

Г. И. Кьямова, В. Р. Хабибрахманова, М. А. Сысоева

## СОСТАВ ГИДРОФОБНЫХ ВЕЩЕСТВ ЧАГИ, ИЗВЛЕКАЕМЫХ ЭТИЛАЦЕТАТОМ

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Россия, Казань, Республика Татарстан; e-mail: azulenchik@mail.ru

Показано, что этилацетатом из чаги можно извлечь около 0,88 % экстрактивных веществ, из которых около 58 % приходится на липофильные вещества, а остальная часть представлена фенольными соединениями. В экстракте определены тетрациклические тритерпены, стерины и их эфиры, сесквитерпены (азулены), бициклические монотерпены (иридоиды), фенолкарбоновые кислоты, простые фенолы и флавоноиды. Впервые в чаге обнаружены соединения, относящиеся к классу стильбенов, производное фенантрена и 9(11)-дигидроэргостерил бензоат.

**Ключевые слова:** чага; этилацетат; стерины; тетрациклические тритерпены; азулены; иридоиды; флавоноиды.

Применение этилацетата для экстракции коллоидной системы водного извлечения чаги позволило расширить состав липофильных и фенольных соединений и впервые обнаружить в водных экстрактах чаги такие биологически активные вещества, как иридоиды и азулены [1, 2]. При этом данное исследование не позволяет точно оценить состав гидрофобных веществ чаги, поскольку при водной экстракции гриба их большая часть может оставаться в дисперсной фазе водного извлечения — меланине, а также в шроте [3].

Целью настоящей работы является сравнительная характеристика состава биологически активных веществ, извлекаемых этилацетатом непосредственно из сырья чаги и его водных извлечений.

Данное исследование является актуальным, поскольку позволит уточнить количество и расширить состав гидрофобных веществ гриба.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сырье чаги, приобретенное в аптечной сети (серия 100412 ИП Гордеев М. В.), соответствующее требованиям [4]. Экстракт получали обработкой измельченной чаги этилацетатом в аппарате Сокслета [5] в течение 10 ч в соотношении сырье — экстрагент 1:40. Полученное извлечение упаривали в вакууме при температуре  $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$ , выход  $(0,88 \pm 0,03)\%$ . Сухой остаток трижды обрабатывали петролейным эфиром ( $T_{\text{кип}} 40 - 70^\circ\text{C}$ ). Петролейные экстракты объединяли и упаривали в вакууме (фракция 1). Остаток веществ экстракта, не растворившихся в петролейном эфире, растворяли в этилацетате (фракция 2).

Количество экстрактивных веществ определяли спектрофотометрически: простых фенолов и фенолкарбоновых кислот с применением 4-аминоантипирина [6], флавоноидов — с применением раствора хлорида алюминия [7, 8], тетрациклических тритерпенов — ванилиновым методом [9], стеринов и их эфиров — с применением раствора хлорного железа [10]. Экспери-

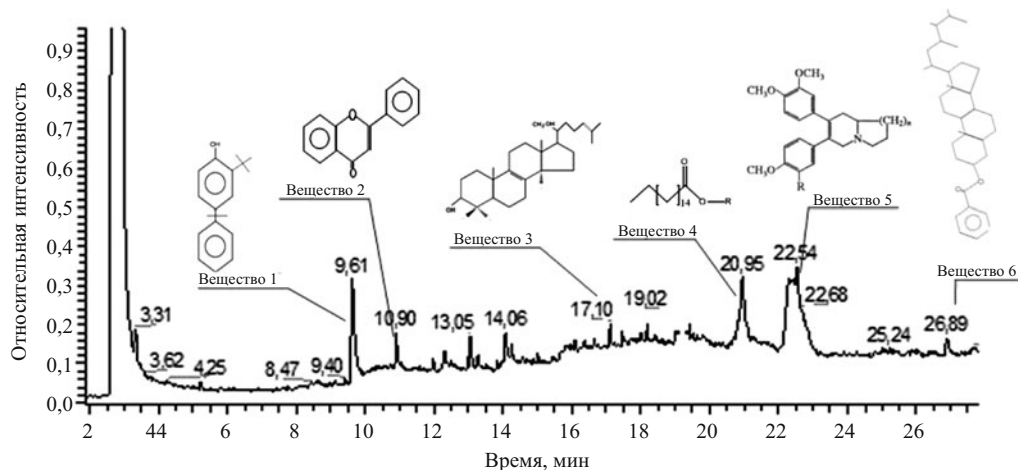
ментальные данные обрабатывали с использованием программы “Statistica 6.0”.

Хроматомасс-спектрометрическое исследование (ГХ/МС) проводили на приборе “GCMS 2010 Plus” фирмы “Shimadzu”. Метод ионизации: электронная ионизация, температура источника ионов  $220^\circ\text{C}$ . Капиллярная колонка Slb-5ms “Supelco”, длина 30 м, диаметр 0,32 мм, толщина слоя фазы 0,32 мкм. Газ-носитель — гелий. Условия получения хроматограммы: температура инжектора  $280^\circ\text{C}$ , скорость потока газа-носителя через колонку 0,67 мл/мин, деление потока (split) 1:3. Анализ вели при постоянной температуре термостата колонки  $280^\circ\text{C}$ . Идентификацию соединений осуществляли на основании базы данных масс-спектров “NIST-11”.

### Результаты и их обсуждение

Проведено сравнение веществ, экстрагируемых этилацетатом из сырья чаги и из его водного извлечения. Показано, что экстракция чаги этилацетатом позволяет извлечь до  $(0,88 \pm 0,03)\%$  веществ, что в 3,1 раза больше выхода экстрактивных веществ, полученных при обработке этилацетатом ее водного извлечения  $(0,28 \pm 0,05)\%$  [1]. Из сырья этилацетатом экстрагируется больше липофильных соединений, до  $(57,97 \pm 2,34)\%$  от суммы веществ экстракта, а из водного извлечения только  $(7,24 \pm 0,05)\%$ . Соответственно, количество фенольных соединений в этилацетатном экстракте из водного извлечения чаги в 2 раза больше, по сравнению с этилацетатным экстрактом из сырья. Это хорошо согласуется с тем, что в сырье более доступны вещества липофильной природы, а в водных извлечениях чаги липофильные и фенольные соединения в большей степени ассоциированы в меланине, и их доступность для экстракции ограничена.

Большое количество соединений фенольной и липофильной природы при водной обработке может оставаться в сырье. Например, использование петролейного эфира для выделения липофильных соединений из объектов исследования приводит к изменению сте-



ГЖ-хроматограмма этилацетатного экстракта. По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — относительная интенсивность.

пени их извлечения из сырья до 0,4 %, а из его водного извлечения до 20 % [11]. Смена экстрагента на менее полярный растворитель позволяет извлечь из чаги в 2 раза меньше липофильных веществ, а из ее водного извлечения выделяется их на 3 порядка больше по сравнению с этилацетатом. Это косвенно подтверждает сделанное предположение об отличии в доступности липофильных и фенольных компонентов в клетках гриба и меланине, и специфичности их извлечения растворителями, отличающимися полярностью и другими физико-химическими свойствами.

Этилацетатный экстракт фракционирован с помощью петролейного эфира с получением фракций 1 и 2.

В фракции 1 определены тетрациклические тритерпены, стеринны и их эфиры, в количестве  $(25,80 \pm 1,09)$  % и  $(10,74 \pm 0,26)$  % от суммы веществ соответственно.

Остальные вещества фракции 1, согласно данным, полученным с помощью хроматографии в тонком слое на пластинках “Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ” в сравнении со стандартными образцами, представлены моно- и 1,2-диглицеридами, стеринами, ланостеролом, триалкиловыми эфирами глицерина, эфирами стериннов, углеводородами (парафинами и олефинами), восками (петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота, 90:10:1, хлорное железо) [12]. Все соединения, определенные в фракции 1, обнаружены ранее в этилацетатном экстракте из водного извлечения чаги [2].

Разделение веществ фракции 1 в бензоле и последующая обработка хроматограммы реактивом Штала позволило обнаружить 3 пятна ( $R_f$  0,04; 0,23; 0,69), имеющих серо-фиолетовую и голубую окраску, свойственную сесквитерпенам (азуленам) [13]. Ранее при анализе этилацетатного экстракта водного извлечения чаги обнаружено только 1 соединение, отнесенное к азуленам [1].

Анализ фракции 2 показал, что фенольные соединения представлены фенолкарбоновыми кислотами и простыми фенолами в количестве  $(2,56 \pm 0,07)$  % от суммы веществ и флавоноидами, количество которых составляет  $(1,86 \pm 0,03)$  % от суммы веществ. На долю

перечисленных соединений приходится до 11 % от суммы веществ фракции 2. По-видимому, остальные вещества представлены более сложными полифенольными соединениями, например дубильными веществами, или сопутствующими веществами иной природы, которые хорошо растворимы в этилацетате [14].

Качественный состав фенолкарбоновых кислот, простых фенолов и флавоноидов в фракции 2 исследован с помощью хроматографии в тонком слое на пластинках “Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ” в сравнении со стандартными образцами. В ней обнаружены такие фенолкарбоновые кислоты, как галловая, протокатеховая, *m*-оксibenзойная или *n*-кумаровая, или  $\beta$ -резорциловая, ванилиновая, вератровая (бензол — этанол — уксусная кислота, 96:16:8, диазореактив) [13]. Из простых фенолов показано наличие пирокатехина или гомопирокатехина, резорцина или гидрохинона, индофенола, фенола (бензол, УФ-свет, фосфорно-молибденовый реактив) [6]. Состав флавоноидов представлен кверцетином, кемпферолом или мирицетином (этилацетат — уксусная кислота — вода, 5:1:1, УФ-свет, раствор хлорида алюминия) [15]. Все обнаруженные фенольные соединения ранее идентифицированы в составе как самой чаги, так и в ее водных и органических экстрактах [1, 16 – 20]. Спектр фенолкарбоновых кислот и флавоноидов шире в водном извлечении чаги, по сравнению с обнаруженными в фракции 2 [1].

В составе фракции 2 показано наличие бициклических монотерпенов (иридоидов). При использовании системы хлороформ — этанол, 25:1, и последующей обработке хроматограммы реактивом Трим — Хилла на ней обнаружено 1 пятно ( $R_f$  0,72), имеющее соответствующую иридоидам розово-сиреневую окраску [21]. Анализ на иридоиды экстракта, полученного при обработке этилацетатом водного извлечения чаги, также показал в нем наличие одного из представителей этого класса [1].

Исследование этилацетатного экстракта чаги с помощью ГХ/МС анализа позволило идентифицировать 6 веществ (рисунок).

Среди липофильных веществ идентифицированы 3 соединения. Вещество 3 — инотодиол (ланоста-8,24-диен-3,22-диол) ( $t_r$  17,10, ( $M^+$ ) 355), который ранее обнаружен и в водных извлечениях из чаги [22], и в самом сырье [23], обладающий доказанной противоопухолевой активностью в отношении раковых клеток [24]. Впервые в чаге обнаружены эфир пальмитиновой кислоты ( $t_r$  20,95, ( $M^+$ ) 236) — вещество 4 и 9(11)-дигидроэргостерил бензоат ( $t_r$  26,89, ( $M^+$ ) 498) — вещество 6.

Из фенольных соединений 2 вещества отнесены к классам стильбенов: ( $t_r$  9,61, ( $M^+$ ) 253,08) — вещество 1 и флавонов ( $t_r$  10,90, ( $M^+$ ) 342) — вещество 2. Вещество 5 — производное фенантрена ( $t_r$  22,54, ( $M^+$ ) 316,4). Производное фенантрена и вещество класса стильбенов в чаге обнаружены впервые. Согласно литературным данным [25], идентифицированные вещества обладают противовоспалительными, болеутоляющим свойствами, являются эффективными антиоксидантами, применяются для профилактики рака и лечения сердечно-сосудистой системы.

Таким образом, этилацетатом из чаги удается извлечь около 0,88% экстрактивных веществ, представленных липофильными и фенольными соединениями, обладающими биологической активностью. Показано, что по сравнению с водным извлечением чаги из сырья этилацетатом извлекается в 3 раза больше гидрофобных веществ, и они отличаются по качественному составу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, Г. И. Кьямова и др., *Химия растит. сырья*, № 4, 117 – 122 (2009).
2. М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, В. С. Гамаюрова и др., *Химия растит. сырья*, № 1, 111 – 114 (2008).
3. А. Н. Шиврина, *Продукты биосинтеза высших грибов и их использование*, Москва, Ленинград (1966).
4. *Государственная фармакопея СССР*, вып. 2, Медицина, Москва (1990).

5. *Государственная фармакопея СССР*, вып. 2, Медицина, Москва (1987).
6. М. Н. Запроматов, *Основы биохимии фенольных соединений*, Высшая школа, Москва (1974).
7. Е. В. Бекетов, А. А. Абрамов, О. В. Нестеров и др., *Вестник Москов. универ.*, сер. 2, **46**(4), 259 – 262 (2005).
8. А. А. Лобанова, В. В. Будаева, Г. В. Сакович, *Химия растит. сырья*, № 1, 47 – 52 (2004).
9. Е. Н. Жукович, М. Ю. Семенова, Л. А. Шарикова и др., *Хим.-фарм.журн.* **44**(3), 35 – 37 (2010); *Pharm. Chem. J.*, **44**(3), 144 – 146 (2010).
10. Л. В. Антипов, Н. Н. Безрядин, *Физические методы контроля сырья и продуктов в мясной промышленности*, ГИОРД, Санкт-Петербург (2006).
11. М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, В. С. Гамаюрова и др., *Химия растит. сырья*, № 3, 119 – 122 (2008).
12. М. Кейтс, *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов*, Мир, Москва (1975).
13. Э. Шталь, *Хроматография в тонких слоях*, Мир, Москва (1965).
14. С. Е. Северин, Г. А. Соловьева, *Практикум по биохимии*, Изд-во МГУ, Москва (1989).
15. М. М. Анисимова, В. А. Куркин, В. Н. Ежков, *Известия Самарского научного центра РАН*, **1**(8), 2011 – 2014 (2010).
16. Г. Л. Рыжова, С. С. Кравцова, С. А. Магасова, *Хим.-фарм. журн.*, **31**(10), 44 – 47 (1997); *Pharm. Chem. J.*, **31**(10), 551 – 554 (1997).
17. М. А. Бурмасова, М. А. Сысоева, *Химия растит. сырья*, № 1, 149 – 152 (2012).
18. W. Mazurkiewicz, *Acta Polon. Pharm.*, № 67, 397 – 406 (2010).
19. Wei-Fa Zheng, *Mycosystema*, № 27, 575 – 581 (2008).
20. Yu Jin Kim, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, № 54, 287 – 294 (2011).
21. Л. Р. Иванова, Л. И. Бутенко, Л. В. Лигай, *Химия растит. сырья*, № 4, 131 – 133 (2010).
22. А. Н. Шиврина, Е. В. Ловягина, *Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства*, Москва – Ленинград (1965), сс. 59 – 64.
23. R-S. Ludwiczak, U. Wrecino, *Rocz. Chem.*, № 36, 497 – 502 (1962).
24. Е. В. Ловягина, А. Н. Шиврина, *Биохимия*, № 5, 794 – 800 (1962).
25. А. Блажей, Л. Шутый, *Фенольные соединения растительного происхождения*, Мир, Москва (1977).

Поступила 21.08.14

## COMPOSITION OF CHAGA HYDROPHOBIC SUBSTANCES EXTRACTED BY ETHYL ACETATE

G. I. Kuyamova, V. R. Khabibrakhmanova, and M. A. Sysoeva

Kazan National Research Technological University, Kazan, Tatarstan Republic, 420015 Russia

\* e-mail: azulenchik@mail.ru

It is shown that about 0.88% total extractive compounds can be isolated by ethyl acetate from chaga, about 58% of which are lipophilic substances, and the rest part represents phenolic compounds. Tetracyclic triterpenes, sterins and their esters, sesquiterpenes (azulenes), bicyclic monoterpenes (iridoids), phenol-carboxylic acids, simple phenols and flavonoids were identified in the extract. Flavonoid belonging to the class of stilbenes, a phenanthrene derivative, and 9(11)-dihydroergosteril benzoate were discovered in chaga for the first time.

**Keywords:** chaga; ethyl acetate extract; sterins; tetracyclic triterpenes; azulenes; iridoids; flavonoids.