

И.А. Комлач

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
ФИТОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ ТРУТОВИКА
НАСТОЯЩЕГО И ТРУТОВИКА ЛОЖНОГО**

Научный руководитель: канд. хим. наук., доц. Г.И. Горбацевич

Кафедра фармацевтической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

I.A. Komlach

**INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY
OF PHYTOCHEMICALS FROM EXTRACTS OF FOMES FOMENTARIUS
AND PHELLINUS IGNIARIUS**

Tutor: PhD in Chemistry, associate professor H.I. Harbatsevich

Department of Pharmaceutical Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В работе представлены результаты исследования антиоксидантной активности фитохимических веществ из экстрактов трутовых грибов. Проведен сравнительный анализ различных методов, используемых для определения антиоксидантной активности (тест Фолина-Чокальтеу (FCR), анализ удаления радикалов оксида азота (NO), исследование Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности, а также ABTS и DPPH скрининг).

Ключевые слова: антиоксидантная активность, свободные радикалы, трутовик настоящий, трутовик ложный, фенольные соединения.

Resume. The paper presents the results of a study of the antioxidant activity of phytochemicals from extracts of tinder mushrooms. A comparative analysis of various methods used to determine antioxidant activity (Folin-Chocalteu test (FCR), analysis of the removal of nitric oxide (NO) radicals, Fe (II)- and Cu (II)-chelating activity, as well as ABTS and DPPH screening) was carried out.

Keywords: antioxidant activity, free radicals, Fomes fomentarius, Phellinus igniarius, phenolic compounds.

Актуальность. Растущий интерес к антиоксидантам обусловлен их защитной ролью в пищевых и фармацевтических продуктах от окислительного разрушения в организме и от патологических процессов, опосредованных окислительным стрессом [1]. Однако некоторые из коммерческих антиоксидантов, такие как бутилированный гидрокситолуол, могут способствовать повреждению ДНК путем связывания с нуклеиновыми кислотами, следовательно, оказывать мутагенное, раковое и цитотоксическое действие [2]. Поэтому существует необходимость поиска альтернативных более безопасных и эффективных источников соединений с антиоксидантной активностью.

Трутовые грибы содержат широкий спектр биологически активных веществ, включая фенольные соединения (кумаровая, прокатеховая кислоты, пирокатехин, пурпурогаллин), которые проявляют антиоксидантный эффект [3, 4]. Скрининг радикал-ингибирующей активности грибов *in vitro* с помощью различных методов позволит получить более корректную информацию о антиоксидантной активности интересующих образцов.

Цель: провести анализ антиоксидантной активности фитохимических веществ из экстрактов трутовика настоящего и трутовика ложного.

Задачи:

1. Выполнить комплексную переработку сырья путём многоступенчатой экстракции растворителями разной полярности.
2. Определить суммарное содержание фенольных соединений и провести радикальный анализ с использованием DPPH и ABTS, анализ удаления радикалов оксида азота (NO), исследование Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности.
3. Сравнить радикал-ингибирующую активность экстрактов выбранных грибов.

Материалы и методы. Общее содержание фенольных соединений (TPC) определяли с использованием реактива Фолина-Чокальтеу. С помощью спектрофотометрического метода установили радикал-ингибирующую активность экстрактов и их фракций на моделях DPPH радикала (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) и ABTS катион-радикала (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)) [5]. Ингибирующую активность экстрактов в отношении оксида азота (II) определяли путем спектрофотометрического определения концентрации NO, сгенерированного в растворе натрия нитропруссид. Расчеты концентрации фракции, необходимой для полумаксимальной деградации (IC₅₀ мкг/мл), проводили в программе Microsoft Excel. Исследование Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности основаны на способности биологически активных веществ экстрактов связывать ионы металлов в стабильные комплексы, при этом не связанная с ними часть ионов образует окрашенный комплекс, который определяется фотометрически. Содержание фенольных веществ оценено с учетом сигмоидной калибровочной кривой по ЭДТА, в которой выделили участок, имеющий линейную зависимость ($y = 0,2432x - 0,5157, R^2 = 0,9731$). Подобрали такую концентрацию экстрактов (0,1%), которая попадает в линейный диапазон значений.

Результаты и их обсуждение. Объектами исследования являлись экстракты, полученные из плодовых тел трутовика настоящего (*Fomes fomentarius*) и трутовика ложного (*Phellinus igniarius*), собранных на территории Минской и Гродненской областей Беларуси, а также выделенные из них фракции растворителями различной полярности. В качестве образцов сравнения использовали спиртовой экстракт чаги (*Inonotus obliquus*).

Общее содержание фенолов определяли с использованием реагента Фолина-Чокальтеу в пересчёте на эквивалент галловой кислоты (GAE) в мг/г экстракта. Содержание фенольных веществ оценено с учетом калибровочной кривой галловой кислоты и выражено в эквивалентах GAE на грамм массы сухого экстракта (табл. 1).

Табл. 1. Сравнительная характеристика теста TPC для фракционированных экстрактов *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius* и *Inonotus obliquus*

Фракция	TPC, (в пересчете на галловую кислоту)	мг/г
<i>Fomes fomentarius</i> ПЭ	23,79±1,19	
<i>Fomes fomentarius</i> ХЛ	58,00±2,90	
<i>Fomes fomentarius</i> ЭА	160,14±8,00	
<i>Fomes fomentarius</i> (мякоть) EtOH	305,56±15,28	
<i>Fomes fomentarius</i> (гименофор) EtOH	49,17±2,46	

Продолжение таблицы 1

<i>Phellinus igniarius</i> ПЭ	19,87±0,99
<i>Phellinus igniarius</i> ХЛ	23,18±1,16
<i>Phellinus igniarius</i> ЭА	94,17±4,70
<i>Phellinus igniarius</i> EtOH	130,47±6,52
<i>Inonotus obliquus</i> EtOH	105,48±5,27

Согласно результатам теста ТРС, этилацетатная и этанольная фракции трутовиков содержат максимальное количество фенольных соединений, в то время как фенольные соединения практически не обнаруживаются в неполярных фракциях. Результаты ТРС показывают, что содержание фенольных веществ в этанольной фракции *Fomes fomentarius* и *Phellinus igniarius* выше, чем в *Inonotus obliquus*, который традиционной используется как мощный антиоксидант. Обнаружено, что абсолютным лидером по содержанию фенольных веществ является этанольная фракция трутовика настоящего (305,558±15,28 мг/г). Гименофор содержит в основном эргостеролы, лигнины [6], а содержание фенольных соединений в нем относительно невелико (49,17±2,46 мг/г), поэтому его экстракт демонстрирует значительно меньшую способность ингибировать свободные радикалы по сравнению с мякотью. Трутовик ложный также содержит существенное количество фенольных соединений (ТРС этанольной и этилацетатной фракций– 130,468±6,52 мг/г и 94,175±4,70 мг/г соответственно).

Было выявлено, что трутовик настоящий обладает выраженной способностью ингибировать DPPH (IC₅₀ для спиртовой фракции составил 8,03±0,40 мкг/мл) (Рис. 1). Умеренную активность продемонстрировала этилацетатная и спиртовая фракции *Phellinus igniarius* (IC₅₀ = 83,75±4,19 мкг/мл и 65,88±3,29 мкг/мл соответственно). По результатам ABTS-анализа было установлено, что как трутовик настоящий, так и трутовик ложный проявляют высокую активность по нейтрализации свободных радикалов (спиртовая фракция *Fomes fomentarius* – IC₅₀ = 14,49±0,72 мкг/мл, спиртовая фракция *Phellinus igniarius* – IC₅₀ = 15,88±0,79 мкг/мл). Важно отметить, что этанольная фракция трутовика настоящего проявляют примерно в 16 раз большую ингибирующую активность в отношении радикалов хромогена DPPH по сравнению с фракциями *Inonotus obliquus* (133,65±6,68 мкг/мл).

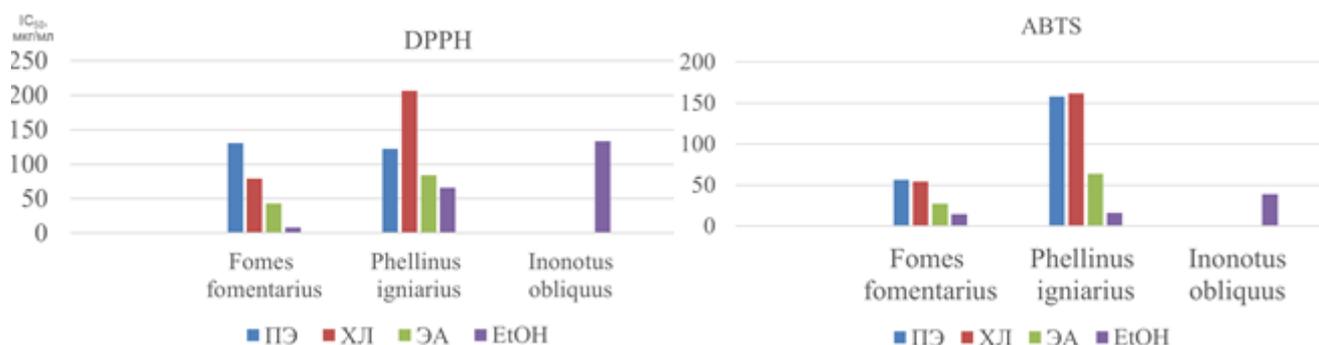


Рис. 1 – Анализ радикал-ингибирующей активности с помощью DPPH и ABTS тестов

Результаты исследования удаления радикалов оксида азота (II) показали корреляцию с предыдущими исследованиями антиоксидантных свойств в отношении

трутовика настоящего ($IC_{50} = 11,70 \pm 0,59$ мкг/мл) и трутовика ложного ($38,81 \pm 1,94$ мкг/мл) (Рис. 2).

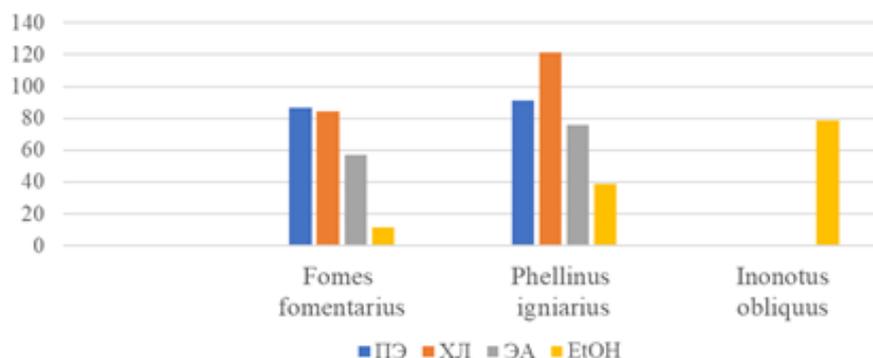


Рис. 2 – Анализ удаления радикалов оксида азота (II)

Поскольку ионы переходных металлов играют жизненно важную роль в иницировании свободнорадикальных процессов (посредством реакции Фентона), хелатирование металлов широко рассматривается как еще один механизм антиоксидантной активности флавоноидов [7]. Взаимодействие флавоноидов с ионами металлов может изменять антиоксидантные свойства и некоторые биологические эффекты флавоноидов. Предполагается, что биологическая активность молекулы может быть повышена при координации с подходящим ионом металла из-за его способности действовать как акцептор свободных радикалов [8]. Нами была рассмотрена Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующая активность, которую определяли в эквивалентах ЭДТА (мг/г).

Обнаружено, что *Fomes fomentarius* и *Phellinus igniarius* демонстрируют высокую способность связывать катионы железа (для спиртовых фракций– 99,42 мг/г и 101,80 мг/г соответственно). В отношении меди трутовик ложный немного уступает трутовику настоящему (89,15 мг/г и 132,46 мг/г соответственно) (Рис. 3).

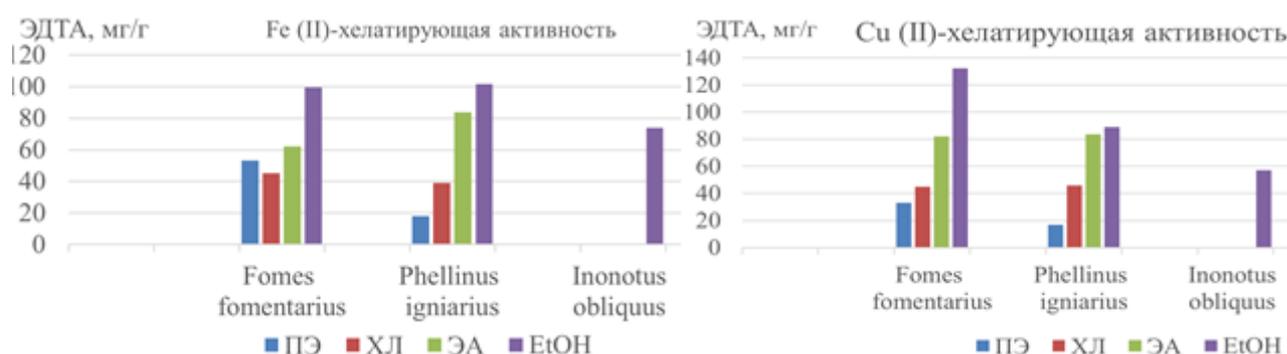


Рис. 3 – Анализ Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности

Выводы: экстракты трутовика настоящего и трутовика ложного показали высокий уровень радикал-ингибирующей активности. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей фармацевтической разработки препаратов на основе данных грибов в качестве эффективных антиоксидантных средств.

Литература

1. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview / I. Gulcin // *Archives of Toxicology*. – 2020. – Vol. 94. – P. 651–715.
2. Dolatabadi J.E., Kashanian S. A Review on DNA Interaction with Synthetic Phenolic Food Additives / J.E. Dolatabadi, S. Kashanian // *Food Research* – 2005. – Vol. 43. – P. 1223–1230.
3. Nijveldt R. J., Boelens P.G. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. / R. J. Nijveldt, P.G. Boelens // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – Vol. 74. – P. 418–425.
4. Pietta P. Flavonoids as antioxidants. / P. Pietta // *Journal of Natural Products*. – 2000. – Vol. 63. – P. 1035–1042.
5. Ильяшенко, С. А. Биологическая активность трутовика настоящего / С. А. Ильяшенко, Г. И. Горбацевич // *Молодая фармация - потенциал будущего*. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2022. – С. 328-332.
6. Kalitukha L., Sari M. Chemical Composition and Ultraviolet Absorption Activity of an Aqueous Alkali Extract from the Fruiting Bodies of the Tinder Conk Mushroom, *Fomes fomentarius* (Agaricomycetes) / L. Kalitukha, M. Sari // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2021. – Vol. 23. – P. 23–37.
7. Rubens F.V. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. / F.V. Rubens // *Redox Report*. – 2004. – Vol. 9:2. – P. 97–104.
8. Afanas'ev A. B. Enhancement of antioxidant and antiinflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. / A. B. Afanas'ev [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2001. – Vol. 61. – P. 677–684.