

М. А. Бурмасова, М. А. Сысоева

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БУТАНОЛЬНОЙ ФРАКЦИИ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ МЕЛАНИНА ЧАГИ

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Татарстан, 420015, Казань, ул. К. Маркса, д. 68; e-mail: m-burmasowa@mail.ru

Исследована биологически активная фракция меланина, выделенного из гриба чаги. Методом масс-спектрометрии подтверждено присутствие в ней веществ, относящихся к терпеновым и фенольным соединениям. Определено общее содержание липидов, фенолов и углеводов. Установлено, что выделенная фракция обладает антиоксидантной, а также фунгицидной, фунгистатической и пребиотической активностью в отношении некоторых групп микроорганизмов.

Ключевые слова: чага; меланин; терпены; фенольные соединения; хроматомасс-спектрометрия; фунгицидная активность; фунгистатическая активность; пребиотические свойства.

В медицинскую практику введены лекарственные средства на основе чаги, например, “Бэфунгин”, спиртовая настойка и другие. Их применяют при хронических гастритах, дискинезиях ЖКТ, при язвенной болезни желудка. Эти средства оказывают общетонизирующее и болеутоляющее действие [1].

Основным действующим веществом водных извлечений чаги, согласно [2], является хромогенный комплекс, который авторами отнесен к алломеланинам [3].

Меланин чаги, высушенный на воздухе и при повышенной температуре, теряет свою растворимость почти целиком и не растворяется в диэтиловом эфире, петролейном эфире, хлороформе, ксилоле и бензоле; высушенный в вакууме сохраняет растворимость только в растворах соды и щелочей. Свежеосаждённый меланин растворяется в воде, слабощелочных растворах и некоторых растворителях [4]. В меланине в связанном состоянии находятся соединения, способные проявлять биологическую активность.

Цель работы — исследование химического состава и биологических свойств бутанольной фракции из меланина чаги.

Экспериментальная химическая часть

Экстракцию меланина с влажностью 95 % (3 г), выделенного из водного извлечения чаги, проводили органическими растворителями: 96 % этанолом, этилацетатом, *n*-бутанолом (20 мл) при комнатной температуре в течение 6 в соотношении 1:7. Далее надосадочную жидкость (экстракт) декантировали. В экстрактах определяли содержание сухих веществ [5] и антиоксидантную активность (АОА) кулонометрическим методом (табл. 1) [6].

Экстракт, полученный с применением бутанола, содержит наибольшее количество сухих веществ и АОА, поэтому его выбрали для дальнейшего исследования.

В бутанольном экстракте определяли общее содержание липидов — весовым методом [7], фенолов — спектрофотометрическим методом по реакции с 4-аминоантипирином при длине волны 500 нм [8], уг-

леводов — фенолсерноокислотным методом [9]. Содержание фенолов и углеводов рассчитывали по калибровочным графикам, построенным для стандартных растворов фенола и глюкозы. Оно составило 0,05, 0,12, 0,83 соответственно.

Бутанольный экстракт меланина чаги анализировали методом ГХ-МС на хроматомасс-спектрометре “TRIO” фирмы FISON (Великобритания). Применяли хроматограф GC 8000 с колонкой длиной 60 м и диаметром 0,25 мм. В качестве газа-носителя использовали гелий, который подавали со скоростью 1 мл/мин. Идентификацию проводили путем сопоставления полученных масс-спектров с библиотечными значениями [10]. Характеристика полученных масс-спектров (*m/z*): соединение **I** (ланостерол) — M^+ 426(18), 411(35), 393(24), 241(15), 109(55), 69(100), 55(30); соединение **II** (инотодиол) — M^+ 442(10), 427(10), 357(23), 281(18), 207(18), 109(48), 99(100), 69(70); соединение **III** (сквален) — M^+ 410(1), 95(20), 81(60), 69(100); соединение **IV** (метилдифенилацетат) — M^+ 226(20), 167(100), 123(15); соединение **V** (1,1-дифенил-2-пропанон) — M^+ 210(25), 167(100), 123(15); соединение **VI** (4-гидрокси-3,5-диметоксибензойная кислота) — M^+ 198(100), 183(40), 127(30), 109(30), 93(15); соединение **VII** (сиреневый альдегид) — M^+ 196(70), 181(100), 153(28), 147(30), 91(28), 65(28); соединение **VIII** (2-аллил-3-этокси-4-метоксифенол) — M^+ 208(100), 93(20), 165(70), 147(25), 137(60), 119(37), 91(35), 43(38).

Из бутанольного экстракта бутанол отгоняли на роторном испарителе и получали сумму экстрактивных веществ — сухой экстракт М, который исследовали на биологическую активность.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Экспериментальная биологическая часть

При изучении острой (неспецифической) токсичности сухой экстракт М в форме 15 %-го водного раствора вводили 10 беспородным белым мышам обоего

Таблица 1
Содержание сухих веществ и АОА экстрактов из меланина чаги (n = 5)

Органический экстракт	Содержание сухих веществ		АОА экстрактов, Кл/мл
	мг/мл	% *	
Этилацетатный	17 ± 1	11,0 ± 0,7	0,59 ± 0,02
Бутанольный	34 ± 1	22,0 ± 0,6	0,81 ± 0,03
Этанольный	25 ± 1	16,0 ± 0,6	0,58 ± 0,02

* % от абсолютно сухой массы меланина, взятого на исследование.

пола массой (19,0 ± 2,0) г в дозах от 1500 до 9000 мг/кг в объеме 0,1 мл/10 г массы [11]. В контрольном опыте мышам вводили оливковое масло в количествах, эквивалентных опыту. Длительность эксперимента — 5 сут.

Оценку фунгицидной активности сухого экстракта М проводили методом разведений в жидких питательных средах в отношении: *Candida albicans*, *Rhodotulula mucilaginosa*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus nigricans*. Эксперимент осуществляли в течение 2 – 6 сут при 30 °С. В качестве контроля использовали чистую питательную среду. Для удобства в анализе полученных данных оценку активности оценивали в крестах по схеме, предложенной Г. Н. Першиным, а также минимальную ингибирующую концентрацию экстракта (МИК 70 %) согласно рекомендации. МИК определяли как самую малую концентрацию антимикробного вещества, ингибирующую рост микроорганизма не менее чем на 70 %, по сравнению с контролем [12, 13].

Исследовали *in vitro* пребиотическую активность сухого экстракта М в концентрации 10⁻⁵ и 10⁻¹⁰ г/мл и лекарственного средства “Бефунгин” (ЗАО “ВИФИ-ТЕХ”, Московская обл., п. Оболенск) в отношении микроорганизмов родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* по модифицированной методике с использованием стандартных методов по культивированию микроорганизмов [14]. Модификация методики заключалась в замене физиологического раствора на дистиллированную воду. Динамика роста микроорганизмов приведена в табл. 2.

Результаты и их обсуждение

Исследование острой токсичности сухого экстракта М (1) показало, что он относится к мало опасным веществам [15], так же как и лекарственное средство “Бефунгин”(2): LD₅₀(1) = 6100 мг/кг, LD₅₀(2) = 6500 мг/кг, что подтверждает возможность использования сухого экстракта М в медицинских целях.

Сухой экстракт М проявляет фунгицидную и фунгистатическую активность в отношении *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*. Показано ингибирование роста грибов *Candida albicans*, *Penicillium notatum* на 70 %, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride* — на 100 % (по сравнению с контролем), при МИК экстракта, равной 3 мг/мл. Фунгицидное действие экстракта сопоставимо с действием фармацевтического препарата “Тербинафин гидрохлорид”. Фунгицидные свойства в полученном экстракте могут быть обусловлены присутствием в его составе терпеновых соединений: ланостерола, иноодиола, сквалена.

Установлена стимулирующая активность сухого экстракта М на рост микроорганизмов *Bifidobacterium bifidum* и *Escherichia coli*. Введение в среду культивирования микроорганизмов сухого экстракта М или “Бефунгина” в концентрации 10⁻⁵ г/мл уменьшает период лаг-фазы в 2 раза по сравнению с контролем. Использование сухого экстракта М способствует увеличению биомассы бифидобактерий (в КОЕ) с 10⁹ до 3 · 10¹³, а “Бефунгина” — до 10¹³ по сравнению с контролем, в случае *E.coli* — до 10¹³. На основании полученных данных сухой экстракт М можно отнести к пребиотикам. Согласно нормативным документам [16] пребиотиками являются антиоксиданты, растительные экстракты, моносахариды, дисахариды, олигосахариды и т.д.

Активность сухого экстракта М может быть обусловлена присутствием в нем фенольных соединений, а также их гликозидов. По литературным данным, фенольные соединения являются антиоксидантами [17] и АОА некоторых антиоксидантов такова (в кКл/100 г): ионола — (72 ± 1,3), α-токоферола — (45,3 ± 0,7) [18]. Значение АОА сухого экстракта М составило 203 кКл/100 г, что превышает АОА вышеуказанных

Таблица 2

Влияние экстрактов чаги на рост микроорганизмов

Штамм	Концентрация микроорганизмов (КОЕ, * 10) при добавлении:								
	контроль (H ₂ O)			сухого экстракта М			“Бефунгина”		
	0 ч	6 ч	12 ч	0 ч	6 ч	12 ч	0 ч	6 ч	12 ч
	Концентрация сухого экстракта 10 ⁻⁵ г/мл								
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (* 10 ⁹)	1	2	3	1	61	30000	1	40	10260
<i>Escherichia coli</i> (* 10 ¹¹)	2	12	193	2	671	296	2	106	185
<i>Lactobacillus fermentum</i> (* 10 ¹⁰)	22	501	177	17	513	375	15	490	2000
	Концентрация сухого экстракта 10 ⁻¹⁰ г/мл								
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (* 10 ⁹)	1	3	76	1	11	2850	1	17	150
<i>Escherichia coli</i> (* 10 ¹¹)	2	14	150	2	94	640	2	70	180
<i>Lactobacillus fermentum</i> (* 10 ¹⁰)	4	368	9100	4	306	9000	4	255	30200

соединений. Известными препаратами, стимулирующими рост резидентной микрофлоры кишечника человека, являются лактулоза, 6-галактозид-фруктоза-левулоза и другие [19]. Однако их недостатком является то, что действие проявляется в высоких дозах. Полученный сухой экстракт М стимулирует рост микроорганизмов толстого кишечника в малых концентрациях 10^{-5} и 10^{-10} г/мл. Данную активность сухого экстракта М можно сравнить с химическим препаратом *пара*-аминометилбензойной кислоты, применяемой для лечения дисбактериоза [20].

Таким образом, полученный сухой экстракт М представляет интерес в качестве субстанции для получения лекарственного средства, обладающего антиоксидантной, фунгицидной, фунгистатической и пребиотической активностью. Кроме того, он может быть использован как компонент питательной среды в качестве источника питания и фактора роста при культивировании бифидофлоры и кишечной палочки.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва (2005).
2. Государственная фармакопея СССР: *Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье*, Вып. 2, Медицина, Москва (1990).
3. М. А. Сысоева, О. Ю. Кузнецова, В. С. Гамаюрова и др., *Химия растит. сырья*, №1, 41 – 47 (2005).
4. А. Н. Шиврина, *Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии*, Медгиз, Ленинград (1959).
5. *Государственная фармакопея СССР*, Общие методы анализа, Вып. 1, Медицина, Москва (1987).
6. М. А. Сысоева, О. Ю. Кузнецова, В. С. Гамаюрова и др., *Химия растит. сырья*, № 1, 41 – 47 (2005).
7. С. Е. Северин, Г. А. Соловьева, *Практикум по биохимии*, Москва (1989).
8. Р. Полудек-Фабини, Т. Бейрих, *Органический анализ*, Химия, Ленинград (1981).
9. И. Я. Захарова, Л. В. Косенко, *Методы изучения микробных полисахаридов*, Наукова думка, Киев (1982).
10. Электронная база — NIST (Chemistry Web Book), www.webbook.nist.gov/chemistry
11. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, ч. 1, Гриф и К, Москва (2012).
12. А. И. Нетрусов, *Практикум по микробиологии*, Академия, Москва (2005).
13. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971).
14. *Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов*, Информационно-издательский центр Минздрава России, Москва (1998).
15. Н. Ф. Измеров, *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном введении (справочник)*, Медицина, Москва (1977).
16. ГОСТ Р 52349-2005.
17. Н. А. Тюкавкина, *Вопросы питания*, № 2, 33 – 37 (1996).
18. Г. К. Зиятдинова, Г. К. Будников, А. И. Самигуллин и др., *Ж. аналит. химии*, **65**(12), 1302 – 1308 (2010).
19. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**(12), 1588 – 1594 (1970); www.webbook.nist.gov/chemistry
20. Патент РФ 2062787.

Поступила 15.06.14

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHAGA MELANIN DRY EXTRACT

M. A. Burmasova* and M. A. Sysoeva

Kazan National Research Technological University, Kazan, Tatarstan, 420015 Russia;

* e-mail: m-burmasowa@mail.ru

A biologically active fraction of melanin isolated from chaga mushroom was investigated. Mass-spectrometric analyses confirmed the presence of substances classified as terpene and phenolic compounds. The total content of lipids, phenols, and hydrocarbons was determined. It is established that the isolated melanin fraction possesses antioxidant properties, fungicidal and fungistatic activity, and prebiotic properties with respect to some groups of microorganisms.

Keywords: chaga; melanin; terpenes; phenolic compounds; thin-layer chromatography; mass-spectrometry; fungicidal activity; fungistatic activity; prebiotic properties.