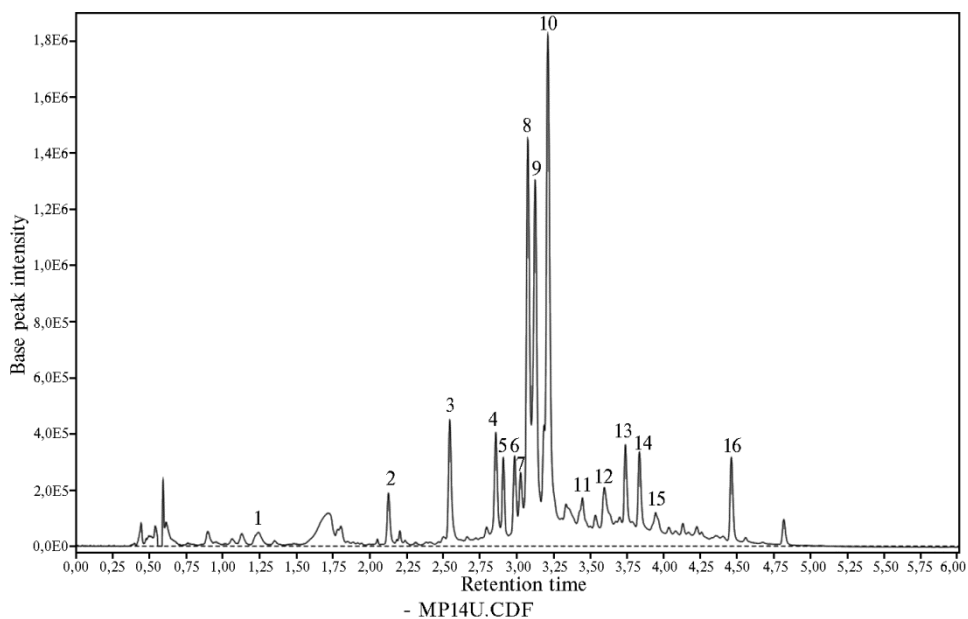


Рис. 1. Профиль фенольных соединений экстракта из побегов *Casuarina equisetifolia* L., полученный с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с фотодиодным детектором (280 нм): 1 — моногаллоил-глюкоза, 2 — казуариин, 3 — педункулагин (изомер 1), 4 — педункулагин (изомер 2), 5 — катехин, 6 — птерокаринин А (изомер 1), 7 — птерокаринин А (изомер 2), 8 — стахиурин, 9 — чебулаговая кислота, 10 — казуаринин, 11 — производное катехина, 12 — эллаготаннин, 13 — арабинозид эллаговой кислоты, 14 — казуариктин, 15 — эллаговая кислота, 16 — рамнозид эллаговой кислоты.

Соединение 5 было идентифицировано как (+)-катехин на основании характерного для флаван-3-олов УФ-спектра с двумя максимумами поглощения в области 226 и 278 нм (см. рис. 2), а также депротонированного иона m/z 289 $[M-H]^-$, фрагмента m/z 245 $[M-H-CO_2]^-$ и иона m/z 579 $[2M-H]^-$ (см. табл.).

Соединения 6 и 7 имели УФ-спектр с двумя максимумами поглощения в области 224 и 271-273 нм (см. рис. 2), что характерно для эллаготаннинов, содержащих галлоильные и гексагидроксидифеноильные группы. Изучение масс-спектра этих соединений показало присутствие депротонированного иона m/z 1067 $[M-H]^-$ и характерные фрагменты m/z 169 [галловая кислота-Н]⁻, 275 [монолактон декарбоксилированной гексагидроксидифеновой кислоты-Н]⁻ и 533 $[M-2H]^{2-}$ (см. табл.). В результате соединения 6 и 7 были предварительно идентифицированы как изомеры птерокаринина А — мономерные эллаготаннины с С-гликозидной связью (26). Для более точной идентификации необходимы дополнительные исследования.

Соединения 8, 10 и 14 также имели УФ-спектр, характерный для эллаготаннинов. В масс-спектре присутствовали депротонированный ион m/z 935 $[M-H]^-$, ион m/z 467 $[M-2H]^{2-}$ и характерный фрагмент m/z 301 [эллаговая кислота-Н]⁻ (см. табл.). Эти соединения были идентифициро-

ваны соответственно как стахиурин, казуаринин и казуариктин. Стахиурин и казуаринин относятся к эллаготаннинам с С-гликозидной связью, в которых глюкоза с открытой цепью образует сложноэфирные связи с двумя гексагидроксидифенольными группами, а казуариктин относится к простым мономерным эллаготаннинам (12).

Результаты идентификации фенольных соединений побегов *Casuarina equisetifolia* L., полученные с использованием ультра-эффективной жидкостной хроматографии в комбинации с фотодиодным и масс-спектрометрическим детекторами

№	Время, мин	УФ _{Макс.} , нм	Значение m/z аддукта или фрагмента			Соединение
			[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻	фрагменты	
1	1,26	218; 274	331	—	169	Моногаллоил-глюкоза
2	2,14	229	783	—	301; 391; 603	Казуриин
3	2,55	228	783	—	275; 301; 391;	Педункулагин (изомер 1)
4	2,86	229	783	—	275; 301; 375; 391; 483	Педункулагин (изомер 2)
5	2,91	226; 278	289	579	245	(+)-Катехин
6	2,99	224; 273	1067	—	169; 275; 533	Птерокаринин А (изомер 1)
7	3,03	224; 271	1067	—	169; 275; 533	Птерокаринин А (изомер 2)
8	3,08	227; 273	935	—	169; 275; 467	Стахиурин
9	3,13	225; 270	953	—	169; 275; 301; 476; 633	Чебулаговая кислота
10	3,21	232; 274	935	—	179; 275; 301; 467	Казуаринин
11	3,45	226; 275	458	917	289	Производное катехина
12	3,60	225; 272	—	—	169; 275; 301; 633; 785; 917; 1063	Неидентифицированный эллаготаннин
13	3,74	252; 300пл; 361	433	867	301	Арабинозид эллаговой кислоты
14	3,84	224; 273	935	—	301; 467	Казуариктин
15	3,95	252; 300пл; 365	301	—	-	Эллаговая кислота
16	4,46	249, 300пл; 365	447	895	301	Рамнозид эллаговой кислоты

Примечание. Прочерки означают, что ион или фрагменты иона отсутствовали в масс-спектре; пл — плечо.

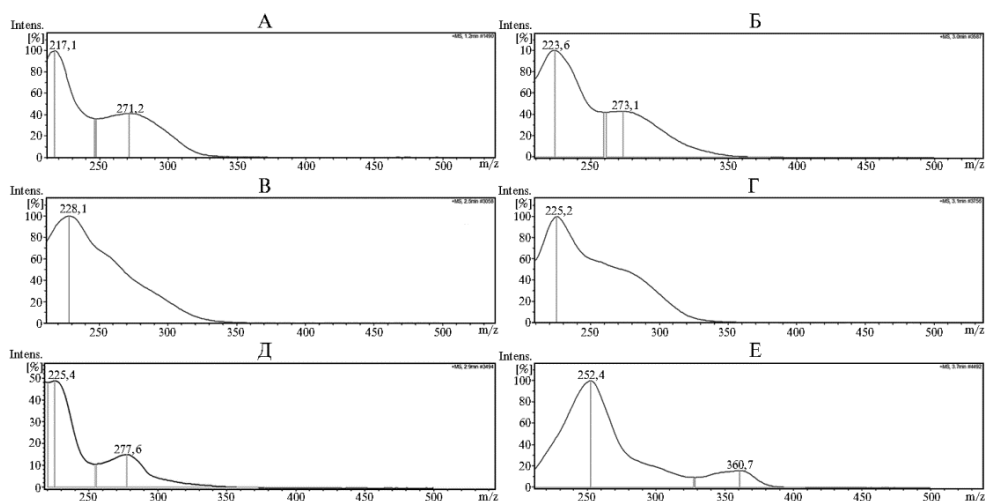


Рис. 2. Примеры УФ-спектров различных фенольных соединений, идентифицированных методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в экстракте из побегов *Casuarina equisetifolia* L.: А — моногаллоил-глюкоза, Б — птерокаринин А (изомер 1), В — педункулагин (изомер 1), Г — казуаринин, Д — катехин, Е — арабинозид эллаговой кислоты.

Соединение 9 было идентифицировано как чебулаговая кислота или ее изомер по присутствию в масс-спектре депротонированного иона со значением m/z 953 [M-H]⁻ и характерных фрагментов со значениями m/z 169 [галловая кислота-H]⁻, m/z 275 [монолактон декарбокислированной гексагидроксидифеновой кислоты-H]⁻, m/z 301 [эллаговая кислота-H]⁻, m/z 476 [M-2H]²⁻ и m/z 633 [корилагин-H]⁻ (см. табл.).

Соединение 11 имело УФ-спектр с максимумами поглощения в области 226 и 275 нм, а также в нем было зафиксировано присутствие ионов с m/z значениями 458 и 917, которые соответствовали ионам $[M-H]^-$ и $[2M-H]^-$, и фрагмент исходного иона со значением m/z 289 [катехин-Н] $^-$. Соединение 11 не удалось точно идентифицировать, но на основании полученных данных можно предположить, что это производное катехина.

Для соединения 12 со временем удерживания 3,60 мин не удалось определить в масс-спектре депротонированный ион и произвести его идентификацию. Однако УФ-спектр, характерный для эллаготаннинов, и присутствие в масс-спектре ионов с m/z 169, 275, 633, 785, 917 свидетельствуют, что это соединение относится к классу эллаготаннинов.

Соединения 13, 15 и 16 имели УФ-спектры, характерные для эллаговой кислоты (см. рис. 2). Анализ масс-спектров показал наличие фрагмента со значением m/z 301 [эллаговая кислота-Н] $^-$. В масс-спектре соединения 13 наблюдали ионы с m/z значениями 433 и 867, которые соответствуют $[M-H]^-$ и $[2M-H]^-$ (см. табл.). В результате соединения 13 было идентифицировано как арабинозид эллаговой кислоты, а соединение 15 — как эллаговая кислота. Соединение 16 показало присутствие ионов с m/z значениями 447 $[M-H]^-$ и 895 $[2M-H]^-$ и было идентифицировано как рамнозид эллаговой кислоты. Несмотря на то, что ранее проведенные исследования указывают на присутствие гидролизуемых таннинов в *C. equisetifolia*, подробно их состав не изучался.

Педункулагин, казуаринин и казуариктин были ранее выделены из растений другого вида семейства *Casuarinaceae* — *C. stricta* (12). Чебулаговая кислота обнаружена в *C. glauca* (27). Птерокаринин А выявлен у представителей семейства *Juglandaceae*, которое относится к тому же порядку, что *Casuarinaceae* (23). О наличии катехина и эллаговой кислоты в *C. equisetifolia* также сообщалось ранее (28).

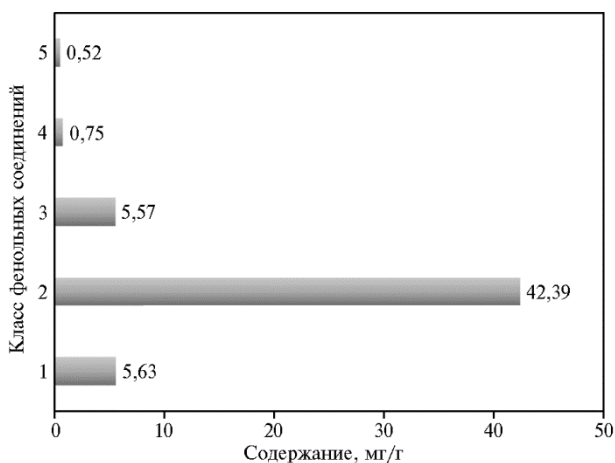


Рис. 3. Содержание различных классов фенольных соединений в побегах *Casuarina equisetifolia* L.: 1 — галлоил-глюкозы, 2 — эллаготаннины, 3 — конденсированные таннины, 4 — производные кемпферола, 5 — производные кверцетина.

таннин и казуариктин (см. табл.). В количественном отношении преобладали стахиурин, чебулаговая кислота и казуаринин (см. рис. 1).

Эллаготаннины играют важную роль в физиологии растений (29), участвуя в процессах роста, развития и размножения (30), защите от насекомых-фитофагов и патогенов (31, 32). Синтез этих соединений происходит

Общее содержание фенольных соединений в побегах *C. equisetifolia* составило 55 мг/г сухой массы (рис. 3). При этом общее содержание эллаготаннинов достигало 42 мг/г сухой массы побега, или 76 % от суммы всех классов фенольных соединений, что в основном соответствует данным других исследований (6-8).

При изучении состава эллаготаннинов были обнаружены казуаринин, два изомера педункулагина, два изомера птерокаринина А, стахиурин, чебулаговая кислота, казуаринин, неидентифицированный эллаго-

в клетках растений по шикиматному пути (33). Состав и содержание гидролизующих таннинов, в том числе эллаготаннинов, зависит как от вида растения, так и от фазы его развития (34). Например, в начале вегетации наблюдается преобладание галлоил-глюкоз, которые впоследствии окисляются до эллаготаннинов (35).

Обнаруженные в побегах *C. equisetifolia* эллаготаннины обладают разнообразной фармакологической активностью. Например, чебулаговая кислота, педункулагин и казуаринин отличаются высокой антиоксидантной (36) и противовирусной (37, 38) активностью. Кроме того, педункулагин проявляет противоопухолевые свойства в отношении культур раковых клеток (39), а казуаринин способен вызывать их апоптоз (40). Установлены противовоспалительное и антикоагулянтное действие казуаринина (41, 42). Антибактериальной активностью обладают казуариктин, стахиурин и казуаринин (43).

Таким образом, методом ультра-эффективной жидкостной хроматографии в комбинации с фотодиодным и масс-спектрометрическим детекторами изучен состав и содержание фенольных соединений в побегах растения *Casuarina equisetifolia*, произрастающего в условиях защищенного грунта в оранжерейном комплексе ФГБНУ ВИЛАР. Показано, что основные фенольные соединения в его побегах — эллаготаннины. Идентифицированы казуариин, два изомера педункулагина, два изомера птерокаринина А, стахиурин, чебулаговая кислота, казуаринин и казуариктин. Общее содержание эллаготаннинов составило 42 мг/г, или 76 % от суммы всех фенольных соединений. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли эллаготаннинов в жизнедеятельности *C. equisetifolia*, а также о возможном использовании его побегов для препаративного выделения индивидуальных эллаготаннинов (стахиурина, чебулаговой кислоты и казуаринина) с целью изучения их фармакологической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Diouf D., Sy M.O., Gherbi H., Bogusz D., Franche C. *Casuarinaceae*. In: *Compendium of Transgenic Crop Plants* /C. Kole, T.C. Hall (eds.). Blackwell Publishing Ltd, 2009: 279-292 (doi: 10.1002/9781405181099.k0910).
2. Dörken V.M., Parsons R.F. Morpho-anatomical studies on the leaf reduction in *Casuarina*: the ecology of xeromorphy. *Trees*, 2017, 31: 1165-1177 (doi: 10.1007/s00468-017-1535-5).
3. Li H.-B., Li N., Yang S.-Z., Peng H.-Z., Wang L.-L., Wang Y., Zhang X.-M., Gao Z.-H. Transcriptomic analysis of *Casuarina equisetifolia* L. in responses to cold stress. *Tree Genetics & Genomes*, 2017, 13: 7 (doi: 10.1007/s11295-016-1090-z).
4. Wang Y., Zhang Y., Fan C., Wei Y., Meng J., Li Z., Zhong C. Genome-wide analysis of MYB transcription factors and their responses to salt stress in *Casuarina equisetifolia*. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 328 (doi: 10.1186/s12870-021-03083-6).
5. Zhong C., Zhang Y., Wei Y., Meng J., Chen Y., Bush D., Bogusz D., Franche C. The role of Frankia inoculation in *Casuarina* plantations in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, 112: 47-56 (doi: 10.1007/s10482-018-1205-7).
6. Saranya K., Gowrie U. Phytochemical analysis and in vitro studies on antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities using *Casuarina equisetifolia* bark extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2018, 10(1): 118-125 (doi: 10.22159/ijpps.2018v10i1.22188).
7. Pawar A.R., Rao P.S., Vikhe D.N. Pharmacognostic, phytochemical, physico-chemical standardization of *Casuarina equisetifolia* stem-inner bark. *Research Journal of Science and Technology*, 2021, 13(3): 193-199 (doi: 10.52711/2349-2988.2021.00029).
8. Zhang L., Zhang S., Ye G., Qin X. Seasonal variation and ecological importance of tannin and nutrient concentrations in *Casuarina equisetifolia* branchlets and fine roots. *Journal of Forestry Research*, 2020, 31(5): 1499-1508 (doi: 10.1007/s11676-019-00991-0).
9. Muhammad H.L., Garba R., Abdullah A.S., Adefolalu F.S., Busari M.B., Hamzah R.U., Makun H.A. Hypoglycemic and hypolipidemic properties of *Casuarina equisetifolia* leaf extracts in alloxan induced diabetic rats. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 2022, 2: 100034 (doi: 10.1016/j.prmcm.2021.100034).

10. Muthuraj S., Muthusamy P., Radha R., Ilango K. Pharmacognostical, phytochemical studies and in vitro antidiabetic evaluation of seed extracts of *Casuarina equisetifolia* Linn. *The Journal of Phytopharmacology*, 2020, 9(6): 410-418 (doi: 10.31254/phyto.2020.9605).
11. Zhang S.-J., Lin Y.-M., Zhou H.-C., Wei S.D., Lin G.-H., Ye G.-F. Antioxidant tannins from stem bark and fine root of *Casuarina equisetifolia*. *Molecules*, 2010, 15(8): 5658-5670 (doi: 10.3390/molecules15085658).
12. Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Yazaki K. Tannins of *Casuarina* and *Stachyurus* species. Part 1. Structures of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin, and stachyurin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1983: 1765-1772 (doi: 10.1039/P19830001765).
13. Pratyusha S. Phenolic compounds in the plant development and defense: an overview. In: *Plant stress physiology — perspective in agriculture* /M. Hasanuzzaman, K. Nahar (eds.). Intechopen, 2022: 125-140 (doi: 10.5772/intechopen.102873).
14. Kumar S., Abedin M.M., Singh A.K., Das S. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In: *Plant phenolics in sustainable agriculture* /R. Lone, R. Shuab, A. Kamili (eds.). Springer, Singapore, 2020: 517-532 (doi: 10.1007/978-981-15-4890-1_22).
15. Zhang S., He C., Wei L. Jian S., Liu N. Transcriptome and metabolome analysis reveals key genes and secondary metabolites of *Casuarina equisetifolia* ssp. *incana* in response to drought stress. *BMC Plant Biology*, 2023, 23: 200 (doi: 10.1186/s12870-023-04206-x).
16. Ai D., Wang Y., Wei Y., Zhang J., Meng J., Zhang Y. Comprehensive identification and expression analyses of the SnRK gene family in *Casuarina equisetifolia* in response to salt stress. *BMC Plant Biology*, 2022, 22: 572 (doi: 10.1186/s12870-022-03961-7).
17. Zhang L.H., Shao H.B., Ye G.F., Lin Y. M. Effects of fertilization and drought stress on tannin biosynthesis of *Casuarina equisetifolia* seedlings branchlets. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34: 1639-1649 (doi: 10.1007/s11738-012-0958-2).
18. Kiss A.K., Piwowarski J.P. Ellagitannins, gallotannins and their metabolites—the contribution to the anti-inflammatory effect of food products and medicinal plant. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(37): 4946-4967 (doi: 10.2174/0929867323666160919111559).
19. Olchowik-Grabarek E., Sękowski S., Kwiatek A., Placzekiewicz J., Abdulladjanova N., Shlyonsky V., Swiecicka I, Zamaraeva M. The structural changes in the membranes of *Staphylococcus aureus* caused by hydrolysable tannins witness their antibacterial activity. *Membranes*, 2022, 12(11): 1124 (doi: 10.3390/membranes12111124).
20. Kaneshima T., Myoda T., Nakata M., Fujimori T., Toeda K., Nishizawa M. Antioxidant activity of C-Glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*). *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 69: 76-81 (doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.024).
21. Senobari Z., Karimi G., Jamialahmadi K. Ellagitannins, promising pharmacological agents for the treatment of cancer stem cells. *Phytotherapy Research*, 2022, 36(1): 231-242 (doi: 10.1002/ptr.7307).
22. Engstrom M.T., Palijarvi M., Salminen J.P. Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin-, kaempferol- and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(16): 4068-4079 (doi: 10.1021/acs.jafc.5b00595).
23. Xu M., Liu P., Jia X., Zhai M., Zhou S., Wu B., Guo Z. Metabolic profiling revealed the organ-specific distribution differences of tannins and flavonols in pecan. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(9): 4987-5006 (doi: 10.1002/fsn3.1797).
24. Wishart D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C., Liang K., Vázquez-Fresno R., Sajed T., Johnson D., Li C., Karu N., Sayeeda Z., Lo E., Assempour N., Berjanskii M., Singhal S., Arndt D., Liang Y., Badran H., Grant J., Serra-Cayuela A., Liu Y., Mandal R., Neveu V., Pon A., Knox C., Wilson M., Manach C., Scalbert A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D608-D617 (doi: 10.1093/nar/gkx1089).
25. Plaza M., Batista A.G., Cazarin C.B.B., Sandahl M., Turner C., Östman E., Júnior M.R.M. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jacobitica* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chemistry*, 2016, 211: 185-197 (doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.142).
26. Nonaka G., Ishimaru K., Azuma R., Ishimatsu M., Nishioka I. Tannins and related compounds. LXXXV: Structures of novel C-glycosidic ellagitannins, grandinin and pterocarins A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1989, 37(8): 2071-2077 (doi: 10.1248/cpb.37.2071).
27. Jorge T.F., Tohge T., Wendenburg R., Ramalho J.C., Lidon F.C., Ribeiro-Barros A.I., Fernie A.R., Antonio C. Salt-stress secondary metabolite signatures involved in the ability of *Casuarina glauca* to mitigate oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, 166: 103808 (doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.103808).
28. Aher A.K., Pal S., Yadav S., Patil U., Bhattacharya S. Evaluation of antimicrobial activity of *Casuarina equisetifolia* frost (*Casuarinaceae*). *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2009, 1(1): 64-68.
29. Yoshida T., Amakura Y., Yoshimura M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order *Myrtales*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(1): 79-106 (doi: 10.3390/ijms11010079).

30. Karlińska E., Masny A., Cieślak M., Macierzyński J., Pecio Ł., Stochmal A., Kosmala M. Ellagitannins in roots, leaves, and fruits of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) vary with developmental stage and cultivar. *Scientia Horticulturae*, 2021, 275: 109665 (doi: 10.1016/j.scienta.2020.109665).
31. Anstett D.N., Cheval I., D'Souza C., Salminen J.-P., Johnson M.T. Ellagitannins from the *Onagraceae* decrease the performance of generalist and specialist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 2019, 45: 86–94 (doi: 10.1007/s10886-018-1038-x).
32. Grellet-Bournonville C.F., Di Peto P.A., Cervino Dowling A.M., Castagnaro A.P., Schmeda-Hirschmann G., Diaz Ricci J.C., Mamani A.I., Filippone M.P. Seasonal variation of plant defense inductor ellagitannins in strawberry leaves under field conditions for phytosanitary technological applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(42): 12424–12432 (doi: 10.1021/acs.jafc.1c03810).
33. Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, 31(1): 3–16 (doi: 10.1016/S0305-1978(02)00081-9).
34. Salminen J.-P. The chemistry and chemical ecology of ellagitannins in plant–insect interactions: from underestimated molecules to bioactive plant constituents. In: *Recent advances in polyphenol research* /A. Romani, V. Lattanzio, S. Quideau (eds.). Wiley, Hoboken, 2014: 83–113 (doi: 10.1002/9781118329634.ch4).
35. Hatano T., Kira R., Yoshizaki M., Okuda T. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. *Phytochemistry*, 1986, 25(12): 2787–2789 (doi: 10.1016/S0031-9422(00)83742-5).
36. Yin T.-P., Cai L., Chen Y., Li Y., Wang Y.-R., Liu C.-S., Ding Z.-T. Tannins and antioxidant activities of the walnut (*Juglans regia*) pellicle. *Natural Product Communications*, 2015, 10(12): 1934578X1501001232 (doi: 10.1177/1934578X1501001232).
37. Khalifa I., Zhu W., Nafie M.S., Dutta K., Li C. Anti-COVID-19 effects of ten structurally different hydrolysable tannins through binding with the catalytic-closed sites of COVID-19 main protease: an in-silico approach. *Preprints*, 2020: 2020030277 (doi: 10.20944/preprints202003.0277.v1).
38. Du R., Cooper L., Chen Z., Lee H., Rong L., Cui Q. Discovery of chebulagic acid and punicalagin as novel allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 3CL^{pro}. *Antiviral Research*, 2021, 190: 105075 (doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105075).
39. Kuo P.-L., Hsu Y.-L., Lin T.-C., Lin L.-T., Chang J.-K., Lin C.-C. Casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Planta Medica*, 2005, 71(3): 237–243 (doi: 10.1055/s-2005-837823).
40. Yang L.-L., Lee C.-Y., Yen K.-Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters*, 2000, 157(1): 65–75 (doi: 10.1016/S0304-3835(00)00477-8).
41. Kim M., Yin J., Hwang I.H., Park D., Lee, E., Kim M., Lee M. Anti-Acne vulgaris effects of pedunculagin from the leaves of *Quercus mongolica* by anti-inflammatory activity and 5 α -reductase inhibition. *Molecules*, 2020, 25(9): 2154 (doi: 10.3390/molecules25092154).
42. Kwon D.-J., Bae Y.-S., Ju S.M., Goh A.R., Choi S.Y., Park J. Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 409(4): 780–785 (doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.088).
43. Pujula E., Walton G., Woodward M.J., Karonen M. Antimicrobial activities of ellagitannins against *Clostridiales peyfringens*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 2020, 25(16): 3714 (doi: 10.3390/molecules25163714).

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений,
117216 Россия, г. Москва, ул. Грина, 7,
e-mail: tatianakroll1@gmail.com ✉, dbaleev@gmail.com, ossipov@utu.fi;
²Department of Chemistry, University of Turku,
Turku, Vatselankatu 2, Finland 20014

Поступила в редакцию
16 августа 2023 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 1, pp. 106–115

THE QUALITATIVE COMPOSITION AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SHOOTS OF *Casuarina equisetifolia* L.

T.A. Kroll¹ ✉, D.N. Baleev¹, V.I. Ossipov^{1, 2}

¹All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7, ul. Grina, Moscow, 117216 Russia, e-mail tatianakroll1@gmail.com (✉ corresponding author), dbaleev@gmail.com, ossipov@utu.fi;

²Department of Chemistry, University of Turku, Turku, Vatselankatu 2, 20014 Finland
ORCID:

Kroll T.A. orcid.org/0003-4642-651X

Ossipov V.I. orcid.org/0000-0002-8383-9965

Baleev D.N. orcid.org/0000-0002-1228-0594

Abstract

The species *Casuarina equisetifolia* L. is widely used in forestry in many countries with a tropical climate. Extracts from the shoots of *C. equisetifolia* are known to be rich in phenolic compounds which play an important role in plant growth and development, as well as in adaptation to abiotic and biotic environmental factors. Additionally, they exhibit antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, anti-tumor, neuroprotective, and other activities. In this study, the composition of phenolic compounds primarily consisting of monomeric ellagitannins was comprehensively investigated for the first time in the shoots of *C. equisetifolia*. The aim of this study was to investigate the composition and content of phenolic compounds in *C. equisetifolia* shoots using ultra performance liquid chromatography coupled with photodiode and mass spectrometric detectors (UHPLC-PDA-MS). The study focused on the green one-year-old photosynthetic shoots of the *C. equisetifolia* tree grown in the greenhouse of the All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR, Moscow). Samples were collected in the first decade of July 2019. The shoots were frozen, lyophilized, and ground. A 15 mg specimens were extracted with 1 ml of 80 % acetone for 60 min at room temperature with constant stirring. The extract was centrifuged for 20 min at 14000 rpm and evaporated to dryness at 45 °C. The extraction was repeated two more times. The resulting dry extract was dissolved in 1 ml of deionized water for 60 min, centrifuged for 20 min at 14000 rpm, diluted five times with deionized water, and filtered. An ultra-high performance liquid chromatographic system (UHPLC, Acquity UPLC® 2.9.0, Waters Corporation, USA) with a photodiode array detector (190–500 nm) and triple quadrupole mass spectrometer (Xevo TQ, Waters Corporation, USA) was used for the analysis of phenolic compounds. Separation was carried out in an Acquity UPLC® BEH Phenyl column (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters Corporation, Ireland). Data analysis was performed using the DataAnalysis 4.0 software. Phenolic compounds were identified based on mass spectrometry data by determining the m/z value of the [M-H] ion and its m/z fragments. The content of different classes of phenolic compounds such as gallolyl-glucoses, ellagitannins, condensed tannins, flavonoids (quercetin and kaempferol derivatives) was determined using multiple reaction monitoring. The extract was found to contain 16 phenolic compounds, with 14 belonging to the class of hydrolyzable tannins and 2 to the class of flavan-3-ols. It was discovered that *C. equisetifolia* shoots accumulate monomeric ellagitannins with molecular masses ranging from 784 to 1068 Da, containing glucose as a polyol in either cyclic or linear form. Among the ellagitannins of *C. equisetifolia*, casuarinin, two isomers of pedunculagin, stachyurin, chebulic acid, casuarininin, and casuarictin were identified for the first time. Two compounds with a molecular mass of 1068 Da were preliminarily identified as isomers of pterocarinin A. Ellagic acid and its derivatives, ellagic arabinoside and ellagic rhamnoside, were also identified in shoots. The total content of phenolic compounds was 55 mg/g dry weight, with ellagitannins being the main phenolic compounds. Their content reached 42 mg/g, or 76 % of the total amount of all phenolic compounds. Galloyl-glucose and condensed tannins each accounted for 10 % of the total amount of all phenolic compounds. These findings suggest the potential use of *C. equisetifolia* shoots as a raw material for obtaining individual ellagitannins and studying their antiviral, anti-inflammatory, and anti-tumor activities.

Keywords: *Casuarina equisetifolia* L., *Casuarinaceae*, liquid chromatography, mass spectrometry, phenolic compounds, hydrolysable tannins, ellagitannins.