

УДК 547.477.2:582.284.06:543.429.23

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АГАРИЦИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ МИЦЕЛИЯ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL. FR. :) BOND. ET SING.

© А.Ю. Айрапетова^{1*}, Т.И. Громовых²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал Волгоградского государственного медицинского университета, пр. Калинина, 11, Пятигорск, 357532 (Россия), e-mail: asyargfa@mail.ru

²Московский государственный университет пищевых производств, ул. Талалихина, 33, Москва (Россия), E-mail: tigromovykh@rambler.ru

Из мицелия трутовика лекарственного (*Fomitopsis officinalis* (Vill Fr.) Bond. et Sing), полученного твердофазным культивированием, выделена агарициновая кислота и подтверждена ее структура методом ЯМР ¹H и ¹³C спектроскопии в сравнении со стандартным образцом (SIGMA ALDRICH). Способ выделения – экстракция смесью 95%-ный этиловый спирт – хлороформ, упаривание, выдерживание при температуре –5 °С, очистка. С помощью протонного спектра установлена структура неразветвленного алкильного радикала. Спектр ЯМР ¹³C и двумерные корреляционные диаграммы {¹³C, ¹H} показали наличие гидроксильной (2-й четвертичный атом углерода) и трех карбоксильных (1, 2 и 3-й атомы углерода) групп. Спектр выделенного образца идентичен спектру стандартного образца агарициновой кислоты.

Ключевые слова: мицелий трутовика лекарственного, агарициновая кислота, выделение, структура, спектры ЯМР.

Введение

Интерес к высшим базидиомицетам (*Basidiomycetes*) как источникам ценной биомассы, содержащей различные биологически активные вещества, непрерывно возрастает. В связи с этим изучение активных метаболитов базидиомицетов и определение их биологического действия представляют важную задачу.

Один из грибов, относящихся к классу базидиальных грибов, паразитирующих на стволах лиственниц, – лиственничная губка (агарик, трут лекарственный, трутовик лекарственный) – *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond, et Sing. /*Poliporus officinalis* Fries, *Fomes laricis* (Jacq.) Murr/. Основным действующим веществом плодового тела лиственничной губки (*Agaricus albus*) является агарициновая кислота, оказывающая спотворное, успокаивающее, противотуберкулезное, слабительное и кровоостанавливающее действие [1]. Зарубежные исследователи установили, что агарициновая кислота – это соединение, оказывающее разобщающее действие на дыхание и фосфорилирование, улучшающее проницаемость митохондрий путем взаимодействия с адениннуклеотид транслоказой. Установлено, что агарициновая кислота способна ингибировать процессы перекисного окисления липидов [2–4].

Известно, что биологически активные вещества высших грибов содержатся не только в базидиомицетах, но и вегетативном мицелии гриба, получаемого путем жидкофазного и/или твердофазного культивирования. Сбор плодовых тел в природных условиях лимитирован множеством неконтролируемых факторов – сезонность, погодные условия, техногенное загрязнение окружающей среды. Кроме того, слабая экологическая пластичность вида, массовый неконтролируемый сбор плодовых тел трутовика лекарственного

Айрапетова Ася Юрьевна – старший преподаватель кафедры фармацевтической химии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: asyargfa@mail.ru
Громовых Татьяна Ильинична – профессор кафедры биотехнологии, доктор биологических наук, e-mail: tigromovykh@rambler.ru

ведут к исчезновению биологического вида. В связи с этим получение биомассы мицелия с помощью биотехнологии и изучение ее химического состава в сравнении с природными плодовыми телами является важным преимуществом [5].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Цель настоящего исследования – выделение агарициновой кислоты из мицелия, полученного твердофазным культивированием, и изучение ее структуры.

Экспериментальная часть

Для изучения возможности получения мицелия путем твердофазного культивирования в качестве растительных субстратов использовали кору и древесную зелень пихты, листовничные опилки, гидролизный лигнин и зерно злаков. Исходное сырье измельчается на лабораторном измельчителе шнекового типа и методом квартования отбирается средняя проба, которую затем фракционируют на ситах. Для исследований необходимо использовать сырье размером 1,5–2,0 мм, так как очень маленькие частицы упаковываются очень тесно, образуя материал с высокой плотностью и узкими порами, что снижает скорость процесса биодеструкции. После чего одна часть субстратов увлажняется дистиллированной водой, другая – 1% раствором сульфата аммония. Добавление 1% раствора соли NH_4NO_3 в субстрат ингибирует колонизацию субстрата колонией гриба, но мицелий формируется более высокий и плотный. Стерилизация субстратов осуществляется в автоклаве при 1 атмосфере в течение часа дважды.

Инокуляция субстратов проводится агаровым блоком семисуточной культурой продуцента диаметром 8 мм, выращенной на сусло-агаре и переносится в центр чашки Петри с субстратами. Учет результатов проводится измерением диаметра колонии гриба [6].

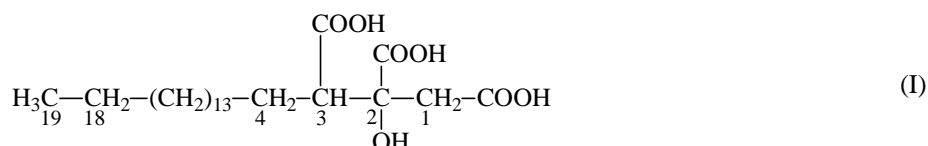
Для выделения агарициновой кислоты использовали мицелий штамма *Tuv-2006 Fomitopsis officinalis*, полученного твердофазным культивированием. Образец мицелия экстрагировали многократно смесью 95%-ный этиловый спирт – хлороформ в аппарате Сокслета. Полученный экстракт упаривали. Отделение агарициновой кислоты проводили выдерживанием экстракта при температуре $-5\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 12 ч с последующим отделением осадка кислоты и его очисткой. Выход агарициновой кислоты составил 5,8% в пересчете на массу сухого мицелия [7].

Подтверждение структуры агарициновой кислоты (I) было проведено с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [8]. Регистрацию ЯМР спектров проводили на спектрометре UNITY-300 «Varian». Для получения спектров ЯМР использовалась стандартная 2-импульсная последовательность с последующим Фурье преобразованием. Химические сдвиги ЯМР сигналов определялись относительно сигнала остаточных протонов соответствующего дейтерорастворителя (DMSO).

Результаты и их обсуждение

Наличие в спектре ЯМР ^1H (рис. 1) трехпротонного триплетного сигнала при 0,86 м.д. однозначно свидетельствует о наличии только одной концевой метильной группы и, следовательно, об отсутствии ветвления алкильного радикала. Сигнал изолированной CH_2 группы в первом положении должен наблюдаться в виде двух дублетов, а сигнал CH_2 группы в четвертом положении – в виде двух мультиплетов вследствие наличия двух хиральных центров при втором и третьем атомах углерода. Действительно, 1- CH_2 группа резонирует при 2,90 и 2,50 м.д., а 4- CH_2 группа – при 1,64 и 1,42 м.д. Протон СН группы в третьем положении представлен дублет-дублетным сигналом из-за наличия спин-спинового взаимодействия с соседней диастереотопной 4- CH_2 группой.

Сигналы остальных CH_2 групп расположены в районе 1,05–1,35 м.д. с общей интегральной интенсивностью, равной $(\text{CH}_2)_{14}$. Таким образом, протонный спектр на первый взгляд соответствует структуре I.



Тем не менее, поскольку спектр регистрировался в диметилсульфоксиде, то сигналы кислых протонов COOH и OH групп не наблюдаются вследствие межмолекулярного обмена с протонами воды, содержащейся в DMSO. Для того чтобы наглядно показать наличие гидроксильной и трех карбоксильных групп были получены спектры ЯМР ^{13}C как с развязкой, так и без развязки от протонов, а также двумерные $\{^{13}\text{C}, ^1\text{H}\}$ корреляционные спектры с использованием констант непрямого спин-спинового взаимодействия $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (HETCOR LR).

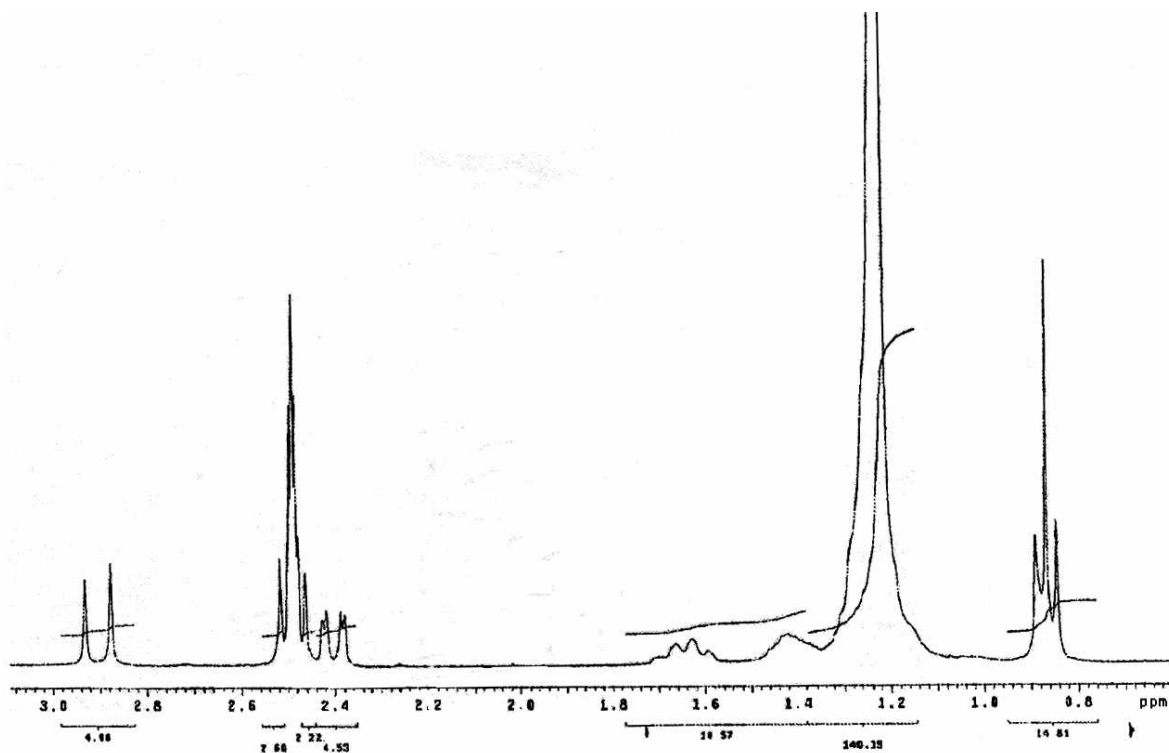


Рис. 1. Спектр ЯМР ^1H агарициновой кислоты в DMSO-d_6

Как следует из анализа спектров ЯМР ^{13}C (рис. 2, 3) и двумерных корреляционных диаграмм (рис. 4, 5), сигналы ядер углерода в районе 171,50–175,00 м.д. принадлежат трем COOH группам: сигнал при 175,50 м.д. относится к углероду 2- COOH (дает кросс-пики с одним из протонов 1- CH_2 группы и 3- CH протоном), при 173,48 м.д. к углероду 3- COOH (кросс-пики с протонами 3- CH и 4- CH_2 групп) и при 171,58 м.д. к углероду группы COOH (триплет в спектре без развязки от протонов и кросс-пики с 1- CH_2 группой в HETCOR LR диаграмме) (рис. 4). Сигнал при 75,02 м.д. однозначно свидетельствует о наличии четвертичного атома углерода 2- COH (наличие в корреляционной диаграмме кросс-пииков с протонами 1- CH_2 и 3- CH групп). Сигнал при 53,57 м.д. принадлежит 3- C ядру (дублет в спектре без развязки с $^1\text{J} = 131,5$ Гц) и сигнал углерода 1- CH_2 группы находится при 40,82 м.д., сигнал CH_3 – при 13,83 м.д., 18- CH_2 – при 22,07, а все оставшиеся CH_2 группы проявляются в районе 22,00–31,30 м.д.

001 13Сууу 80mg DMSO
Pulse Sequence: s2pul

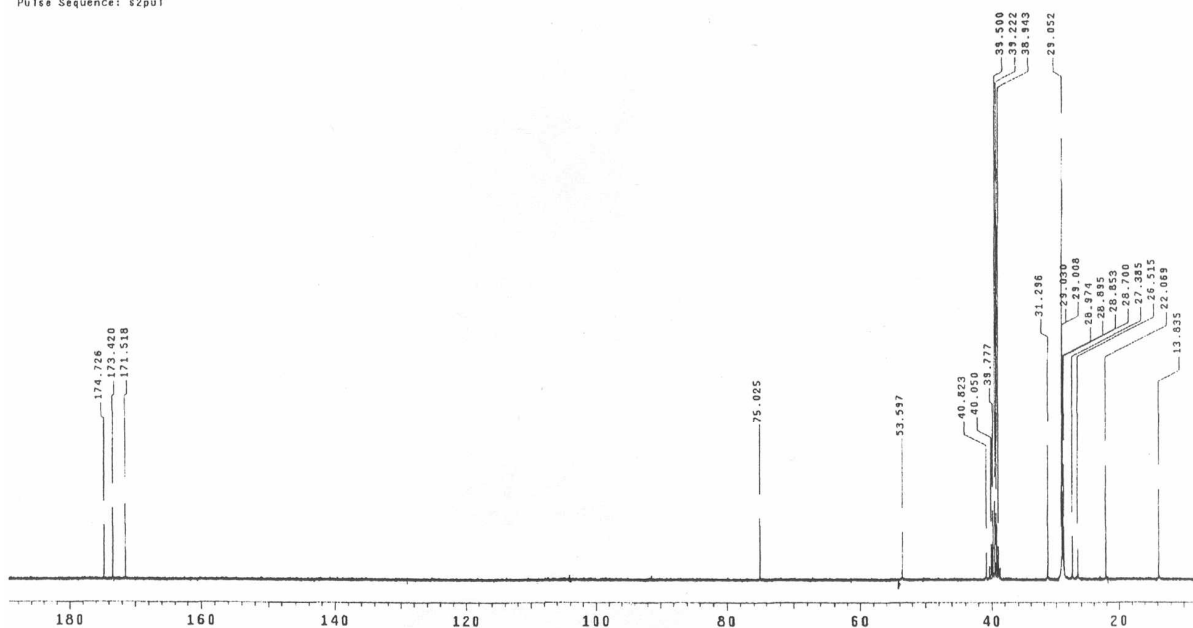


Рис. 2. Спектр ЯМР ^{13}C соединения I с полной развязкой от протонов

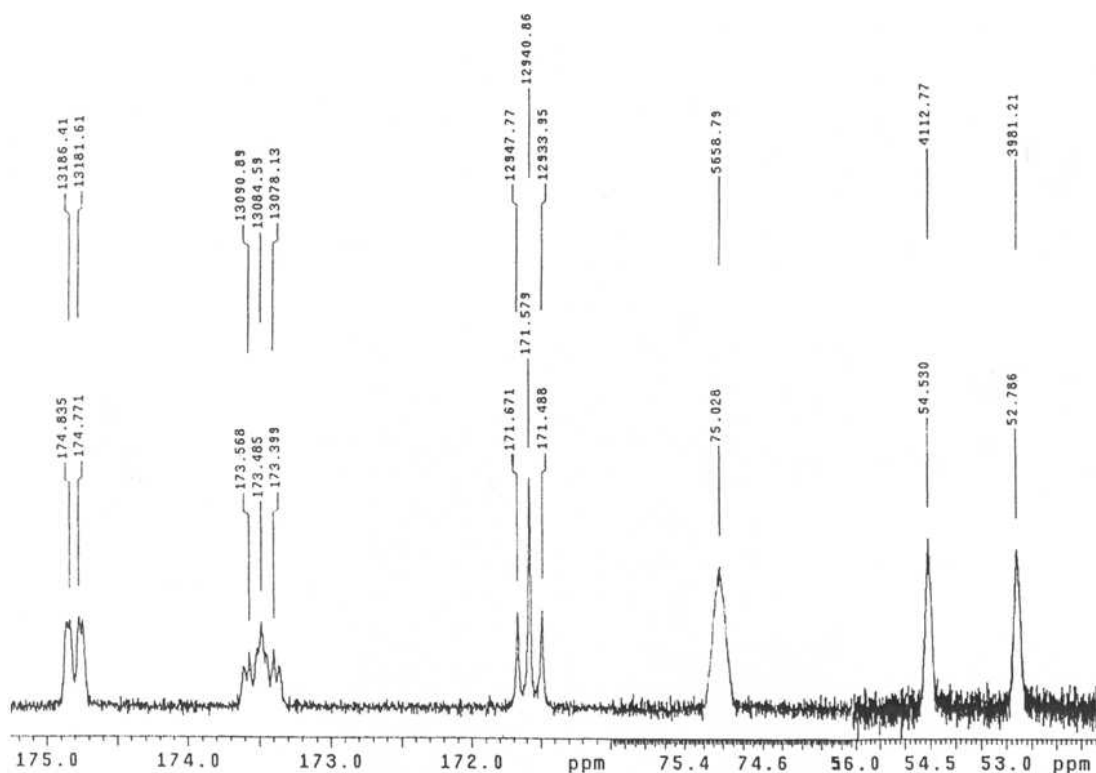


Рис. 3. Спектр ЯМР ^{13}C соединения I без развязки от протонов

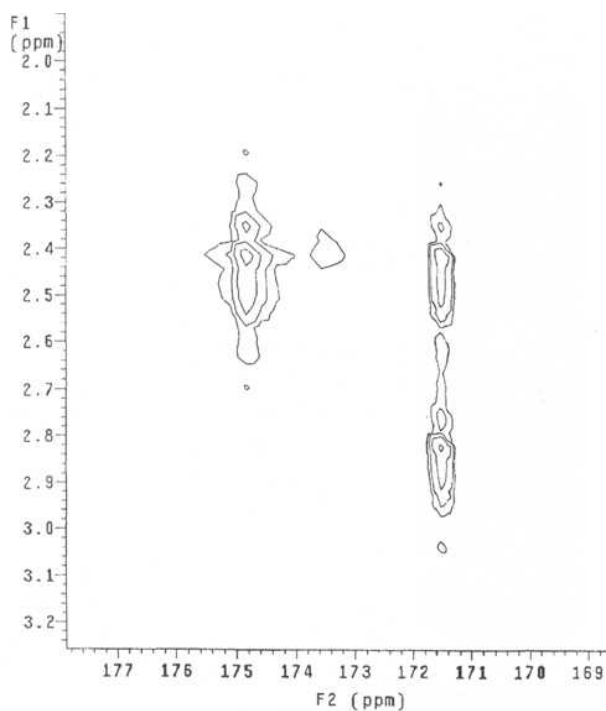


Рис. 4. Корреляционная диаграмма HETCOR LR для сигналов слабопольной части спектра ^{13}C агариковой кислоты

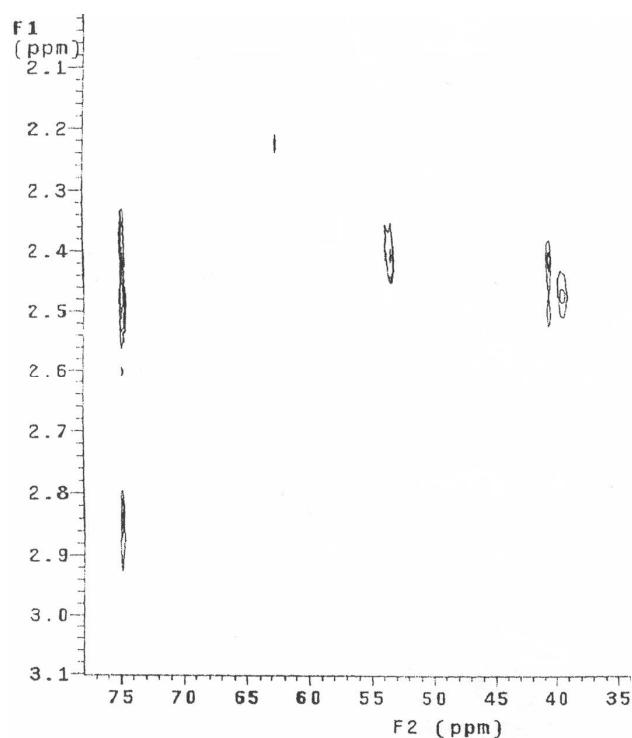


Рис. 5. Корреляционная диаграмма HETCOR LR для сигналов средней части спектра ^{13}C агариковой кислоты

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено наличие агариковой кислоты в образце мицелия штамма *Тув-2006 Fomitopsis officinalis (Vill. Fr.) Bond. et Sing.*, полученного твердофазным культивированием в количестве 5,8%. На основании анализа спектров ЯМР ^1H и ^{13}C полностью подтверждена структура агариковой кислоты, выделенной из вегетативного мицелия, так как спектр стандарта оказался идентичен спектру агариковой кислоты, выделенной из мицелия.

Список литературы

1. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, №2. С. 1–4.
2. Chavez E. The effect of agaric on citrate transport in rat liver mitochondria // Life Sciences. 1978. Vol. 23, N14. Pp. 1423–1429.
3. Garcia N., Zazuete C., Pavon N., Chavez E. Agaric acid induces mitochondrial permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. Its dependence on membrane fluidity // Mitochondrion. 2005. N5. Pp. 272–281.
4. Сергеева Е.О., Айрапетова А.Ю., Айрапетова К.А. Изучение антиоксидантной активности агарициновой кислоты // Вестник Самарского государственного университета. 2010. №4. С. 2097–2099.
5. Сидоренко М.Л. Биотехнология трутовика лекарственного // Актуальные проблемы технологии живых систем: мат. II междунар. науч.-техн. конф. молодых ученых. Владивосток, 2007. С. 73–76.
6. Громовых Т.И., Ковалева Г.К. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета *Tuv-2006 Fomitopsis officinalis* (Vill. Fr.) Bond. et Sing // Вестник КрасГАУ. 2009. №1. С. 68–75.
7. Патент 2330676 (РФ). Способ получения агарициновой кислоты / А.Ю. Айрапетова, П.А. Цуканова, М.В. Гаврилин, Т.А. Шаталова. 10.08.2008.
8. Хеберлен У., Меринг М. ЯМР высокого разрешения в твердых телах. М., 1980. 325 с.

Поступило в редакцию 5 апреля 2012 г.

После переработки 7 мая 2013 г.

Ayrapetova A.U.^{1*}, *Gromovich T.I.*² AN ISOLATION OF AGARIC ACID FROM THE MYCELIUM OF FOMITOPSIS OFFICINALIS (VILL. FR. :) BOND. ET SING., OBTAINED BY SOLID-PHASE CULTIVATION

¹*Piatigorsky Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of the Volgograd State Medical University, pr. Kalinina, 11, Pyatigorsk, 357532 (Russia), e-mail: asyapgfa@mail.ru*

²*Moscow State University of Food Production, ul. Talalikhina, 33, Moscow (Russia), e-mail: tigromovykh@rambler.ru*

Agaric acid (2-hydroxy-1,2,3-nonadecane tricarboxylic acid) – a biologically active compound is isolated by the extraction with a mixture of ethyl alcohol 95% and chloroform, and subsequent purification of the mycelium of *Fomitopsis officinalis* (Vill Fr.) Bond. et Sing, obtained by solid-phase cultivation. Its content in the mycelium is 5,8%. The study of the structure of the selected sample is performed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The spectra of selected samples and the standard agaric acid (Sigma Aldrich) are completely identical. Consequently, the mycelium *Fomitopsis officinalis*, along with the fruit bodies of tinder, can be used as a source of biologically active compounds, the main of which is agaric acid.

Keywords: *Fomitopsis officinalis* mycelium, agaric acid, isolation, structure, NMR spectra.

* Corresponding author.

References

1. Belova N.V. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2004, vol. 38, no. 2, pp. 1–4. (in Russ.).
2. Chavez E. *Life Sciences*, 1978, vol. 23, no. 14, pp. 1423–1429.
3. Garcia N., Zazuete C., Pavon N., Chavez E. *Mitochondrion*, 2005, no. 5, pp. 272–281.
4. Sergeeva E.O., Airapetova A.Iu., Airapetova K.A. *Vestnik Samarskogo gosudartvennogo universiteta*, 2010, no. 4, pp. 2097–2099. (in Russ.).
5. Sidorenko M.L. *Aktual'nye problemy tekhnologii zhivyykh sistem: materialy II mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoj konferentsii molodykh uchenykh*. [Actual problems of the technology of living systems: Proceedings of the II International Scientific and Technical Conference of Young Scientists.]. Vladivostok, 2007, pp. 73–76. (in Russ.).
6. Gromovykh T.I., Kovaleva G.K. *Vestnik KrasGAU*, 2009, no. 1, pp. 68–75. (in Russ.).
7. Patent 2330676 (RU). 10.08.2008. (in Russ.).
8. Kheberlen U., Mering M. *IaMR vysokogo razresheniia v tverdyykh telakh*. [High-resolution NMR in solids]. Moscow, 1980, 325 p. (in Russ.).

Received April 5, 2012

Revised May 7, 2013