

© Коллектив авторов, 2015

С. А. Никитина¹, В. Р. Хабибрахманова¹, М. А. Сысоева¹, Ф. Ф. Носова²

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЛАНИНА ЧАГИ. II. СОСТАВ ФРАКЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Республика Татарстан, Россия; e-mail: semicvetik-86@bk.ru

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Республика Татарстан, Россия

Впервые проведено исследование состава углеводородной фракции, выделенной из меланина чаги петролевым эфиром. Определены насыщенные углеводороды нормального и изостроения, а также пристан, фитан, стераны и терпаны.

Ключевые слова: чага; меланин; петролевым экстракт; углеводороды; стераны; терпаны.

Углеводороды представляют собой распространенный класс, включающий алифатические, циклические, ароматические и изопреноидные вещества. Эти соединения играют важную роль в жизнедеятельности высших грибов. В частности, они входят в состав воскоподобных и смолообразных композиций и выполняют функцию защитных барьеров. Изопреноидные углеводороды участвуют в реакциях циклизации и других процессах, приводящих к образованию разнообразных природных биологически активных соединений: стероидов, каротиноидов, иридоидов и т.д. [1, 2].

Основным действующим началом березового гриба *Inonotus obliquus* (чага) является меланин. В формировании его частиц участвуют вещества фенольной, полисахаридной, белковой и липофильной природы [3]. При исследовании липофильных соединений меланина установлено, что до 42 % из них занимают углеводороды и воски [4]. Ранее [5] в гидролизате меланина чаги были определены из насыщенных углеводородов докозан, гексатриаконтан, пентадекан, генэйкозан, 2,6,10-триметилтетрадекан, дотриаконтан, из ненасыщенных углеводородов — тетрадекен, октадекен, эйкоз-1-ен, гексадекен, докоз-1-ен, нондек-1-ен, гексакоз-1-ен, из ароматических — мезителен, 3,4-диметил-1,1-бифенил, октилдецилбензен, 2-метилдифенилметан, 3-метилфенилметан, 3-метил-1,1-бифенил, метилундецилбензен, 3-пропилтолуол, *o*-ксилол, из изопреноидных — сквален. На основании высокого содержания углеводородов в составе меланина чаги можно предположить, что их состав представлен большим количеством соединений. Это обуславливает актуальность их дальнейшего исследования для расширения спектра биологически активных веществ, участвующих в формировании частиц меланина чаги.

Целью работы являлось изучение состава углеводородной фракции меланина чаги.

Экспериментальная часть

Использовали сырье чаги, приобретенное в аптечной сети — ОАО «Красногорсклексредства», партия 61208, 2008 г. Водные извлечения чаги получали мето-

дом ремацерации, выделение из них меланина проводили осаждением 25 % водным раствором хлористоводородной кислоты до pH 1–2 [6, 7]. Меланин чаги экстрагировали петролевым эфиром [8]. Экстракцию меланина проводили неоднократно ($n = 5$) с целью накопления образца для последующего анализа.

Разделение липофильных веществ петролевого экстракта проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле (Silicagel L 100/160μ «Lachema», Chemapol). В качестве элюентов использовали гексан, смесь гексана с петролевым эфиром в соотношениях 99:1, 95:5, 92:8, 85:15, затем петролевым эфиром и гексаном с этилацетатом в соотношениях 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10 [9]. Контроль за разделением осуществляли с помощью ТСХ в системе растворителей петролевым эфиром — диэтиловый эфир — уксусная кислота (90:10:1) [10].

ИК-спектр регистрировали на спектрофотометре «IRPrestige-21» фирмы «Shimadzu» с Фурье-преобразованием в таблетках KBr.

ГЖХ проводили на хроматографе «Кристалл 2000М». Разделение проводили на капиллярной колонке размером 25 м × 0,20 мм с неподвижной фазой — CP-Sil 5 CB с толщиной слоя 0,33. В диапазоне температур от 100 до 150 °C изменение температуры проводили со скоростью 10 °C/мин и в диапазоне от 150 до 300 °C — 3 °C/мин. Газ-носитель — водород. Детектор пламенно-ионизационный. Объем вводимой пробы 1 мкл, способ ввода — с делением потока 1:20. Идентификацию качественного состава алифатических углеводородов нормального строения проводили по сопоставлению времен удерживания исследуемых веществ экстрактов и эталонной смеси *n*-алканов фирмы «Aldrich».

ГХ/МС анализ проведен с масс-детектором «TurboMass Gold» фирмы Perkin Elmer. Хроматографирование осуществляли на капиллярной колонке размером 30 м × 0,25 мм с фазой PE-XLB в режиме линейного программирования от 100 до 300 °C. В диапазоне температур от 100 до 150 °C скорость подъема температуры составляла 12,5 °C в минуту и 3 °C в минуту в

диапазоне от 150 до 300 °С. Изотермический режим при 300 °С — 14 мин. Температура испарителя — 300 °С. Газ-носитель — гелий, скорость потока — 2 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл, способ ввода — с делением потока 1:20. Условия масс-спектрометрического анализа: квадрупольный масс-фильтр, электронная ионизация 70 эВ, диапазон масс 50–550 ел⁺, температура ионного источника 200 °С. Компьютерную обработку данных проводили в режиме SIM с записью ионов *m/z* 191 (для терпанов) и *m/z* 217 (для стеранов). Идентификацию состава соединений проводили на основании баз данных масс-спектров “Nist” и “Nbs”.

Результаты и их обсуждение

Первая фракция, полученная при разделении петролейного экстракта меланина методом колоночной хроматографии, после удаления растворителя представляла собой белую аморфную субстанцию. На основании данных ТСХ установлено, что данная фракция содержит углеводороды и воски [10].

ИК-спектроскопическое исследование фракции показало, что в ее состав входят преимущественно углеводороды нормального строения (2956–2848 о.с. — ν CH₂, CH₃, 1471 ср., 1377 сл. — δ CH₂, CH₃, 729–719 дублет — ρ (CH₂)_{*n*>4}, см⁻¹). Присутствуют колебания гидроксильной спиртовой группы (3435 ср.ш. — ν OH..., 890 сл. — ν C-OH, см⁻¹), а также 1650, 1630 — ν C=C сопр. см⁻¹ ненасыщенных соединений [11, 12].

С помощью ГЖХ показано, что насыщенные углеводороды исследуемого образца представлены спек-

тром гомологов состава C₁₄-C₃₇ с преобладанием C₂₄H₅₀, C₂₅H₅₂, C₂₆H₅₄ (табл. 1) и незначительным количеством насыщенных углеводородов изостроения (*i*-C₂₂-C₃₄). Стоит отметить, что ранее в чаге было обнаружено лишь 5 насыщенных алканов C₁₅H₃₂, C₂₁H₄₄, C₂₂H₄₆, C₃₂H₆₆, C₃₆H₇₄ [5].

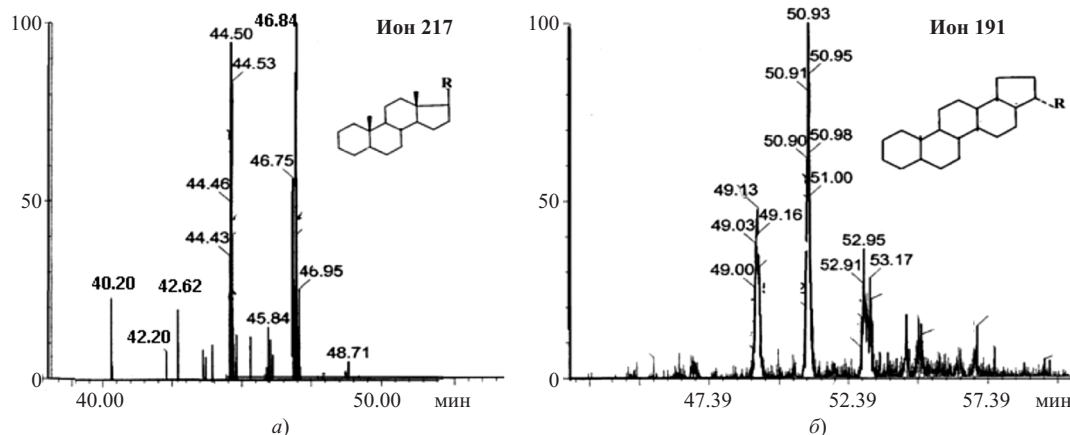
Впервые в составе меланина чаги обнаружены изопреноидные углеводороды — пристан C₁₉H₄₀ и фитан C₂₀H₄₂. Фитан является производным самого распространенного в природе изопреноидного спирта фитола, входящего в состав хлорофилла. Вероятно, в процессе своего роста и развития чага, растущая на березе, использует не только структурные единицы лигнина, но и другие компоненты организма “хозяина”.

Аналогичное распределение *n*-алканов во фракции углеводородов меланина было получено при использовании для анализа метода ГХ/МС. При этом более чувствительный и селективный ГХ/МС-анализ позволил обнаружить во фракции углеводородов меланина чаги полициклические углеводороды — стераны и терпаны. В составе стеранов найдены холестаны C₂₇ со временами удерживания 44,43–44,57 мин, метилхолестаны C₂₈ (эргостан, кампестан) со временами удерживания 46,75–46,95 мин, этилхолестан C₂₉ (стигмастан или ситостан) со временем удерживания 48,71 мин, в составе терпанов — гопан C₂₉ со временем удерживания 49,13 мин и олеанан C₃₀ со временем удерживания 50,93 мин (рисунок).

Стераны и терпаны образуются в результате потери стеринными и терпеновыми соединениями чаги удлиненной боковой цепи, а также функциональных

Состав *n*-алканов петролейного экстракта меланина чаги

Компонент	Формула	Время удерживания, мин	Площадь пика, мм ²	Содержание, % от общей площади пиков
Тетрадекан	C ₁₄ H ₃₀	8,308	190,325	0,15
Пентадекан	C ₁₅ H ₃₂	10,167	245,317	0,19
Гексадекан	C ₁₆ H ₃₄	12,412	329,945	0,25
Гептадекан	C ₁₇ H ₃₆	14,978	277,822	0,22
Пристан	C ₁₉ H ₄₀	15,217	127,512	0,10
Октадекан	C ₁₈ H ₃₈	17,787	359,016	0,28
Фитан	C ₂₀ H ₄₂	18,127	175,301	0,14
Нонадекан	C ₁₉ H ₄₀	20,745	767,376	0,59
Эйкозан	C ₂₀ H ₄₂	23,785	1196,694	0,93
Генэйкозан	C ₂₁ H ₄₄	26,835	3323,487	2,57
Докозан	C ₂₂ H ₄₆	29,889	7722,578	5,98
Трикозан	C ₂₃ H ₄₈	32,854	12217,450	9,45
Тетракозан	C ₂₄ H ₅₀	35,778	18274,611	14,14
Пентакозан	C ₂₅ H ₅₂	38,506	17396,448	13,47
Гексакозан	C ₂₆ H ₅₄	41,178	19061,955	14,75
Гептакозан	C ₂₇ H ₅₆	43,622	14089,100	10,91
Октакозан	C ₂₈ H ₅₈	46,013	10780,143	8,34
Нонакозан	C ₂₉ H ₆₀	48,285	8085,544	6,27
Триакоктан	C ₃₀ H ₆₂	50,513	5748,018	4,45
Гентриакоктан	C ₃₁ H ₆₄	52,658	3541,284	2,74
Дотриакоктан	C ₃₂ H ₆₆	54,747	2294,887	1,77
Тритриакоктан	C ₃₃ H ₆₈	56,777	1305,019	1,01
Тетратриакоктан	C ₃₄ H ₇₀	58,848	697,408	0,54
Пентатриакоктан	C ₃₅ H ₇₂	61,297	459,389	0,35
Гексатриакоктан	C ₃₆ H ₇₄	64,131	322,310	0,25
Гептатриакоктан	C ₃₇ H ₇₆	67,532	205,432	0,16



Хроматограммы фракции углеводов меланина чаги по молекулярным ионам: а) для стеранов m/z 217; б) для терпанов m/z 191. По оси ординат — относительная интенсивность сигнала; по оси абсцисс — время, мин.

групп в результате естественных метаболических процессов [2].

Стераны являются производными стериновых соединений, обнаруженных ранее в чаге и проявляющих высокие противоопухолевые, иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства [13 – 16].

Терпаны в высших грибах встречаются достаточно редко. Производные гопана в основном входят в состав клеточных мембран лишайников, бактерий и синезеленых водорослей и выполняют функции, свойственные стеринам, в частности, участвуют в регуляции клеточной проницаемости [2]. Производные олеанана являются терпеноидами, которые входят в состав березы (β -амирин, олеаноловая кислота) и проявляют биологическую активность. К примеру, олеаноловая кислота обладает кардиотоническим, гепатопротекторным, гиполлипидимическим действием и противоопухолевой активностью [2, 17].

Таким образом, исследование углеводородной фракции меланина чаги позволило идентифицировать насыщенные углеводороды нормального и изо-строения, расширив их состав, а также впервые определить в меланине чаги изопреноидные пристан и фитан, и полициклические углеводороды стераны и терпаны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007 – 2013 годы” по Госконтракту № 01201252915 от 28.02.2012.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе “У. М. Н. И. К.”.

ЛИТЕРАТУРА

3. Э. Беккер, *Физиология и биохимия грибов*, Изд-во Моск. ун-та, Москва (1988).
- А. А. Семенов, *Очерк химии природных соединений*, Наука, Новосибирск (2000).
- М. А. Сысоева, *Автореф. дис. д-ра хим. наук*, Казань (2009).
- С. А. Никитина, В. Р. Хабибрахманова, М. А. Сысоева, *Тез. докл. XIX Менделеев. съезда по общей и прикладной химии*, Волгоград (2011), сс. 407 – 408.
- W. Mazurkiewicz, *Acta Poloniae Pharm.*, **67**(4), 397 – 406 (2010).
- М. А. Сысоева, О. Ю. Кузнецова, В. С. Гамаюрова и др., *Вестник КГТУ*, № 2, 172 – 179 (2003).
- Фармакопейная статья на Бефунгин “ФС 42-3291-96”.
- Заявка на патент РФ № 2013116569 (2013).
- А. И. Ермаков, *Методы биохимического исследования растений*, Москва (1972).
- М. Кейтс, *Техника липидологии*, Москва (1975).
- Д. Браун, А. Флорид, М. Сейнзбери, *Спектроскопия органических веществ*, Мир, Москва (1992).
- Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффольтер *Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных*, Мир, Москва (2006).
- K. Kahlos, L. Kangas, R. Hiltunen, *Planta Med.*, **52**, 554 (1986).
- T. Nakata, S. Taji, T. Yamada, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**(1), 257 – 264 (2007).
- M. J. Chung, *Nutrition Res. Practice*, **4**(3), 177 – 182 (2010).
- Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa, *Euras. J. Forest Res.*, **1**, 43 – 50 (2000).
- И. С. Мовсумов, Э. А. Гараев, *Химия раст. сырья*, № 3, 5 – 10 (2010).

Поступила 11.11.13

INVESTIGATION OF CHAGA MELANIN. II. COMPOSITION OF HYDROCARBON FRACTION

S. A. Nikitina^{1*}, V. R. Khabibrakhmanova¹, M. A. Sysoeva¹, F. F. Nosova²

¹ Kazan National Research Technological University, Kazan, Tatarstan, Russia

² Kazan Federal University, Kazan, Tatarstan, Russia

* e-mail: semicvetik-86@bk.ru

Composition of the fraction extracted by petroleum ether from chaga melanin has been studied for the first time. Saturated hydrocarbons with normal and iso-structure, as well as pristane, phytane, steranes and terpanes were identified.

Keywords: chaga; melanin; petroleum extract; hydrocarbons; steranes; terpanes.