

УДК: 543; 547; 582.29

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЛИШАЙНИКОВ В ДАГЕСТАНЕ

А.Б. Исмаилов¹, А.М. Алиев^{1,2}¹ Горный ботанический сад ДНЦ РАН, РФ, г. Махачкала² Институт физики ДНЦ РАН, РФ, г. Махачкала

i.aziz@mail.ru

Посредством газовой хромато-масс-спектрометрии изучен компонентный состав лишайников *Cladonia gracilis*, *Cl. subrangiformis*, *Xanthoparmelia camtschadalis*, *Cetraria aculeata*, *Flavocetraria nivalis*, *Thamnolia vermicularis*, собранных в Дагестане на высотах около 300 м н.у.м. и 2530 м н.у.м. Всего в компонентном составе шести образцов обнаружено 32 вещества. У высокогорных образцов обнаружено 15 веществ, а из нижних предгорий – 10. Вещества из класса углеводов (11 веществ) обнаружены только в компонентном составе высокогорных образцов. Максимальное количество веществ (13) выявлено у образца *C. subrangiformis*. Основными идентифицированными компонентами являлись: 2,4-дигидрокси-6-метил-бензальдегид (9,5% – *Cl. gracilis*, 3,6% – *Cl. subrangiformis*), 2,5-диметил-3,4-гександиол (29,3% в экстракте *X. camtschadalis*), 2,5-диметилгидрокенон (9,6% – *Cl. gracilis*, 1,6% – *Cl. subrangiformis*), 3-пропионилокситредекан (29,4% – *Cl. subrangiformis*), 6-метил-1-гептанол (24,9% – *F. nivalis*), линолевая кислота (32,5% – *T. vermicularis*, 13% – *C. aculeata*, 10% – *F. nivalis*, 8,5% – *Cl. gracilis*, 1,7% – *Cl. subrangiformis*), аллил н-октиловый эфир (34,9% – *Cl. subrangiformis*), атраровая кислота (57,4% – *Cl. gracilis*, 23,7% – *C. aculeata*, 18,9% – *Cl. subrangiformis*, 4,7% – *T. vermicularis*), пальмитиновая кислота (16% – *X. camtschadalis*, 10% – *T. vermicularis*, 2,5% – *Cl. subrangiformis*), бутилоксиран (21,4% – *X. camtschadalis*), α -пинен (3,2% – *Cl. gracilis*), фталевая кислота (8,1% – *F. nivalis*), стирол (18,2% – *F. nivalis*, 17,6% – *C. aculeata*, 9,4% – *T. vermicularis*, 4,4% – *Cl. gracilis*).

Ключевые слова: лишайники, компонентный состав, хромато-масс-спектрометрия, Дагестан.

THE FIRST RESULTS OF STUDYING OF COMPONENT COMPOSITION OF LICHENS IN DAGESTAN

A.B. Ismailov¹, A.M. Aliev^{1,2}¹ Mountain Botanical Garden of DSC RAS² Institute of Physics of DSC RAS

The component composition of lichens *Cladonia gracilis*, *Cl. subrangiformis*, *Xanthoparmelia camtschadalis*, *Cetraria aculeata*, *Flavocetraria nivalis* and *Thamnolia vermicularis* was studied by means of gas chromatography-mass spectrometry for the first time in Dagestan. The specimens were collected at 300 m a.s.l. (*Cladonia subrangiformis*, *Xanthoparmelia camtschadalis*) and 2530 m a.s.l. (*Cladonia gracilis*, *Cetraria aculeata*, *Flavocetraria nivalis* and *Thamnolia vermicularis*). A total of 32 substances were discovered in the component composition of all specimens. Among them 15 substances inherent only for high-mountainous specimens and 10 substances were detected only in specimens collected from the foothills. Hydrocarbons were detected only in the component composition of the high-mountainous specimens. The maximum of substances (13) were detected in the extract of *Cladonia subrangiformis*. The main identified substances are: 2,4-dihydroxy-6-methyl- benzaldehyde (9,5% in extract of *Cl. gracilis*, 3,6% – *Cl. subrangiformis*), 2,5-dimethyl-3,4-hexanediol (29,3% – *X. camtschadalis*), 2,5-Dimethylhydroquinone (9,6% – *Cl. gracilis*, 1,6% – *Cl. subrangiformis*), 3-Propionyloxytridecane (29,4% – *Cl. subrangiformis*), 6-methyl-1-heptanol (24,9% – *F. nivalis*), Linoleic acid (32,5% – *T. vermicularis*, 13% – *C. aculeata*, 10% – *F. nivalis*, 8,5% – *Cl. gracilis*, 1,7% – *Cl. subrangiformis*), Allyl n-octyl ether (34,9% – *Cl. subrangiformis*),

Atraric acid (57,4% – *Cl. gracilis*, 23,7% – *C. aculeata*, 18,9% – *Cl. subrangiformis*, 4,7% – *T. vermicularis*), Palmitic acid (16% – *X. camtschadalis*, 10% – *T. vermicularis*, 2,5% – *Cl. subrangiformis*), Butyloxirane (21,4% – *X. camtschadalis*), α -Pinene (3,2% – *Cl. gracilis*), Phthalic acid (8,1% – *F. nivalis*), Styrene (18,2% – *F. nivalis*, 17,6% – *C. aculeata*, 9,4% – *T. vermicularis*, 4,4% – *Cl. gracilis*).

Keywords: lichens, component composition, chromatography-mass spectrometry, Dagestan.

Лишайники являются ценным растительным ресурсом и используются в разных целях – как пища, корм, лекарства, красители, специи и т.д. Применение лишайников в медицине основано на содержании в них уникальных и разнообразных биологически активных веществ. В настоящее время более тысячи первичных и вторичных метаболитов известны у лишайников [1]. Большинство этих соединений специфичны лишайникам и лишь немногие встречаются у других грибов или высших растений [2]. Метаболиты лишайников обладают разнообразием биологических действий, включая антибиотическое, болеутоляющее, противовирусное, противовоспалительное, жаропонижающее, антипролиферативное, цитотоксическое и т.д. [1, 3, 4, 5]. В этом контексте исследование разных аспектов биохимии лишайников, в том числе выявление химического состава, становится все более актуальным.

Анализ современной литературы показал, что многие работы посвящены изучению антиоксидантной и антимикробной активности лишайниковых веществ [6–11]; в некоторых работах исследуются изменения химического состава лишайников в зависимости от заселяемого субстрата [12]; часть работ посвящена изучению жирно-кислотного состава лишайников [13–15]; известны работы по изучению влияния стрессовых воздействий на компонентный состав лишайников [16]. Таким образом, круг вопросов, затрагивающих в той или иной степени химию лишайников, довольно разнообразен. Аналогичная нашим исследованиям была проведена работа сербскими учеными. Они изучали компонентный состав некоторых видов лишайников из семейства *Parmeliaceae*, с аспектом на летучих соединениях [17].

Целью нашего исследования являлось изучение компонентного состава некоторых лишайников посредством газовой хромато-масс-спектрометрии. В настоящее время хромато-масс-спектрометрия является одним из основных и наиболее точных методов разделения и идентификации веществ в мире. При этом отличительной особенностью данного метода является быстрота анализа и отсутствие необходимости использования стандартов для определения соединений.

Материал и методика

В качестве образцов был использован свежесобранный материал широко распространенных в Дагестане кустистых напочвенных лишайников из семейства *Cladoniaceae* Zenker – *Cladonia gracilis* (L.) Willd., *Cl. subrangiformis* Sandst., *Icmadophilaceae* Triebel – *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Schaer, *Parmeliaceae* Zenker – *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr., *Flavocetraria nivalis* (L.) Kärnefelt & A.Thell, *Xanthoparmelia camtschadalis* (Ach.) Hale. При этом образцы аридных видов *Cladonia subrangiformis* и *Xanthoparmelia camtschadalis* были взяты с высоты около 300 м н.у.м (Талгинское ущелье), а арктоальпийские лишайники *Cetraria aculeata*, *Flavocetraria nivalis*, *Thamnolia vermicularis* и бореальный *Cladonia gracilis* – с 2530 м н.у.м в окрестностях с. Талух, Чародинского района. Для исключения потери летучих компонентов из лишайников сразу после сбора в природе их измельчали и помещали в колбы с гексаном и настаивали в течение 20 дней, далее 1 мл отфильтрованной пробы вводили в прибор и определяли его компонентный состав методом хромато-масс-спектрометрии на приборе Shimadzu GCMS-QP2010plus на колонке Supelco SLB™-5ms (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) в режиме «split». В качестве газа-носителя использовался гелий чистотой 99,9999% в режиме стабилизации потока скоростью 1 мл/мин. Температуру колонки поднимали от 60 °C (выдержка 4 мин) до 150 °C со скоростью 10 °C/мин, далее до 250 °C со скоростью 5 °C/мин. Температура инжектора, ин-

терфейса и детектора были 250 °С. Ионизация электронным ударом с энергией электронов 70 эВ. Ток эмиссии катода 150 мкА, диапазон регистрируемых ионов с m/z 45-500. Идентификация компонентов проводилась с использованием библиотек масс-спектров NIST08 и FFNSC. 1 мкл разведенной пробы вводился в прибор с делением потока 1:40.

Результаты и их обсуждение

Всего в компонентном составе экстрактов 6 образцов обнаружено 32 вещества, среди которых мажорными являлись 15 веществ (см. табл.). Наибольшее количество компонентов (13) выявлено в экстракте образца *Cladonia subrangiformis*. Меньше всего веществ (5) обнаружено в экстракте образца *Xanthoparmelia camtschadalis*.

Так у образца *Cladonia subrangiformis* пиковые значения на хроматограмме (см. рис.) соответствуют веществам аллил *n*-октиловый эфир, атраровая кислота, 3-пропионилокситридекан. В экстрактах образцов *Xanthoparmelia camtschadalis* и *Cetraria aculeata* (см. рис.) мажорных веществ выявлено не было, но в общем списке веществ преобладают 2,5-диметил-3,4-гександиол – для первого и атраровая кислота – для второго. У вида *Thamnia vermicularis* (см. рис.) мажорным веществом оказалась линолевая кислота. Определенную долю занимает пальмитиновая кислота и стирол (см. табл.).

Таблица. Компонентный состав экстрактов лишайников
Table. Component composition of extracts of lichens

Высота (м н.у.м) Вид	<300 м		2530 м			
	<i>Cladonia subrangiformis</i>	<i>Xanthoparmelia camtschadalis</i>	<i>Cetraria aculeata</i>	<i>Cladonia gracilis</i>	<i>Flavocetraria nivalis</i>	<i>Thamnia vermicularis</i>
Название вещества	Выход, %					
1-гексадеканол	0,89	—	—	—	—	—
2,4-дигидрокси-6-метил-бензальдегид	3,62	—	—	9,51*	—	—
2,5-диметил-3,4-гександиол	—	29,32*	—	—	—	—
2,5-диметилгидрохинон	1,65	—	—	9,67*	—	—
3-гексанол	0,76	14,54	10,33	—	6,08	—
3-пропионилокситридекан	29,43*	—	—	—	—	—
4,8-диметил-1-нонанол	1,54	—	—	—	—	—
4-метил-3-гексанол	—	18,73	—	—	—	—
6-метил-1-гептанол	—	—	—	—	24,99*	—
9-тетрадеканаль	0,98	—	—	—	—	—
Z,Z-8,10-Гексацикадиен-1-ол	—	—	—	—	—	7,28
Аллил <i>n</i> -октиловый эфир	34,92*	—	—	—	—	—
Альфа-пинен	—	—	—	3,21	—	—
Атраровая кислота	18,99*	—	23,77*	57,49*	—	4,72
Бутилоксиран	—	21,41	—	—	—	—
Гексадекан	—	—	—	—	6,32	5,66
Генэйкозан	—	—	—	—	—	5,67
Додекан	—	—	—	—	5,40	—
Линолевая кислота	1,79	—	13,00	8,53*	10,04*	32,15*
<i>n</i> -Гептадекан	—	—	—	—	8,92	—
<i>n</i> -Додекан	—	—	—	1,42	—	—
<i>n</i> -Нонадекан	—	—	—	1,83	—	—
<i>n</i> -Октадекан	—	—	12,39	2,08	4,18	7,92
<i>n</i> -Тетрадекан	—	—	9,68	1,77	—	5,88
<i>n</i> -Тетрадеканаль	—	—	13,54	—	—	—
<i>n</i> -Эйкозан	—	—	—	—	7,68	6,76
Октиловый эфир пента-новой кислоты	1,67	—	—	—	—	—

Пальмитиновая кислота	2,51	16,00	—	—	—	10,03*
Стирол	—	—	17,69	4,49	18,22*	9,47*
Тетрагидро-2-метил-3-пропил-2Н-тиопиран	1,25	—	—	—	—	—
Тридекан	—	—	—	—	—	4,46
Фталевая кислота	—	—	—	—	8,17	—
Всего веществ	13	5	7	10	10	11

*Примечание: Отмеченные вещества соответствуют пиковым значениям на рисунке.

*Note: Selected substances correspond to peak values in the figure.

У лишайника *Flavocetraria nivalis* к мажорным веществам относятся 6-метил-1-гептанол, линолевая кислота, стирол. А в экстракте *Cladonia gracilis* в качестве мажорного вещества, с долей в 57%, выступает атраровая кислота. Некоторые авторы предполагают, что атраровая кислота обладает антиандрогенной активностью в организме человека [18]. Здесь также было обнаружено вещество альфа-пинен, не встреченное у других образцов. Альфа-пинен является углеводородом из класса терпенов (монотерпен) и обладает рядом полезных свойств – антибактериальное и противогрибковое действие, оказывает антимуtagenный эффект, предупреждает мутации, вызванные УФ-излучением, входит в состав многих парфюмерных изделий.

Было отмечено, что такие вещества, как стирол и октадекан, обнаружены только в высокогорных лишайниках. При этом стирол входит в состав мажорных веществ у двух видов лишайников – *Flavocetraria nivalis* и *Thamnolia vermicularis*.

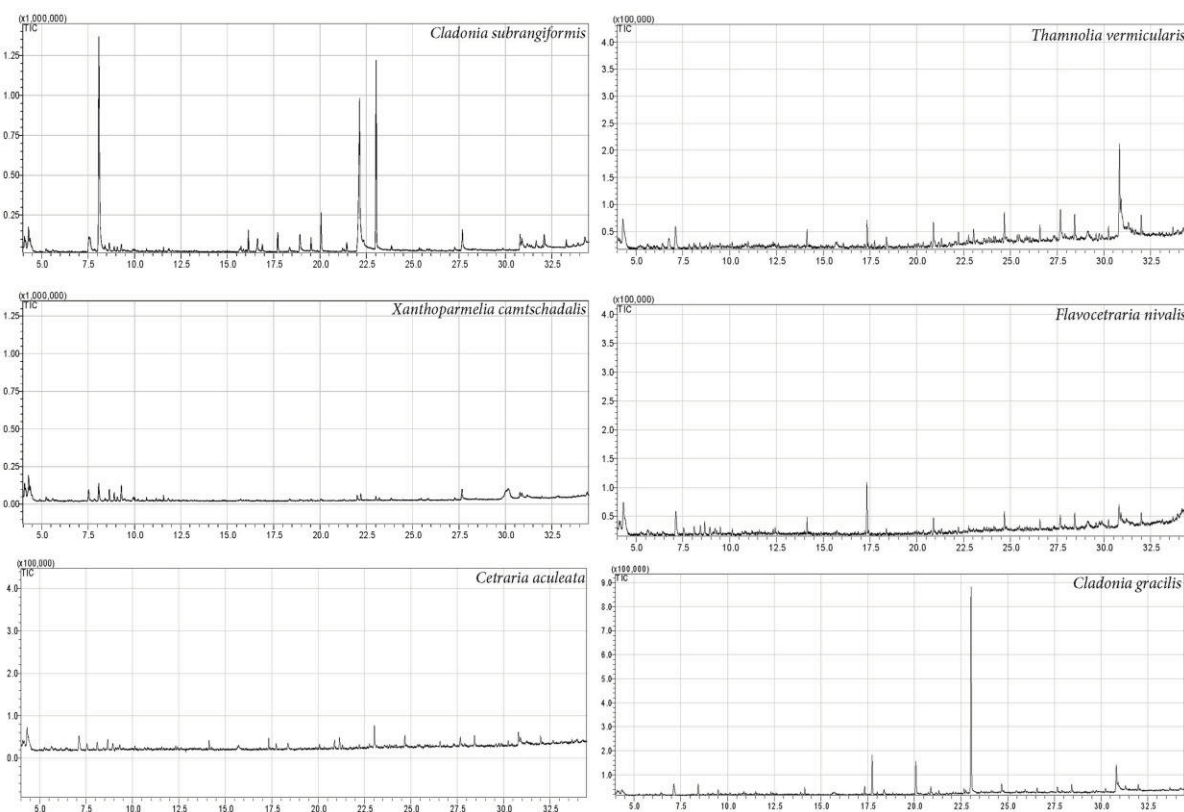


Рис. Хроматограммы изученных образцов.
Fig. Chromatograms of the studied samples.

Стирол широко используется в промышленности для производства полимеров. Возможно физические свойства этих углеводородов, такие как высокая температура кипения (>145°C) и гидрофобность, каким-то образом реализованы в высокогорных лишайниках для борьбы с солнечной радиацией (чрезмерным нагреванием) и препятствия насыщению сердцевины водой для нормального газообмена. Данное предположение требует дальнейших исследований.

У пяти образцов в экстрактах обнаружена линолевая кислота, при этом у трех образцов (*Cladonia gracilis*, *Flavocetraria nivalis*, *Thamnolia vermicularis*) она являлась мажорным веществом. Не оказалось ее только у образца *Xanthoparmelia camtschadalis*. Линолевая кислота относится к классу карбоновых кислот, является незаменимой жирной кислотой, которая важна для нормального функционирования клеточных и субклеточных мембран. Помимо стирола и октадекана, о которых говорилось выше, у четырех из шести образцов обнаружены атраровая кислота и 3-гексанол.

Интересен факт, что все обнаруженные углеводороды из класса алканов, алкенов и аренов (альфа-пинен, генэйкозан, гептадекан, гексадекан, додекан, нонадекан, стирол, тетрадекан, тридекан, эйкозан), были выявлены только у высокогорных лишайников, что, предположительно, указывает на некоторую зависимость в наличии этих соединений в талломах лишайников от высоты над уровнем моря. В целом, разница в компонентном составе изученных образцов прослеживается по веществам из класса спиртов, что, вероятно, связано со спецификой метаболизма у каждого вида.

Выводы

Впервые изучен компонентный состав экстрактов лишайников, собранных в Дагестане. Посредством хромато-масс-спектрометрии обнаружено 32 вещества. Наибольший выход отмечен по следующим веществам: атраровая кислота (*Cladonia gracilis* – 57,5%), линолевая кислота (*Thamnolia vermicularis* – 32,1%), аллил н-октиловый эфир (*Cladonia subrangiformis* – 34,9%).

Углеводороды обнаружены только в компонентном составе экстрактов высокогорных образцов лишайников. При этом большая их часть (7 из 13) выявлена у арктоальпийских лишайников *Flavocetraria nivalis* и *Thamnolia vermicularis*. Карбоновые кислоты выступают в качестве мажорных веществ в экстрактах высокогорных образцов, но как компоненты обнаружены и в других образцах. Вещества из класса альдегидов найдены у трех образцов, два из которых – высокогорные. Спирты и фенолы отмечены практически у всех образцов, но более разнообразными веществами данные соединения представлены в экстрактах лишайников, собранных не в высокогорьях. Эфиры выявлены во всех образцах; наибольшее количество веществ из класса эфиров обнаружено у вида *Cladonia subrangiformis*.

Благодарности

Часть работы первого автора выполнена в рамках гранта РФФИ № 15-29-02396.

Работа выполнена с использованием уникальных научных установок ГорБС ДНЦ РАН «Система экспериментальных баз, расположенных вдоль высотного градиента» и «Коллекция живых растений открытого грунта».

Литература (References)

1. Shukla V., Joshi G., Rawat M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds. *Phytochemistry reviews*, 2010. Vol. 9, No. 2. P. 303–314.
2. Elix J., Stocker-Wörgötter E. Biochemistry and secondary metabolites. In T.H. Nash III. *Lichen biology*. 2nd ed. Cambridge: Univ. Press, 2008. P. 104–133.
3. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 1999. Vol. 86. No. 12. P. 559–570.
4. Manojlović N., Solujić S., Sukdolak S. Antimicrobial activity of extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeereri*. *Lichenologist*, 2002. Vol. 34, No. 1. P. 83–85.
5. Manojlović N., Vasiljević P., Jusković M., Najman S., Janković S., Milenković-Andjelković A. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen *Thamnolia vermicularis* var.

- subuliformis*. Journal of Medicinal Plants Research, 2010. Vol. 4. P. 817–823.
6. Türk A., Yılmaz M., Kıvanç M., Türk H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. Zeitschrift für Naturforschung, Section C – Journal of Biosciences, 2003. Vol. 58, No. 11–12. P. 850–854.
 7. Tay T., Türk A., Yılmaz M., Türk H., Kıvanç M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. Zeitschrift für Naturforschung, Section C – Journal of Biosciences, 2004. Vol. 59, No. 5–6. P. 384–388.
 8. Gulluce M., Aslan A., Sokmen M., Sahin F., Adiguzel A., Agar G., Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine, 2006. Vol. 13, No. 7. P. 515–521.
 9. Ranković B., Mišić M., Sukdolac S. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa* and *Umbilicaria cylindrica*. Microbiology, 2007. Vol. 76, No. 6. P. 723–727.
 10. Manojlović N., Vasiljević P., Masković P., Jusković M., Bogdanović-Dusanović G. 2012. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (*Umbilicariaceae*). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012. Vol. 2012. Article ID 452431. P. 8.
 11. Kosanić M., Ranković B., Stanojković T., Rančić A., Manojlović N. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. LWT – Food Science and Technology, 2014. Vol. 59, No. 1. P. 518–525.
 12. Temina M., Levitsky D., Dembitsky V. Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema*. Record of Natural Products, 2010. Vol. 4, No. 1. P. 79–86.
 13. Dembitsky V., Rezanka T., Bychek I., Shustov M. Identification of fatty acids from *Cladonia* lichens. Phytochemistry, 1991. Vol. 30, No. 12. P. 4015–4018.
 14. Dembitsky V., Rezanka T., Bychek I. 1992. Fatty acid composition of *Parmelia* lichens. Phytochemistry, 1992. Vol. 31, No. 3. P. 841–843.
 15. Dembitsky V. Lipids of lichens. Progress in Lipid Research, 1992. Vol. 31, No. 4. P. 373–397.
 16. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Sloboda A.A., Boytsova T.A., Gagushkina A.A., Valchuk N.A. The influence of stress factors on the chemical composition of lichens genus *Cladonia* of Euroarctic region. Uspechi Sovrem. Estestv. Khimich. Nauki. 2016. P. 20–24 (In Russian). Бровко О.С., Паламарчук И.А., Слобода А.А., Бойцова Т.А., Гагушкина А.А., Вальчук Н.А. Влияние стрессовых воздействий на компонентный состав лишайников рода *Cladonia* Евроарктического региона // Успехи современного естествознания. Химические науки. 2016. № 8. С. 20–24.
 17. Stojanović I., Radulović N., Mitrović T., Stamenković S., Stojanović G. Volatile constituents of selected *Parmeliaceae* lichens. Journal of the Serbian Chemical Society, 2011. Vol. 76, No. 7. P. 987–994.
 18. Buss A., Butler M. Natural product chemistry for drug discovery. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2010. 440 p.