

ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСТРАКТАХ ЯГЕЛЯ (*CLADONIA RANGIFERINA*) МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ И ЕЁ ВЛИЯНИЕ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*)*

Кондратьев В.Д., Лоскутов С.И., канд. с.-х. наук, Сорокоумов П.Н., Костин А.А., канд. хим. наук, Ситнов В.Ю., Рябухин Д.С., канд. хим. наук
ВНИИПД – филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: природные антибиотики, усниновая кислота, обращенно-фазовая ВЭЖХ, УФ-детектирование, гуминовая суспензия, горох

Аннотация

Предложена оптимизированная методика количественного определения усниновой кислоты в экстрактах лишайника (*Cladonia rangiferina*) с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. На примере гороха (*Pisum Sativum L.*) рассмотрено влияние усниновой кислоты и гуминовой суспензии на скорость прорастания семян.

Введение

В настоящее время одним из ведущих направлений науки является использование природных метаболитов в качестве исходных соединений для создания инновационных биологически активных агентов. Поиск новых потенциальных источников антибиотиков привлекает всё большее внимание в свете множественного роста резистентности микроорганизмов к существующим препаратам [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. В данном контексте лишайники являются перспективным сырьевым ресурсом, так как содержат уникальную для данной группы организмов усниновую кислоту, выступающую в качестве антибиотика, антимикотика, фитотоксина и УФ-фильтра [2]. В настоящее время лишайники используют в качестве природных пигментов, в парфюмерии, в декоративном украшении, а также в пищевых и медицинских целях [8].

Усниновая кислота является наиболее распространённым вторичным метаболитом микобионта лишайника, она существует в форме двух энантиомеров, различающихся ориентацией метильной группы в положении 9b (рисунк 1) [3]. Обе формы усниновой кислоты обладают высокой эффективностью против грамположительных штаммов, независимо от их фенотипа. Особое значение имеет ингибирование роста мультирезистентных штаммов стрептококков, энтерококков, стафилококков и микобактерий [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].



Правовращающий энантиомер (+)-усниновой кислоты, селективен в отношении *Streptococcus mutans*, приводящих к возникновению кариеса, не вызывая побочных эффектов на флору сапрофитов полости рта. Левовращающий энантиомер (-)-усниновой кислоты является селективным природным гербицидом из-за его блокирующего действия против ключевых ферментов растений [1].

OPTIMIZATION OF DETERMINATION OF USNIC ACID IN LICHEN EXTRACTS (*CLADONIA RANGIFERINA*) BY REVERSED-PHASE HPLC AND ITS INFLUENCE ON GERMINATION OF PEA SEEDS (*PISUM SATIVUM L.*)

Kondratyev V.D., Loskutov S.I., Sorokoumov P.N., Kostin A.A., Sitnov V.Y., Ryabukhin D.S.
VNIIPD – branch of Gorbatov Research Center for Food Systems

Key words: natural antibiotics, usnic acid, reversed-phase HPLC, PDA-detector, humic acid suspensions, peas

Abstract

An optimized method for the quantitative determination of usnic acid in extracts of lichen (*Cladonia rangiferina*) using reversed-phase high-performance liquid chromatography is proposed. Using peas (*Pisum Sativum L.*) as an example, the influence of usnic acid and humic suspension on the rate of seed germination is considered.

Показано существование химически опосредованного воздействия лишайников на ранний рост сосны обыкновенной, а также их влияние на доступность питательных веществ в почве, что является ключевым механизмом, с помощью которого лишайники могут способствовать самовосстановлению открытых лесных массивов в бореальных лесах с закрытой кроной [9].

Основной проблемой использования усниновой кислоты является сложность культивирования лишайников. Особенно велико её содержание в таких родах лишайников, как *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Lecanora*, *Ramalina*, и *Usnea* [10]. Так же сюда можно добавить и различное содержание кислоты в зависимости от вида и возраста организма. Следует особо отметить небольшой выход готового продукта после экстракции [1]. В связи с этим особую важность приобретает оптимизация количественного определения усниновой кислоты в экстрактах лишайников для определения подходящих условий культивирования и обработки сырьевого материала. В рамках решения данной задачи была разработана и оптимизирована методика количественного определения усниновой кислоты в экстрактах лишайников методом ВЭЖХ. Исследована энергия прорастания семян гороха в растворе (+)-усниновой кислоты для определения активирующего воздействия на развитие растения.

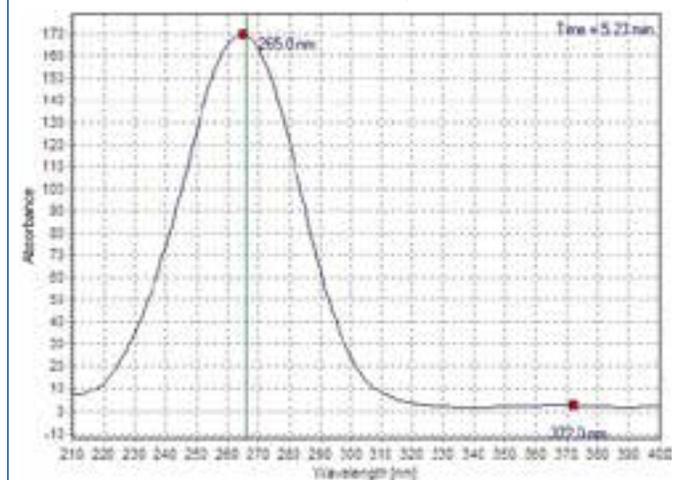
Материалы и методы

Экстракцию усниновой кислоты проводили в аппарате Сокслета. Взвешенный и размолотый сухой образец лишайника экстрагировали хлороформом в течение 6 часов. Органический растворитель упарили на ротормном испарителе в вакууме, получили сиропобразный экстракт жёлто-зелёного цвета.

Хроматографический анализ проводился на жидкостном хроматографе Varian 920-LC с использованием колонки Intersil ODS-3, 4,6 x 250 мм, размер частиц сорбента 5 мкм в условиях изократического элюирования смесью вода: ацетонитрил – 90:10 при температуре 30 °С. Для определения аналита использовали диодно-матричный детектор. В качестве стандарта использовали раствор D-усниновой кислоты (MPBiomedical, USA, № 30569) в CHCl₃. Детектирование проводилось в максимуме поглощения стандарта усниновой кислоты на длине волны 265 нм, определённой экспериментально (рисунк 2).

Растительным объектом для исследований был выбран генотип гороха посевного (*Pisum sativum L.*) сорт Альфа.

Рисунок 2.
Спектр поглощения стандарта усниновой кислоты



Перед постановкой опыта для поверхностной элиминации все семена гороха были обработаны концентрированной серной кислотой (H_2SO_4) в течение 10 мин и затем тщательно промыты дистиллированной водой. Стерилизованные таким образом семена по 15 штук разложены на обеззоленные влажные фильтры, помещённые в стерильные пластиковые чашки Петри с системой аэрации. После этого в чашки доливали 20 мл 1% гуминовой суспензии (ГС) или 1% усниновую кислоту, закрывали крышками и оставляли на свету при комнатной температуре (22–24 °C). Контролем служили чашки с дистиллированной водой. На каждый из вариантов приходилось по 3 повторности (45 семян). Общая продолжительность эксперимента составила 5 суток.

Обработку полученных данных производили с помощью статистической системы PAST (версия 3.25) для Windows.

Результаты и обсуждения

Для количественного определения была построена градуировочная зависимость с концентрациями усниновой кислоты 5, 25, 50 и 100 мкг/мл (рисунок 3). Все четыре точки градуировочной зависимости соответствуют уравнению линейной регрессии с параметрами: $a = 0.7423 \pm 0.008$, $b = 0$, $R = 0.9926$,

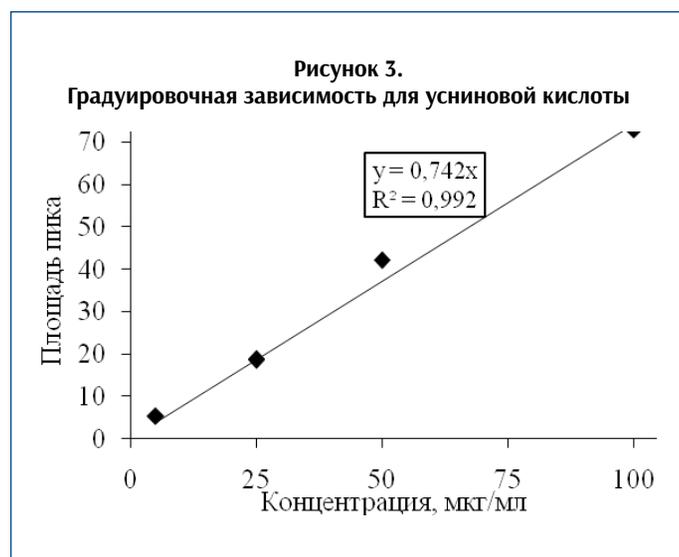


Рисунок 3.

Градуировочная зависимость для усниновой кислоты

$S_0 = 0.019$. Дальнейшая идентификация вещества в пробе проводилась согласно времени удерживания стандарта кислоты ($t_r = 5.4$ мин).

Анализируемая проба, предположительно, содержащая целевое соединение, представляла собой смесь, полученную многократной экстракцией из предварительно высушенной и измельчённой *Cladonia rangiferina* в $CHCl_3$. Перед непосредственным проведением анализа экстракт дополнительно отфильтровали. Условия анализа были идентичны использованным при анализе градуировочных растворов. Полученная хроматограмма представлена на рисунке 4. Таким образом, предложенная методика обеспечивает достаточное разделение компонентов экстракта для идентификации сигнала аналита и позволяет проводить количественное определение усниновой кислоты в экстрактах лишайников.

Далее исследовали прорастание семян гороха, обработанного усниновой кислотой и гуминовой суспензией после стерилизации их серной кислотой. Используемые в работе гуминовые соединения обладают высокой физиологической активностью, заключающейся в широком спектре стимулирующих процессов в организме растений на всех этапах – прорастание семян, образования корневой системы, рост и развитие растения. К достоинствам гуматов можно отнести отсутствие канцерогенности, токсичности и мутагенных действий.

У всех семян гороха, выращенных на усниновой кислоте, происходило ингибирование роста корней, в отличие от контроля и гуминовой суспензии. Эффект проявился уже на точке роста – через двое суток (рисунок 5).

Проращивание семян на среде с гуминовыми веществами и контролем показали незначительную прибавку по энергии прорастания, но равноценно увеличили общую длину корней, в сравнении с действием усниновой кислоты (таблица 1).

На основе полученных данных можно сделать вывод, что усниновая кислота по отношению к семенам гороха проявляет себя больше как гербицид.

Начатое исследование будет продолжено на более широком количестве тест-культур разных видов и в более продолжительном периоде исследования с совместным использованием микробиологических препаратов, для выявления особенностей откликов и оптимизации условий проведения испытаний с усниновой кислотой.

Рисунок 4.
Хроматограмма анализируемой пробы усниновой кислоты

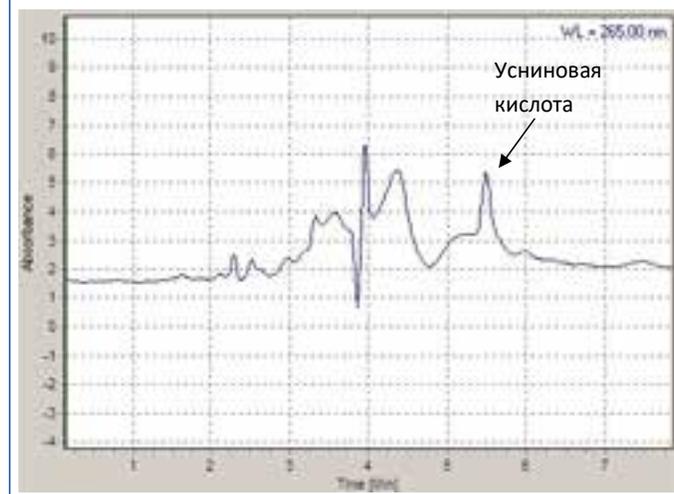


Рисунок 5. Развитие корней семян гороха на вторые сутки роста
(а – контроль; b – 1% гуминовая суспензия; с – 1% усиновая кислота)

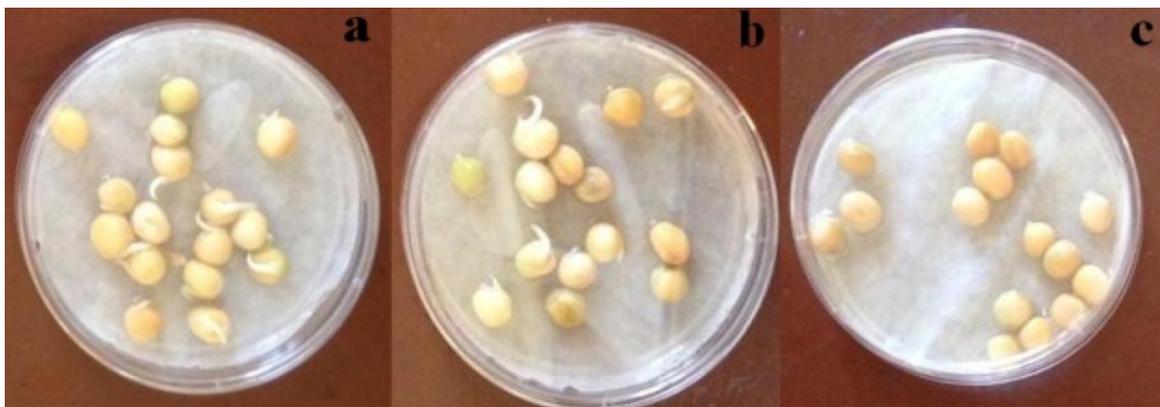


Таблица 1

Влияние различных питательных сред на прорастание семян (5 сутки)

Вариант / Культура	Контроль		1% гуминовая суспензия		1% усиновая кислота	
	Энергия прорастания, %	Длина корня, см	Энергия прорастания, %	Длина корня, см	Энергия прорастания, %	Длина корня, см
<i>Pisum sativum</i> L.	67	1.5	67	2.1	0	0

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Cocchietto, M. A review on usnic acid, an interesting natural compound / M. Cocchietto, N. Skert, P. Nimis, G. Sava // *Naturwissenschaften*. – 2002. – V. 89. – № 4. – P. 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0305-3>
- Molnár, K. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review / K. Molnár, E. Farkas // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2010. – V. 65. – № 3–4. – P. 157–173. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>
- Kinoshita, Y. Distribution of optical isomers of usnic and isousnic acids analyzed by high performance liquid chromatography / Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, I. Yoshimura, T. Kurokawa, S. Huneck // *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. – 1997. – V. 83. – P. 173–178.
- Lauterwein, M. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (–)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms / M. Lauterwein, M. Oethinger, K. Belsner, T. Peters, R. Marre // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1995. – V. 39. – № 11. – P. 2541–2543. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2541>
- Francolini, I. Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces / I. Francolini, P. Norris, A. Piozzi, G. Donelli, P. Stoodley // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – V. 48. – № 11. P. 4360–4365. <https://doi.org/10.1128/aac.48.11.4360-4365.2004>
- Elo, H. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / H. Elo, J. Matikainen, E. Peltari // *Naturwissenschaften*. – 2007. – V. 94. – № 6. – P. 465–468. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0208-9>
- Соколов, Д.Н. Усиновая кислота: получение, строение, свойства и химические превращения / Д.Н. Соколов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов // *Успехи химии*. – 2012. – Т. 81. – № 8. – С. 747–768. <https://doi.org/10.1070/rc2012v081n08abeh004245>
- Sokolov, D.N., Usnic acid: Preparation, structure, properties and chemical transformations / D.N. Sokolov, O.A. Luzina, N.F. Salakhutdinov // *Russian Chemical Reviews*. – 2012. – V. 81. – № 8. – P. 747–768. <https://doi.org/10.1070/rc2012v081n08abeh004245>
- Ingolfsdottir, K. Usnic acid / K. Ingolfsdottir // *Phytochemistry*. – 2002. – V.61. – № 7. – P. 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Pacé, M. Effects of lichen, Sphagnum spp. and feather moss leachates on jack pine and black spruce seedling growth / M. Pacé, D. Paré, N.J. Fenton, Y. Bergeron // *Plant and Soil*. – 2020. – V. 452. – № 1–2. – P. 441–455. <https://doi.org/10.1007/s11004-020-04587-0>
- Mallavadhanian, U.V. Synthesis and antiproliferative activity of novel (p)- usnic acid analogues / U.V. Mallavadhanian, N.R. Vanga, K.B. Rao, N. Jian // *Journal of Asian natural products research*. – 2020. – V. 22. – № 6. – P. 562–577. <https://doi.org/10.1080/10286020.2019.1603220>

📧 КОНТАКТЫ:

Кондратьев Вадим Дмитриевич
✉ kondratyev_vadim@mail.ru

Лоскутов Святослав Игоревич
✉ spbsl21@gmail.com

Сорокоумов Павел Николаевич
✉ sorokoumov_pavel@mail.ru

Костин Антон Алексеевич
✉ egresso@yandex.ru

Ситнов Вениамин Юрьевич
✉ v.sitnov@vniipd.ru

Рябухин Дмитрий Сергеевич
✉ rdms@bk.ru