

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИШАЙНИКА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО БИОСЫРЬЯ

¹Аньшакова В.В., ¹Степанова А.В., ¹Смагулова А.Ш.

¹ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск, Россия (677000, Якутск, ул. Кулаковского, 46), e-mail: biotexnologii@bk.ru

В связи с тем, что слоевища лишайников р. *Cladonia* являются ценным биосырьем для получения серии биопрепаратов, используемых в медицине и пищевой промышленности, проведен анализ на содержание ряда токсичных и биогенных элементов, а также радионуклидов ¹³⁷Cs и ⁹⁰Sr в пробах лишайников, взятых в различных районах Республики Саха (Якутия). Показано, что в местах сбора лишайников для последующего биотехнологического передела содержание токсичных элементов, тяжелых металлов и радионуклидов в десятки и сотни раз ниже ПДК для этих элементов в пищевых продуктах. Кроме того в статье представлены аналитические данные об определении некоторых биологически активных веществ в лишайниках.

Ключевые слова: Слоевища лишайников, тяжелые металлы, радионуклиды, биологически активные вещества, хроматография.

CHEMICAL ANALYSIS OF THE LICHEN AS A POTENTIAL BIOLOGICAL RAW MATERIALS

Anshakova V.V.¹, Stepanova A.V.¹, Smagulova A.S.¹

¹North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia (677000, Yakutsk, Kulakovskogost. 46,) e-mail: biotexnologii@bk.ru

Due to the fact that the thallus of the lichen genus *Cladonia* is a valuable raw material for series of biological products used in medicine and food industry, performed analysis on the content of a number of toxic and nutrient elements and ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr radionuclides in lichen samples taken from different areas of the Republic Sakha (Yakutia). It is shown that in the lichens gathering locations (for subsequent biotechnological processing) the content of toxic heavy metals and radionuclides in the tens or hundreds of times below of maximum allowable concentration for these elements in foods. In addition to paper presents analytical data on the determination of some biologically active substances in the lichen.

Keywords: lichen thalli, heavy metals, radionuclides, biologically active substances, chromatography.

Содержание в слоевище лишайников биологически активных веществ (БАВ) обуславливает довольно широкое их использование в официальной и народной медицине для лечения болезней желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, инфекционных заболеваний кожи, эндокринных нарушений, также применение их в качестве иммуномодулирующих, противоопухолевых, гепатопротекторных и детоксикационных препаратов [8, 9]. Несмотря на то, что лишайниковые вещества обладают широким спектром лекарственных свойств, включая противомикробные, противомикотические, противовирусные, противовоспалительные, обезболивающие, жаропонижающие, антипролиферативные и цитотоксические, их терапевтический потенциал еще недостаточно изучен, что сдерживает широкое производство на их основе фармацевтических препаратов и применение в медицине.

Активное вещество биопрепаратов на основе лишайникового сырья, разработанных и производимых в лаборатории механохимических биотехнологий Северо-Восточного федерального университета – лишайниковые β-олигосахариды, способны связывать

различные по природе вредные вещества (тяжелые металлы (ТМ) и радионуклиды, карбонильные соединения и фенолы, молочную кислоту и др. органические соединения) и выводить их из организма[1-4, 6,7].

Вместе с тем, первым требованием, предъявляемым к самому биосырью – слоевищам лишайников – является их экологическая чистота, так как известно, что нативные талломы, произрастающие на площадях загрязненных тяжелыми металлами и/или радионуклидами способны их эффективно сорбировать и накапливать[10].

Целью данной работы является проведение анализа содержания токсичных (Pb, Hg, Cd, Fe, As), биогенных (I, Se, Ca, Mg, P, K, Na, Li) элементов и радионуклидов (^{137}Cs и ^{90}Sr) в талломах лишайников *p. Cladonia* определение некоторых биологически активных веществ методом хроматографии.

Материал и методы исследований

Объектом исследования служили лишайники рода *Cladonia*, произрастающие в ряде районов Якутии, в местах, предполагаемых для сбора лишайникового сырья с целью последующего биотехнологического переработки. Для оценки биобезопасности сырья определяли содержание в них ряда токсичных (в том числе ТМ), биогенных элементов, а также радионуклидов цезия и стронция в Алданском, Мегино-Кангаласском, Верхневилуйском районах и в окрестностях г. Якутска (рис.1).



Рис.1. Районы сбора лишайников в Республике Саха (Якутия)

Содержание радионуклидов цезия и стронция определяли с помощью гамма-бета-спектрометрического комплекса УСК «Гамма плюс» с программным обеспечением «Прогресс» для испытаний проб продовольствия на соответствие требованиям критериев радиационной

безопасности[5].

Лишайниковое сырье, собранное в Анабарском районе, в 150 км севернее п.Сааскылах, анализировалось с использованием метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой.

Поскольку в отечественной фармакопее отсутствует общая статья по определению ТМ в лекарственном растительном сырье, мы брали за основу СанПин 2.3.2. 1078-01 от 14.11.2001/22.03.02.

При исследовании БАВ предварительно был составлен список определяемых соединений для оценки содержания физиологически активных компонентов: арбутин, галловая кислота, коричная кислота, хлорогеновая кислота, кверцетин, рутин, урсоловая кислота, байкалин, байкалеин, кемпферол, лютеолин, скутелларин, дельфинидин, апигенин, изорамнетин, гиперозид. Среди этих веществ имеются флавоноиды, органические кислоты, полифенольные соединения и т.п. Для каждого из перечисленных соединений была проведена оптимизация условий масс-спектрометрического определения для режима тандемного масс-детектирования в режиме регистрации отрицательных ионов. Были подобраны ионные переходы, потенциал декластеризации и энергия соударений в камере столкновений. Также получены спектры хроматограмм в УФ диапазоне (230 – 400 нм). В качестве неподвижной фазы при анализе проб использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом AcclaimRSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм, фирмы «Thermo». При хроматографическом разделении использовали программу градиентного элюирования.

Пробоподготовка заключалась в приготовлении трех различных экстрактов тремя растворителями – метиловым спиртом, этилацетатом и дихлорметаном. Полученные экстракты высушивали в вакуумном роторном испарителе и снова растворяли в 2 мл метилового спирта. Затем экстракты отфильтровали, разбавляя в 10 раз водой. Кроме того, определяли летучие компоненты исследуемого образца методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

В работе использовали газовый хроматомасс-спектрометр GCMS-2010 Ultra фирмы Shimadzu (Япония). Разделение проводили на колонке ZB-5 MS 30м × 0,25 мм, с использованием градиентного режима нагрева: 0-2 мин – 40°C, 2–28 мин 40–300°C, 28-34 мин – 300°C. Сканирование проводили в диапазоне m/z 15–400 Да. Температура инжектора – 250°C, температура источника ионизации –250°C, температура интерфейса –250°C, напряжение на детекторе –400 еВ. Ввод пробы осуществляли в двух режимах: ввод 0.5 мл нагретого (80°C, 10 мин) пара над образцом порошка растительного происхождения с добавкой 1 мл метанола и 1 мкл жидких экстрактов CH₂Cl₂, EtOAc и MeOH из этого порошка, разбавленных в 100 раз в CH₂Cl₂.

Результаты и обсуждение

Полученные данные по содержанию токсичных (Pb, Hg, Cd, Fe, As), биогенных (I, Se, Ca, Mg, P, K, Na, Li) элементов в талломах лишайников *p. Cladonia*, по сравнению с ПДК для соответствующих элементов в пищевых продуктах, представлены на рис.2, по содержанию ^{137}Cs и ^{90}Sr – на рис.3.

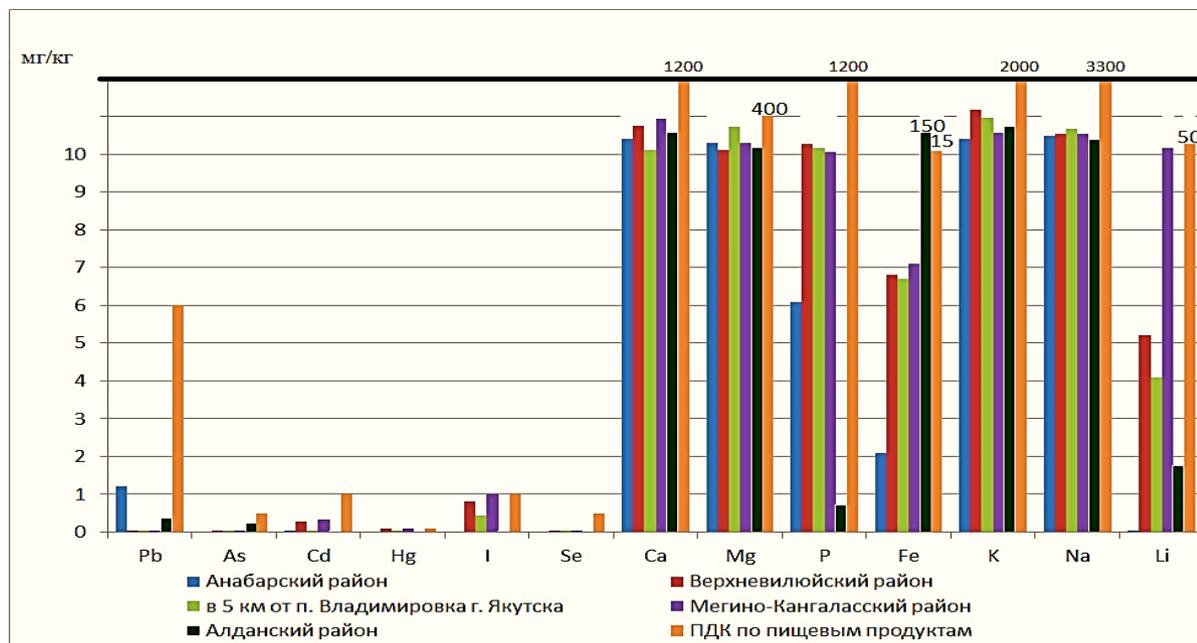


Рис.2. Содержание токсичных (Pb, Hg, Cd, Fe, As), биогенных (I, Se, Ca, Mg, P, K, Na, Li) элементов в пробах слоевищ лишайников *p. Cladonia* взятых в пяти районах Якутии, по сравнению с ПДК

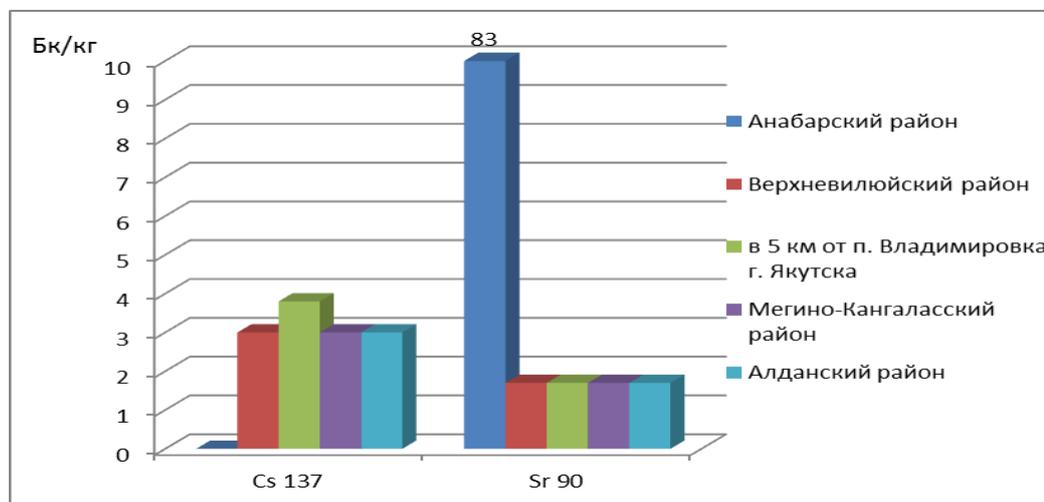


Рис.3. Содержание ^{137}Cs и ^{90}Sr в пробах слоевищ лишайников *p. Cladonia* взятых в четырех районах Якутии. ПДК для цезия 200 Бк/кг, для стронция - 100 Бк/кг

Наибольшее содержание ^{90}Sr - до 83 Бк/кг (ПДК ≤ 100 Бк/кг), отмеченное в Анабарском районе объясняется сбором сырья непосредственно на месте проведения горно-добывающих работ.

В ходе предварительных экспериментов по определению БАВ в образце были обнаружены следующие соединения, которые представлены в таблице 1.

Химические вещества, обнаруженные в экстрактах

| | Содержание в колбе, мкг | | | | | |
|--|-------------------------|-----------|----------|------------------|-------------------|----------------------|
| | Гиперозид | Кверцетин | Лютеолин | Галловая кислота | Урсоловая кислота | Хлорогеновая кислота |
| MeOH экстр. | 0,15 | 0,06 | 0,02 | 16 | 108 | 0,04 |
| EtOAc экстр. | 0,04 | 0,04 | 0,01 | 12 | 9 | 0 |
| CH ₂ Cl ₂ экстр. | <ПО | <ПО | <ПО | <ПО | <ПО | <ПО |

Также в экстрактах присутствовала коричная кислота в следовых количествах. Не найдены арбутин, байкалин, байкалеин, кемпферол, скутелларин, дельфинидин, апигенин, изорамнетин, вогонин, рутин. Однако сопоставление УФ и МС/МС спектров позволяют судить о том, что в данном образце содержатся дополнительные неидентифицированные соединения. Их идентификация требует дополнительных исследований.

Наибольшее извлечение целевых компонентов показал вариант экстракции с использованием метанола (рис. 4).

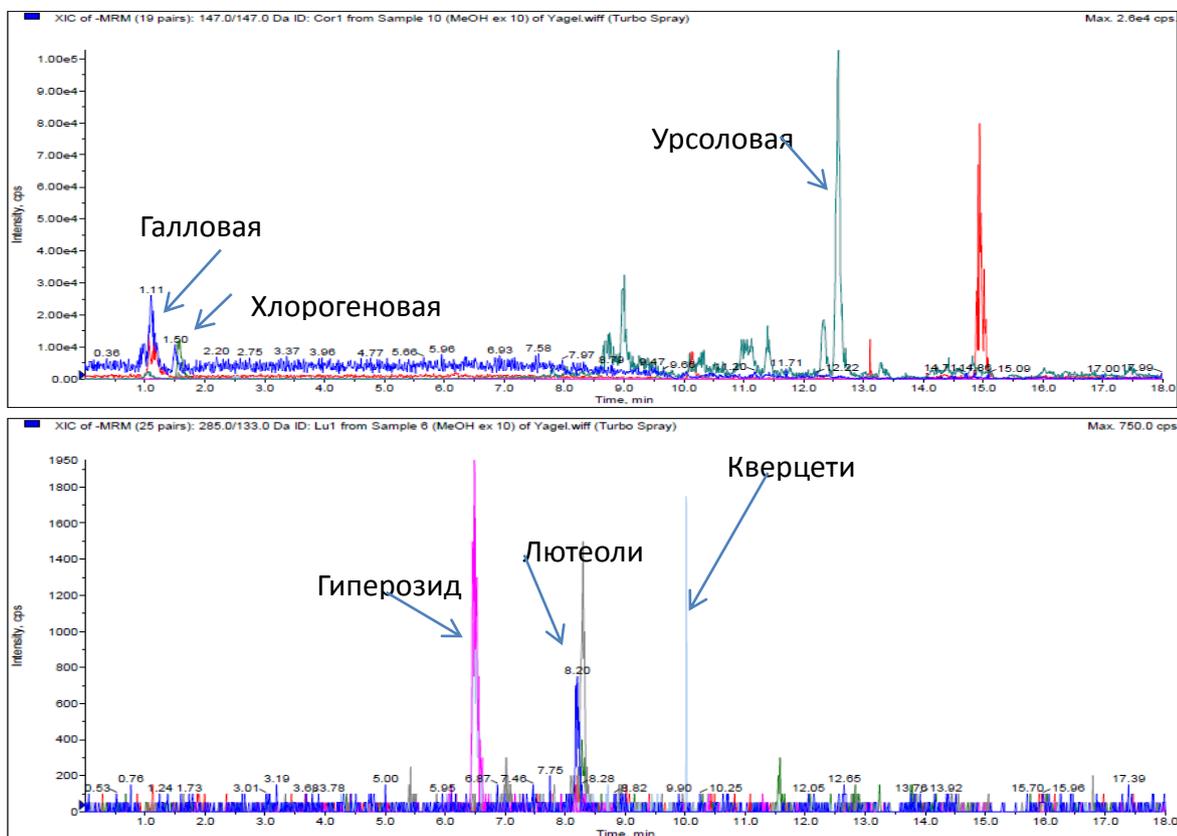


Рис. 4. Хроматограммы MeOH экстракта с извлечением ионных переходов обнаруженных соединений

В экстракте EtOAc было обнаружено сравнительно меньшее число летучих компонентов (около 20). Из них характерными для исследуемого образца являются предельные кислоты и их эфиры. Экстракция CH₂Cl₂ и MeOH позволяет выделить намного больше (около 100) летучих компонентов из исследуемого объекта. Основными компонентами CH₂Cl₂ и MeOH экстрактов являются предельные углеводороды и спирты. Кроме того в CH₂Cl₂ обнаружен ароматический спирт – 2,4-диизобутил-фенола.

Выводы

Результаты исследования свидетельствуют о том, что содержание токсичных элементов и радионуклидов не превышает соответствующих ПДК. Кроме того, лишайники *p. Cladonia* могут служить источником биогенных элементов – особенно Ca, Mg, P, K, Na и микродоз LiI, Se.

Химические ГХ-МС профили исследованных экстрактов типичны для растительных объектов, однако следует отметить отсутствие летучих производных фурана, что косвенно свидетельствует об отсутствии в образце больших количеств моно- и дизамещенных сахаридными остатками органических компонентов. Исследованный образец растительного сырья не содержит больших количеств среднелетучих органических соединений сложной структуры, таких как, например, незамещенные сапонины и сесквитерпены. Перспективы исследования химического состава образца принадлежат методам жидкостной хроматографии, позволяющей идентифицировать и определять нелетучие физиологически активные компоненты. Методом ВЭЖХ-МС в образцах экстрактов обнаружили галловую кислоту, коричную кислоту, хлорогеновую кислоту, кверцетин, рутин, урсоловую кислоту, лютеолин и гиперозид. Однако сопоставление УФ и МС/МС спектров позволяют судить о том, что в данном растении содержатся дополнительные неидентифицированные соединения. Их идентификация требует дополнительных исследований.

Список литературы

1. Аньшакова В.В. Механохимическая технология получения биоконплексов на основе лишайникового сырья // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 3, № 5. – С. 33-42.
2. Аньшакова В.В., Кершенгольц Б.М. Биологически активная добавка актопротекторного, адаптогенного действия из растительного сырья и способ ее получения // Патент России № 2477143 С1. 2011.
3. Аньшакова В.В., Кершенгольц Б.М. Способ получения высокоактивного твердофазного биопрепарата антибиотического действия ЯГЕЛЬ из слоевищ лишайников // Патент России № 2467 063 С1. 2011.

4. Аньшакова В.В., Степанова А.В. Биотехнологическая переработка возобновляемого сырья Якутии // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/108-8860>(дата обращения: 20.09.2014).
5. Радиационный контроль. Стронций-90 и цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка // МУК 2.6.1.717-98. URL: <http://www.opengost.ru> (дата обращения: 20.05.2014).
6. Свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.11.003.Е.003705.05.13, 20.05.2013.
7. Свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.11.003.Е.003704.05.13, 20.05.2013.
8. Соловьева М.И., Кузьмина С.С. Динамика накопления некоторых биологически активных веществ в лишайниках в зависимости от сезона года // Вестник ЯГУ. – 2008. – Т. 5, № 4. – С. 141-143.
9. Чуркина Е.В., Кершенгольц Б.М., Шаройко В.В. Эффект препарата «Ягель» из слоевищ лишайника рода *Cladonia* на секрецию инсулина // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. №2. – С. 67-70.
10. Шиманская Е.И., Бураева Е.А., Вардуни Т.В., Симонович Е.И., Триболина А.Н., Рыбалко Д.А. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №8. – С. 156-157.

Рецензенты:

Охлопкова А.А., д.т.н., профессор, зав. кафедрой "Высокомолекулярные соединения и органическая химия" Института естественных наук ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск.

Николаев А.Н., д.б.н., директор Института естественных наук ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск.