УДК 615.322

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАГЕНТА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *GANODERMA LINGZHI*

Горбацевич Г.И.[1], Пархач М.Е.[1], Антоненко Е.Д.[2], Князева А.В.[2]

[1]УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь
[2]УО «Национальный детский технопарк», г. Минск, Республика Беларусь

В работе исследовано влияние состава экстрагентов на выход биологически активных веществ из плодовых тел *Ganoderma lingzhi*. Установлено, что водно-спиртовые смеси (20–90 %, об.) обеспечивают высокий выход экстрактивных веществ (до 81,3 мг/г), извлекая широкий спектр соединений. Максимальное содержание (44,0–48,8 мг/г) полисахаридов выявлено в системах с низким содержанием этанола (0–10 %); фенольных соединений (до 13,19 мг/г) – при экстракции 80 % этанолом и 0,1 М водным раствором NaOH; а тритерпеноидов (до 2,84 мг/г) – при использовании хлороформа, 80–96 % этанола или 0,1 М раствора NaOH. Результаты исследования демонстрируют, что выбор экстрагента позволяет направленно формировать химический состав и биологическую активность извлечений из плодовых тел *Ganoderma lingzhi*.

Ключевые слова: трутовик лакированный; фенольные и тритерпеновые соединения; флавоноиды; полисахариды.

Введение. Актуальность изучения натурального сырья грибного происхождения стремительно возрастает, что напрямую связано с запросом общества на экологичные, безопасные и эффективные лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище. Грибы представляют уникальные организмы, производящие широкий спектр низко- и высокомолекулярных соединений. К наиболее распространенным группам их метаболитов относят полисахариды, ланостановые тритерпены, стеролы и фенольные вещества, которые, по данным множества исследований, демонстрируют антиоксидантные, противовоспалительные, цитотоксические и иммунорегулирующие эффекты [1].

Особое место среди грибов, широко применяющихся в народной медицине, занимает трутовик лакированный (*Ganoderma lingzhi*, «рейши»), принадлежащий к семейству *Ganodermataceae*. Плодовые тела этого трутовика встречаются на лиственных породах деревьев в восточноазиатском регионе, а в традиционной китайской медицине используются более двух тысячелетий как «гриб долголетия». Современные экспериментальные и клинические работы подтверждают широкий спектр ее биологической активности, включая антимикробное, гепатопротекторное, противоопухолевое и иммуномодулирующее действие [2].

При поиске и выделении биологически активных веществ из их природных источников ключевым этапом остается выбор оптимального растворителя: именно характеристики экстрагента определяют не только выход и состав целевых соединений, но и последующую стабильность, чистоту и фармакологическую активность экстрактов [3]. Исследование направлено на научное обоснование выбора эффективного экстрагента для выделения биологически активных компонентов из плодовых тел *G. lingzhi*.

Материалы и методы. Плодовые тела трутовика лакированного были приобретены в 2022 г. в Китае (Bozhou Swanf Commercial and Trade Co., Ltd; серия 09-2022).

Сухое сырье измельчали на молотковой мельнице MOLOT и просеивали через сито с отверстиями 2 мм. Для мацерационной экстракции брали 0,200 г (в пересчете на сухое сырье [4]) порошка и заливали 10,0 мл растворителя. В качестве экстрагентов использовали: гексан (Г, х. ч.); этилацетат (ЭА, х. ч.); хлороформ (Хл, х. ч.); водно-этанольные смеси разной концентрации (Э); воду очищенную (В).

Мацерат выдерживали семь суток при комнатной температуре, периодически перемешивая, затем процеживали и фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Выход экстрактивных веществ (ЭВ) определяли гравиметрически: из каждого извлечения отбирали 5,00 мл, высушивали в бюксах до постоянной массы и рассчитывали содержание ЭВ по формуле:

$$ЭВ = \frac{m_{ЭВ}}{m_{сырья}} \frac{V_0}{V_1} \times 1000,$$

где $m_{ЭВ}$ – масса экстрактивных веществ, г; $m_{сырья}$ – масса сырья, г; V_0 – объем растворителя, взятый для экстракции; V_1 – объем извлечения для анализа.

Сухой остаток, полученный при определении ЭВ, растворяли в 1,0 мл воды, добавляли 4,0 мл 96 %-го (об./об.) этанола и выдерживали смесь в холодильнике 60 мин. Осадок отделяли на предварительно взвешенном фильтре «Синяя лента», после чего фильтр сушили и вновь взвешивали. Содержание СВП вычисляли по формуле:

$$СВП = \frac{m_{ВП}}{m_{сырья}} \frac{V_0}{V_1} \times 1000,$$

где $m_{ВП}$ – разница масс фильтра до и после отделения водорастворимых полисахаридов, г.

Для определения суммы фенольных соединений (СФ) применяли фотометрический метод [5]: основан на реакции Фолина–Чокальтеу. В пробирку вносили 100 мкл экстракта, 100 мкл реактива Фолина–Чокальтеу (Merck, № 109001), 400 мкл 10 % раствора Na_2CO_3 и 1,5 мл очищенной воды. Инкубацию проводили 60 мин в темноте при 20–22 °С. Калибровочный график строили по растворам галловой кислоты (15,625–500 мкг/мл). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Solar PB2201 (кювета 1,00 см) при 725 нм. Результат выражали в пересчете на галловую кислоту, мг/г сырья, по формуле:

$$СФ = \frac{C_{ГК} V_0}{1000 \cdot m_{сырья}},$$

$C_{ГК}$ – концентрация фенольных соединений в испытуемых растворах в пересчете на галловую кислоту (мкг/мл).

Определение суммы тритерпеновых и стероидных соединений (СТС) в образцах экстрактов проводили спектрофотометрическим методом по реакции Либермана-Бурхардта [6]. Для этого 0,50 мл извлечения упаривали досуха, остаток растворяли в 1,20 мл хлороформа. К 1,00 мл полученного раствора прибавляли 1,00 мл реактива (уксусный ангидрид : конц. H_2SO_4 = 10 : 1, об./об.), перемешивали и выдерживали 90 мин при 20–22 °С. Оптическую плотность регистрировали при 665 нм. Калибровочный график строили по стандартным растворам холестерина в хлороформе (10–1000 мкг/мл). Содержание СТС (мг/г сырья) рассчитывали, переводя результат в эквивалент холестерина:

$$СТС = \frac{C_X V_1 \cdot 1,2}{1000 \cdot m_{сырья}},$$

где C_X – концентрация стероидных и тритерпеновых соединений в испытуемых растворах в пересчете на холестерин (мкг/мл); 1,2 – коэффициент пересчета, учитывающий взятую для анализа аликвоту.

Сумму флавоноидов в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом с использованием реакции комплексообразования с Al(III) [7]. В пробирку помещали 100 мкл исследуемого раствора, затем добавляли 1000 мкл воды очищенной и 300 мкл 5 %-го раствора натрия нитрита. Спустя 5 минут в системы приливали 500 мкл 2 %-го раствора алюминия хлорида и выдерживали 6 минут. После добавляли 500 мкл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и спустя 10 минут измеряли оптическую плотность при 510 нм. Калибровочный график строили с использованием стандартных растворов рутина (50–1000 мкг/мл). Содержание флавоноидов (мг/г) находили по формуле:

$$СФл = \frac{C_{рут} V_0}{1000 \cdot m_{сырья}},$$

$C_{рут}$ – концентрация флавоноидов в испытуемых растворах в пересчете на рутин (мкг/мл).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MS Excel 2019.

Результаты и их обсуждение. Высокий выход экстрактивных веществ (66,7–81,3 мг/г) *G. lingzhi* обеспечивается при использовании водно-спиртовых смесей (20–90 % (об.) этанола, рис. 1). Этот экстрагент позволяет извлечь широкую сумму биологически активных веществ различной полярности.

Важно отметить, что максимальный выход экстрактивных веществ *G. lingzhi* достигается при использовании 0,1 М раствора натрия гидроксида в качестве экстрагента (267 ± 22 мг/г, рис. 1). Это может быть обусловлено несколькими факторами: 1) щелочная среда способствует разрушению клеточных стенок грибного сырья, в состав которых входят полисахариды, белки и другие биополимеры; 2) в щелочной

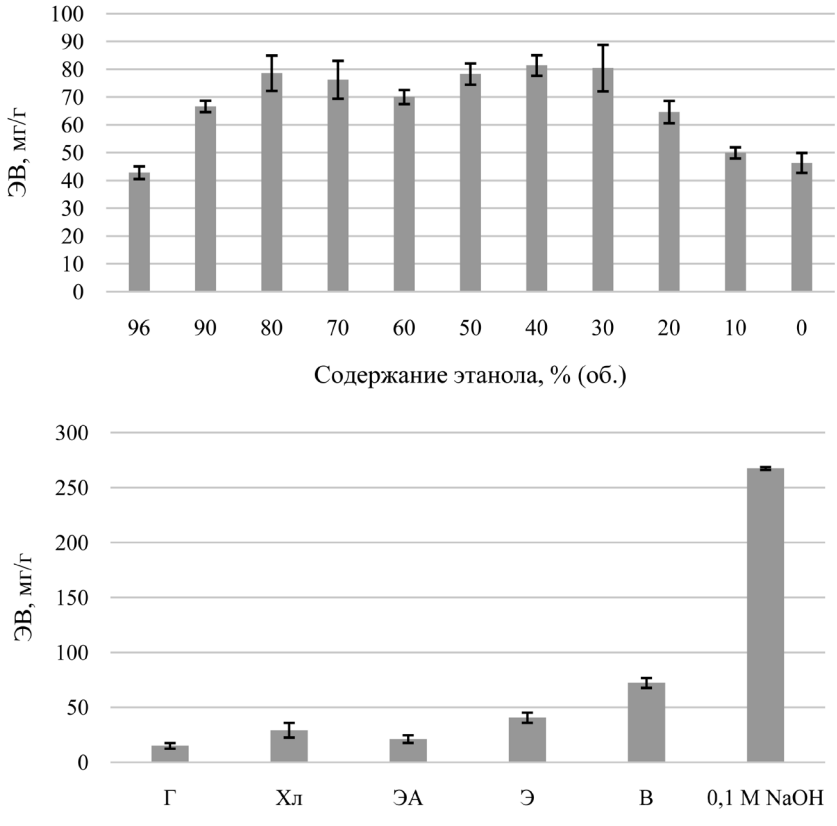

Рис. 1. Влияние природы и состава экстрагента на содержание экстрактивных веществ в извлечениях *G. lingzhi*

среде усиливается растворимость ряда биологически активных веществ: в частности, фенольные соединения переходят в форму фенолят-ионов, обладающих более высокой растворимостью, а органические кислоты и некоторые тритерпеноиды могут существовать в виде растворимых солей; 3) возможно частичное растворение водорастворимых полисахаридов, таких как β-глюканы, за счет разрушения водородных связей в их структурах.

Существенная часть экстрактивных веществ в водно-спиртовых экстрактах приходится на водорастворимые полисахариды (рис. 2). При этом их максимальное содержание (44,0–48,8 мг/г) достигается в системах с низким содержанием этанола (0–10 %), который термодинамически плохой растворитель для полисахаридов. Таким образом, использование экономически доступного экстрагента позволяет получить продукт с широким спектром

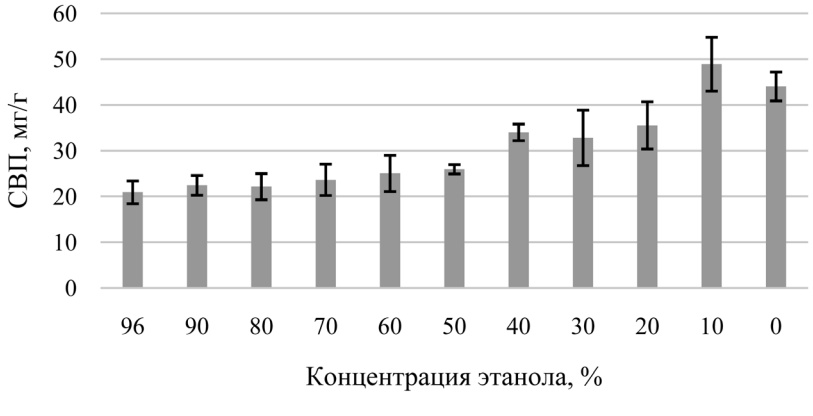

Рис. 2. Влияние концентрации этанола в водно-спиртовой смеси на содержание водорастворимых полисахаридов в извлечениях *G. lingzhi*

биологической активности (иммуномодулирующей, гипогликемической и противовоспалительной) [8].

При настаивании сырья с использованием водно-этанольных смесей с содержанием спирта 50–96 % (об.) в извлечениях наблюдается максимальное содержание фенольных соединений (6,58–9,91 мг/г), пик которого приходится на содержание этанола 80% (рис. 3). Отметим, что степень экстракции фенолов существенно возрастает при использовании 0,1 М раствора натрия гидроксида (13,19 мг/г), однако, как известно [9], создаваемая в процессе экстракции щелочная среда может способствовать окислительной деструкции фенольных соединений.

Было установлено, что флавоноиды занимают незначительную часть фенольной фракции извлечений *G. lingzhi* (0,41–0,74 мг/г).

Хотя малополярные экстрагенты (гексан, хлороформ) практически не извлекают фенольные соединения и полисахариды (рис. 2, 3), они способствуют максимальному выходу стероидных и тритерпеновых соединений (рис. 4). Так, для изолирования этой группы соединений, известных своей противовоспалительной, антимикробной и антипролиферативной активностью [10], наиболее приемлемы экстра-

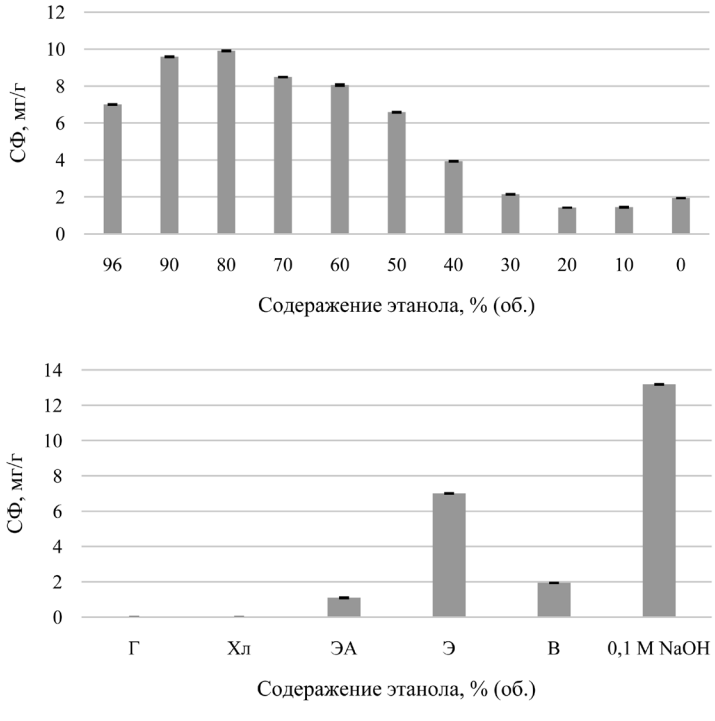

Рис. 3. Влияние природы и состава экстрагента на содержание фенольных соединений в извлечениях *G. lingzhi*

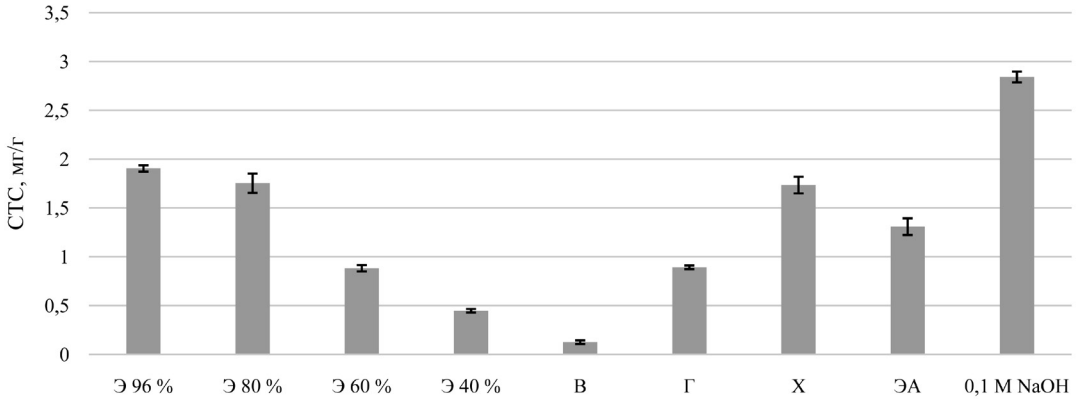

Рис. 4. Влияние природы и состава экстрагента на содержание тритерпеновых и стероидных соединений в извлечениях *G. lingzhi*

генты: этанол 80–96 % (1,75–1,90 мг/г), хлороформ (1,74 ± 0,09 мг/г), 0,1 М водный раствор натрия гидроксида (2,84 ± 0,06 мг/г).

Заключение. Таким образом, оптимальным экстрагентом для получения экстракта из плодовых тел *G. lingzhi* являются водно-спиртовые смеси с содержанием этанола 20–90 % (об.), обеспечивающие высокий выход экстрактивных веществ (66,7–81,3 мг/г) и извлекающие широкий спектр метаболитов. При целевом получении полисахаридов предпочтительны водные и разбавленные (0–10 %) спиртовые системы, тогда как максимальное извлечение фенольных соединений достигается при использовании 80 % этанола (9,91 ± 0,02 мг/г) и усиливается в 0,1 М NaOH (13,19 ± 0,01 мг/г); малополярные растворители (хлороформ, гексан), а также среды с высоким содержанием этанола (80–96 %) или 0,1 М водный раствор NaOH целесообразно применять для изолирования стероидных и тритерпеновых соединений. Совокупность данных демонстрирует, что направленно выбор экстрагента позволяет формировать химический профиль извлечений *G. lingzhi*, что существенно для разработки технологии препаратов на его основе с заданными фармакологическими свойствами.

Список цитированных источников

1. European medicinal polypores – a modern view on traditional uses / U. Grienke [et al.] // J of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, № 3. – P. 564–583.

2. *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions / X. Zhou, Lin J. [et al.] // Am J Chin Med. – 2007. – Vol. 35. – P. 59–74.

3. Extraction and utilization of active substances from edible fungi substrate and residue: A revie / P. Qin [et al.] // Food Chemistry. – Vol. 398. – 2023. – P.133872-83.

4. Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 2 т. : введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении / под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно : Победа, 2012. – 1220 с.

5. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós // Methods Enzymol. – Vol. 299. – 1999. – P. 152–78.

6. Nath, M. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids / M. Nath, M. Chakravorty, S. Chowdhury // Nature. – Vol. 157. – 1946. – P. 103–104.

7. Zhishen, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals / J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming // Food chemistry. – 1999. – T.64. – №4. – P. 555–559.

8. Seweryn, E. Health-Promoting of Polysaccharides Extracted from Ganoderma lucidum / E. Seweryn, A. Ziała, A. Gamian // Nutrients. – 2021. – Vol. 13. – №8. – P.357–374/

9. Friedman, M. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds / M. Friedman, H.S. Jürgens // J of agricultural and food chemistry. – 2000. – Vol. 48. – №6. – P. 2101–2110.

10. Lanostane triterpenoids with anti-proliferative and anti-inflammatory activities from medicinal mushroom Ganoderma lingzhi / Z.-Z. Zhao, B.-Y. Ji, Z.-Z. Wang [et al.] // Phytochemistry. – 2023. – Vol. 213. – P.113791.

JUSTIFICATION FOR THE CHOICE OF EXTRACTANT FOR BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM GANODERMA LINGZHI FRUITING BODIES

Harbatsevich H.I.[1], Parkhach M.E.[1], Antonenko E.D.[2], Knyazeva A.V.[2]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]National Children's Technopark, Minsk, Republic of Belarus

This study examines the effect of extractant composition on the yield of biologically active substances from the fruiting bodies of *Ganoderma lingzhi*. It was found that aqueous-alcoholic mixtures (20–90 % v/v) provide a high yield of extractive substances (up to 81.3 mg/g), extracting a wide range of compounds. The maximum content of polysaccharides (44.0–48.8 mg/g) was observed in systems with low ethanol concentrations (0–10 %); phenolic compounds (up to 13.19 mg/g) were best extracted using 80 % ethanol or 0.1 M aqueous NaOH; and triterpenoids (up to 2.84 mg/g) with chloroform, 80–96 % ethanol, or 0.1 M NaOH. The results demonstrate that selecting an appropriate extractant allows for targeted formation of the chemical composition and biological activity of extracts from *Ganoderma lingzhi* fruiting bodies.

Keywords: reishi mushroom; phenolic and triterpenoid compounds; flavonoids; polysaccharides.