

УДК 582.287.237:615.322

АНТИОКСИДАНТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr.

© 2011 г. Д. Н. Оленников*, Л. М. Танхаева*, С. В. Агафонова**

*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047
e-mail: oldaniil@rambler.ru

**Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 22.09.2010 г.

Проведено исследование антиоксидантной активности плодовых тел *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (Polyporales), полученных методом природных плантаций в условиях Прибайкалья (Иркутская область). Установлено, что наиболее выраженное действие характерно для этилацетатной фракции, из которой в результате хроматографического разделения выделено 7 соединений, идентифицированных, как кверцетин, кемпферол, (+)-катехин, п-кумаровая, галловая, кофейная и хлорогеновая кислоты. Все соединения выделены у данного базидиального вида впервые. Методом ВЭЖХ определено количественное содержание веществ в плодовых телах *L. sulphureus*. Установлено, что наличие фенольных соединений обуславливает антиоксидантную активность препаратов *L. sulphureus*.

В последние десятилетия возрос интерес к источникам биологически активных соединений грибного происхождения, обладающих протеолитической, иммуномодулирующей, антиоксидантной, антибиотической и другими видами активностей [1, 2]. Возможность использования трутовых грибов как наиболее доступных объектов в биоконверсии органических отходов, в пищевой индустрии и медицине предопределяет необходимость более глубокого исследования их химического состава, а также определения условий, влияющих на накопление биологически активных соединений.

Ксилотрофный базидиомицет *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (сем. Polyporales), относящийся к грибам бурой гнили, является перспективным биотехнологическим объектом. По экологическим характеристикам *L. sulphureus* относится к термофилам, легко культивируется как в лабораторных, так и в природных условиях, образуя в короткий срок плодовые тела значительной биомассы.

Химический состав плодовых тел *L. sulphureus* разнообразен и представлен различными классами соединений [3]. Исследования биологической активности *L. sulphureus* выявили наличие в суммарных фракциях и индивидуальных соединениях иммуностимулирующее, противоопухолевое [4], гем-агглютинирующее [5], антикоагулянтное [6, 7], цитотоксическое [8, 9], апоптоз-индуцирующее [8], ан-

тиоксидантное [10, 11], антимикробное [11] и инсулино-тропное действие [12]. Изучение антиоксидантной активности ранее было проведено в виде экспериментов без определения соединений, ответственных за проявление данного вида биологической активности [10, 11].

Цель работы – исследование антиоксидантной активности плодовых тел *L. sulphureus* в условиях *in vitro* и выделение наиболее активных компонентов.

МЕТОДИКА

Плодовые тела *L. sulphureus*. Материалом для исследования служили зрелые плодовые тела *L. sulphureus*, полученные, как описано ранее [13], на опытных плантациях, заложенных в Слюдянском, Усть-Кутском и Иркутском районах Иркутской области в 2005–2008 гг.

В работе использовали галловую, кофейную кислоты, кверцетин, ионол, β-каротин, краситель Прочный синий Б (“Fluka”, Швейцария), глюкозу (“Roquete”, Франция), олеиновую кислоту, диметилсульфоксид (ДМСО, “Sigma”, США), Тритон X-100 (“Ferah”, Германия), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ, “MP Biomedicals Inc.”, США).

Фракционирование экстрактивных веществ плодовых тел *L. sulphureus*. Измельченные и высушенные плодовые тела *L. sulphureus* (700 г, образец № Л-1Х) экстрагировали 70%-ным этанолом в соотношении 1 : 20 на кипящей водяной бане пятикратно. Полученную вытяжку концентрировали под вакуумом; сухой остаток суспендировали в воде и подвергали экстракции последовательно н-гексаном, хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом. В результате получены гексановая (ЛФ-1, 4.30 г), хлороформная

Используемые сокращения. ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, ЛФ-1 – ЛФ-7 – фракции экстрактивных веществ плодовых тел *L. sulphureus*, ОАП – общий антиоксидантный потенциал, ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография, МС – масс-спектрометрия, ОФС – общее содержание фенольных соединений, ОФЛ – общее содержание флавоноидов, ОКР – общее содержание каротиноидов, ОПС – общее содержание полисахаридов.

(ЛФ-2, 2.10 г), этилацетатная (ЛФ-3, 1.40 г), бутанольная (ЛФ-4, 3.60 г) фракции и водный остаток (ЛФ-5, 26.40 г). Плодовые тела после обработки этанолом высушивали и экстрагировали водой в соотношении 1 : 30 на кипящей водяной бане трехкратно. Водные вытяжки концентрировали под вакуумом до объема 200 мл. К водному остатку приливали 95%-ный этанол (1 : 10) и оставляли на 2 ч. Выпавший осадок центрифугировали при 6000 г, промывали 70%- и 95%-ным этанолом и высушивали. Получено 12.20 г, фракция ЛФ-6. Супернатант после удаления ЛФ-6 концентрировали под вакуумом до суха. Получено 4.40 г, фракция ЛФ-7.

Химический анализ фракций. Во фракциях *L. sulphureus* определяли общее содержание фенольных соединений (ОФС) по методу Фолина [14] в пересчете на галловую кислоту, общее содержание флавоноидов (ОФЛ) методом спектрофотометрии [15] в пересчете на кверцетин, общее содержание каротиноидов (ОКР) методом хромато-спектрофотометрии [16] в пересчете на латипоровую кислоту А ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 635$ при 450 нм) и общее содержание водорастворимых полисахаридов (ОПС) антрон-серным методом [17] в пересчете на глюкозу.

Антиоксидантная активность. Общий антиоксидантный потенциал (ОАП) определяли молибдатным методом [18], антирадикальную активность (АРА) — с применением стабильного свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) по методу [19], восстановительную способность (ВС) — по методу [20].

Пероксидная деградация β-каротина (ПДБК) в системе олеиновая кислота—ДМСО—Н₂О₂. 2 мг β-каротина, 16 мг олеиновой кислоты и 160 мг Тритона X-100 растворяли в 50 мл хлороформа, после чего органический растворитель удаляли под вакуумом при 30°C. Остаток растворяли в бидистиллированной воде, раствор переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки бидистиллированной водой. Для приготовления реакционной смеси в пробирку с пробкой со шлифом вносили 0.2—1.0 мл исследуемого раствора, 2 мл ДМСО, 2 мл раствора β-каротина и 2 мл 3%-ного раствора Н₂О₂. Общий объем раствора доводили до 8 мл бидистиллированной водой. Полученную смесь термостатировали при 50°C в течение 120 мин. Оптическую плотность исследуемого раствора определяли при 460 нм, используя в качестве раствора сравнения бидистиллированную воду.

Выделение и идентификация компонентов фракции ЛФ-3. Фракцию ЛФ-3 (1 г) разделяли с применением колоночной хроматографии на силикагеле (2 × 40 см) с использованием в качестве элюента градиентной системы хлороформ—метанол (100 : 0 → 70 : 30, по объему). Полученные фракции рехроматографировали на Сефадексе LH-20 (“Pharmacia”, Швеция, колонка 2 × 60 см) с использованием в

качестве элюента градиентной системы метанол—вода (100 : 0 → 0 : 100, по объему). Контроль по разделению фракций проводили с использованием высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Подфракции дополнительно очищали с применением препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле в системах растворителей петролейный эфир—диэтиловый эфир (1 : 2) и толуол—этилацетат—муравьиная кислота (5 : 4 : 1). В результате хроматографического разделения из фракции ЛФ-3 выделено 7 соединений: ЛФ-3/1 (12 мг), ЛФ-3/2 (4 мг), ЛФ-3/3 (3 мг), ЛФ-3/4 (12 мг), ЛФ-3/5 (4 мг), ЛФ-3/6 (15 мг) и ЛФ-3/7 (8 мг). Идентификацию выделенных соединений проводили по данным температуры плавления, МС, УФ-, ИК- и ¹³С-ЯМР-спектроскопии.

1. ЛФ-3/1 (4-гидроксикоричная кислота, п-кумаровая кислота). Т. пл. 207°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 230, 298 пл, 310. МС (*m/z*): 164 [M]⁺. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3395, 3031, 2845, 1679, 1630, 1604, 1514, 1451, 1424, 1380, 1329, 1315, 1285, 1175, 1217, 1175, 1106, 980, 944, 861, 832, 797, 690. ¹³С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*₆, δ/м.д.): 115.1 (С-8), 116.3 (С-3, С-5), 125.0 (С-1), 130.2 (С-2, С-6), 144.6 (С-7), 157.8 (С-4), 168.6 (СООН).

2. ЛФ-3/2 (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван, кверцетин). Т. пл. >300°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 255, 268, 370. МС (*m/z*): 302 [M]⁺. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3418, 3290, 1670, 1615, 1512, 1457, 1429, 1354, 1315, 1242, 1211, 1162, 1139, 1094, 999, 932, 879, 848, 818, 787, 771, 706, 690. ¹³С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*₆, δ/м.д.): 93.7 (С-8), 98.5 (С-6), 104.8 (С-4а), 115.2 (С-2'), 116.0 (С-5'), 122.0 (С-1'), 122.5 (С-6'), 134.6 (С-3), 145.3 (С-3'), 147.3 (С-2), 148.8 (С-4'), 146.3 (С-8а), 161.5 (С-5), 164.7 (С-7), 178.5 (С-4).

3. ЛФ-3/3 (3,5,7,4'-тетрагидроксифлаван, кемпферол). Т. пл. >300°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 265, 368. МС (*m/z*): 286 [M]⁺. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3422, 2929, 1655, 1606, 1567, 1511, 1441, 1369, 1316, 1254, 1223, 1174, 1116, 1087, 1007, 977, 886, 838, 704, 636. ¹³С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*₆, δ/м.д.): 94.4 (С-8), 99.0 (С-6), 103.9 (С-4а), 116.2 (С-3',5'), 123.4 (С-1'), 130.4 (С-2',6'), 136.5 (С-3), 147.6 (С-2), 157.9 (С-5), 160.3 (С-9), 162.2 (С-4'), 165.2 (С-7), 176.7 (С-4).

4. ЛФ-3/4 (3,4-дигидроксикоричная кислота, кофейная кислота). Т. пл. 202°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 247, 300, 330. МС (*m/z*): 180 [M]⁺. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3401, 3217, 1641, 1597, 1528, 1445, 1374, 1351, 1293, 1273, 1211, 1171, 1117, 969, 934, 893, 848, 813, 800, 776, 736, 697. ¹³С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*₆, δ/м.д.): 114.7 (С-8), 114.9 (С-2), 115.6 (С-5), 121.2 (С-6), 125.7 (С-1), 145.0 (С-3), 148.2 (С-4), 144.2 (С-7), 169.2 (СООН).

5. ЛФ-3/5 [3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван, (+)-катехин]. Т. пл. 175°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 220, 277. [α]_D +15°. МС (*m/z*): 290 [M]⁺. ИК-спектр

(ν , см^{-1}): 3260, 1604, 1519, 1457, 1366, 1282, 1234, 1180, 1144, 1110, 1076, 1026, 976, 866, 820, 763., ^{13}C -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- d_6 , $\delta/\text{м.д.}$): 27.9 (C-4), 83.2 (C-2), 68.4 (C-3), 95.0 (C-8), 95.9 (C-6), 100.4 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.0 (C-5'), 120.2 (C-6'), 132.4 (C-1'), 146.3 (C-3', C-4'), 157.4 (C-5), 156.9 (C-8a), 158.2 (C-7).

6. ЛФ-3/6 (3,4,5-тригидроксibenзойная кислота, галловая кислота). Т.пл. 248°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 220, 263. МС (m/z): 170 $[\text{M}]^+$. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3263, 1655, 1607, 1579, 1560, 1524, 1509, 1489, 1459, 1425, 1386, 1316, 1256, 1219, 1096, 1024, 958, 900, 865, 799, 767, 733, 685, 634. ^{13}C -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- d_6 , $\delta/\text{м.д.}$): 108.9 (C-2, C-6), 121.0 (C-1), 138.1 (C-4), 144.8 (C-3, C-5), 167.4 (COOH).

7. ЛФ-3/7 [5-(3',4'-дигидроксициннамоил)-хинная кислота, 5-кофеил-хинная кислота]. Т.пл. 220°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 240, 301 пл., 331. МС (m/z): 354 $[\text{M}]^+$. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3338, 1685, 1637, 1599, 1516, 1441, 1321, 1284, 1249, 1181, 1157, 1131, 1110, 1085, 1034, 969, 906, 852, 817, 767, 739. ^{13}C -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- d_6 , $\delta/\text{м.д.}$)* : 36.0 (C-2^{Хин}), 37.2 (C-6^{Хин}), 68.4 (C-4^{Хин}), 70.2 (C-5^{Хин}), 71.9 (C-3^{Хин}), 73.0 (C-1^{Хин}), 114.3 (C-8^{Коф}), 114.9 (C-5^{Коф}), 115.7 (C-2^{Коф}), 121.2 (C-6^{Коф}), 125.4 (C-1^{Коф}), 145.2 (C-7^{Коф}), 145.6 (C-3^{Коф}), 148.0 (C-4^{Коф}), 166.2 (C-9^{Коф}), 175.6 (COOH^{Хин}).

Анализ ВЭТСХ. Использовали пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В ("Имид Ltd.", Россия) 15 × 10 см. По 2 мкл исследуемого раствора и 0.1%-ных растворов стандартных веществ наносили микрошприцем на стартовую линию пластины полосами 8 мм. Далее образцы хроматографировали в системе растворителей толуол–метанол–уксусная кислота (45 : 8 : 4) при 20°C в вертикальной камере на высоту 60 мм, после чего пластины высушивали, обрабатывали методом погружения в 0.03%-ный раствор красителя Прочного синего Б в смеси дихлорэтан–метанол (5 : 1) и высушивали в токе воздуха в течение 10 с. Денситограммы получали с использованием планшетного сканера Bear Paw 2400CU Plus ("Mustek System Inc.", Япония) и пакета программ Сорбфил ТСХ Видеоденситометр 2.0 ("Имид Ltd.", Россия).

ВЭТСХ/ДФПГ-аутография. Анализ проводили в условиях, аналогичных ВЭТСХ, с использованием в качестве системы смесь растворителей толуол–этилацетат–муравьиная кислота (5 : 4 : 1). Для проявления применяли 0.05%-ный раствор ДФПГ в метаноле. Полученные хроматограммы сканировали через 20 мин после проявления.

Спектроскопические исследования. Исследования проводили на спектрофотометре UV-Vis mini ("Shimadzu", Япония) в кварцевых кюветах 10 мм.

* Хин – остаток хинной кислоты,
Коф – остаток кофейной кислоты.

МС-анализ. Анализ проводили на масс-спектрометре высокого разрешения МАТ 8200 ("Finnigan", США).

ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 ("Симекс", Россия) с использованием универсальной приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, "Симекс", Россия) в интервале 4000–600 см^{-1} на кристалле-подложке из селенида цинка.

Спектроскопия ЯМР. Спектры ^{13}C -ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S ("Varian", США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ных растворов в ДМСО- d_6 .

Анализ ВЭЖХ. Проводили на жидкостном хроматографе Summit ("Dionex", США) на колонке Prodigy ODS 3 (250 × 4.6 мм, 5 мкм, "Phenomenex", США). Подвижная фаза – смесь 0.1%-ного водного раствора ТФУ (А) и ацетонитрила (Б) в условиях линейного градиента концентрации А : Б (10 : 90) → (70 : 30) от 0 до 30 мин, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, температура колонки 20°C. Детектирование проводили с использованием УФ-детектора UVD 170S ("Dionex", США) при 280 нм.

Регрессионный анализ. Выполняли с применением пакета программ Advanced Grapher 2.11 ("Alentum Software Inc.", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследования антиоксидантной активности *L. sulphureus* экстрактивные вещества плодовых тел данного базидиального вида были подвергнуты предварительному фракционированию, в ходе которого получено 7 фракций: гексановая (ЛФ-1), хлороформная (ЛФ-2), этилацетатная (ЛФ-3), бутанольная (ЛФ-4), полисахаридная (ЛФ-6) и две водные фракции (ЛФ-5 и ЛФ-7). Наибольший выход наблюдался для фракций ЛФ-5 (3.77%) и ЛФ-6 (1.74%), наименьший – для ЛФ-3 (0.20%) и ЛФ-2 (0.30%). Изучение химического состава полученных фракций показало, что максимальное накопление фенольных соединений и флавоноидов характерно для фракции ЛФ-3 (174.73 и 90.77 мг/г соответственно), каротиноидов – для фракции ЛФ-2 (1.099 мг/г), а полисахаридов – для фракции ЛФ-6 (45.74 мг/г) (табл. 1).

Определение фракции, обладающей наибольшей антиоксидантной активностью, проводили с применением ДФПГ-метода (табл. 1). Установлено, что активность исследуемых фракций распределяется следующим образом: ЛФ-3 ($\text{IC}_{50} = 74.98$ мкг/мл) > ЛФ-4 > ЛФ-2 > ЛФ-7 > ЛФ-5 > ЛФ-1 > ЛФ-6 ($\text{IC}_{50} > 2000$ мкг/мл). Применение регрессионного анализа показало, что присутствие фенольных соединений оказывало выраженное влияние на проявление антиоксидантного действия фракций (рис. 1). Величины коэффициента корреляции для уравне-

Таблица 1. Химический состав и антирадикальная активность фракций *L. sulphureus*

Фракция	Выход, %*	ОФС, мг/г	ОФЛ, мг/г	ОКР, мг/г	ОПС, мг/г	ДФПГ, IC ₅₀ мкг/мл
ЛФ-1	0.61	0.74 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.120 ± 0.002	н.о.**	1080.01 ± 21.63
ЛФ-2	0.30	22.57 ± 0.68	14.82 ± 0.44	1.099 ± 0.021	н.о.	334.85 ± 6.70
ЛФ-3	0.20	174.73 ± 5.24	90.77 ± 2.72	н.о.	н.о.	74.98 ± 1.49
ЛФ-4	0.51	44.03 ± 1.32	27.14 ± 0.81	н.о.	н.о.	229.79 ± 4.58
ЛФ-5	3.77	7.23 ± 0.22	5.28 ± 0.16	н.о.	н.о.	783.75 ± 15.67
ЛФ-6	1.74	н.о.	н.о.	н.о.	45.74 ± 0.82	>2000
ЛФ-7	0.63	11.70 ± 0.35	9.22 ± 0.27	н.о.	н.о.	687.33 ± 13.75

* От массы возд.-сух. сырья. ** Не обнаружено.

ний зависимости антиоксидантной активности от содержания фенольных соединений составляли 0.7426 и 0.7710 соответственно для общего содержания фенольных соединений и общего содержания флавоноидов.

Более детальное химическое исследование было проведено для фракции ЛФ-3. С применением колоночной хроматографии на силикагеле и Сефадексе LH-20 с последующей препаративной хроматографией было выделено семь соединений (ЛФ-3/1–ЛФ-3/7), которые, по результатам ВЭТСХ/ДФПГ-автографии, оказывали наиболее выраженное антиоксидантное действие (рис. 2). Согласно данным по температуре плавления, МС, УФ-, ИК- и ¹³С-ЯМР-спектроскопии соединения были идентифицированы, как п-кумаровая кислота (ЛФ-3/1), кверцетин (ЛФ-3/2), кемпферол (ЛФ-3/3), кофейная кислота (ЛФ-3/4), (+)-катехин (ЛФ-3/5), галловая кислота (ЛФ-3/6) и 5-кофеилхинная кислота (ЛФ-3/7) (рис. 3). Все вещества были выделены из плодовых тел *L. sulphureus* впервые. Ранее данные соединения были обнаружены в плодовых телах других видов ле-

карственных и пищевых грибов: п-кумаровая кислота – *Sparassis crispa*, кофейная кислота – *Flammulina velutipes*, *Phellinus linteus*, *S. crispa*, галловая кислота – *Agaricus bisporus*, *A. blazei*, *F. velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edoles*, *P. linteus*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *S. crispa*, 5-кофеилхинная кислота – *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *S. crispa*, (+)-катехин – *A. blazei*, *G. lucidum*, *L. edoles*, кверцетин – *A. blazei*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, (*S. crispa*, кемпферол – *Inonotus obliquus*, *G. lucidum*, *S. crispa* [21].

Для всех выделенных соединений характерна антиоксидантная активность разной степени выраженности (табл. 2). Наиболее активным радикалсвязывающим действием обладала галловая кислота (ЛФ-3/6; IC₅₀ = 0.98 мкг/мл), а наиболее эффектив-

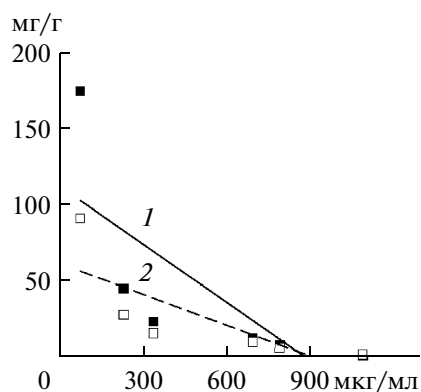


Рис. 1. Графики корреляционных зависимостей антиоксидантная активность (IC₅₀, мкг/мл)–содержание фенольных соединений (мг/г): 1 – общее содержание фенольных соединений ($y = -0.129x + 111.910$), 2 – общее содержание флавоноидов ($y = -0.068x + 60.837$).

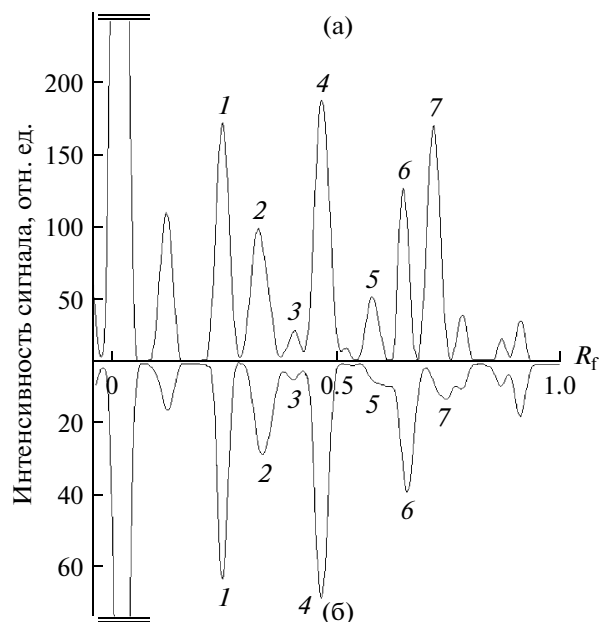


Рис. 2. Денситограммы фракции ЛФ-3 после обработки Прочным синим Б солью (а) и ДФПГ (б): 1 – хлорогеновая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – кемпферол, 4 – галловая кислота, 5 – кверцетин, 6 – кофейная кислота, 7 – п-кумаровая кислота.

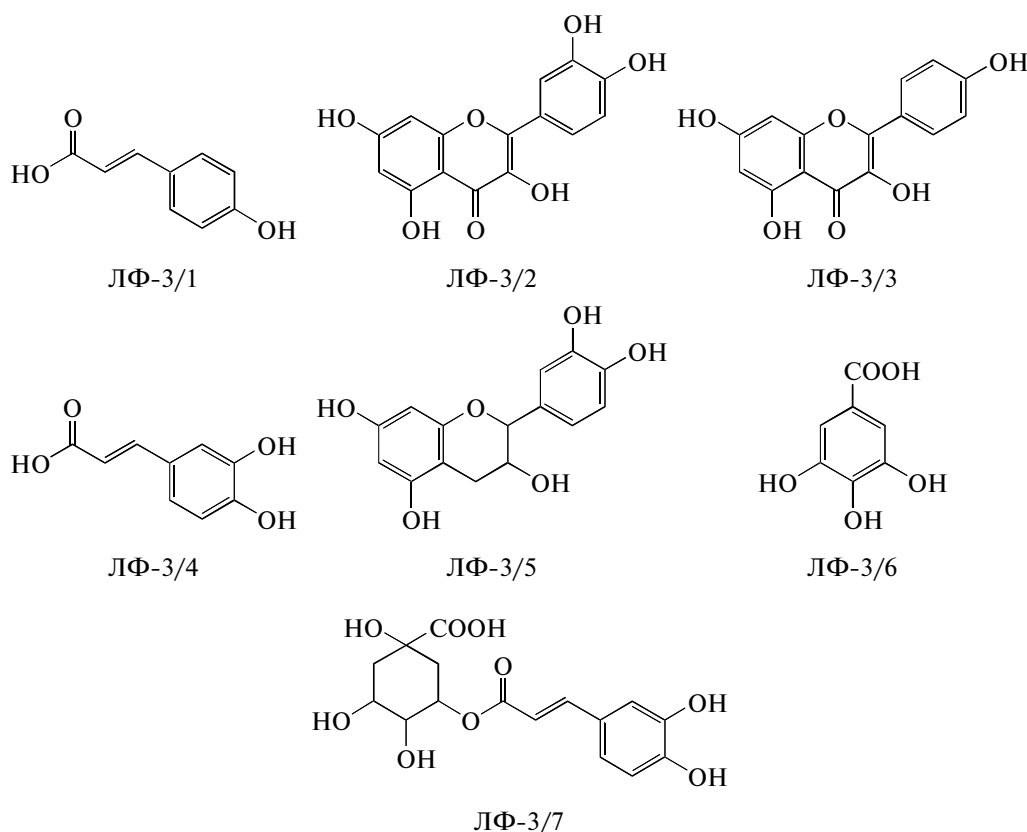


Рис. 3. Структурные формулы выделенных соединений.

ным протектором β -каротина при его пероксидной деструкции был кверцетин (ЛФ-3/2; $IC_{50} = 6.02$ мкг/мл).

Количественный анализ выделенных соединений проводили с применением метода ВЭЖХ (рис. 4). Установлено, что содержание кверцетина, кемпферола, (+)-катехина, галловой, хлорогеновой, кофейной и п-кумаровой кислот во фракции ЛФ-3 составляет 11.37 ± 0.27 , 5.01 ± 0.12 , 14.04 ± 0.38 , 28.57 ± 0.68 , 22.61 ± 0.54 , 20.07 ± 0.52 и 18.84 ± 0.47 мг/г соответственно; содержание указанных соединений в

плодовых телах *L. sulphureus* (образец № Л-1Х) – 1.12 ± 0.03 , 0.87 ± 0.02 , 4.7 ± 14 , 15.97 ± 0.45 , 9.73 ± 0.26 , 8.43 ± 0.21 и 8.02 ± 0.20 мкг/г соответственно. Общее содержание идентифицированных соединений во фракции ЛФ-3 и плодовых телах *L. sulphureus* – 120.51 мг/г и 48.85 мкг/г соответственно.

Исследование химического состава и антиоксидантной активности спиртовых (70%-ный этанол) вытяжек из плодовых тел *L. sulphureus*, полученных с применением метода природных плантаций в

Таблица 2. Антиоксидантная активность фенольных соединений, выделенных из *L. sulphureus*

Соединение	ДФПГ, IC_{50} , мкг/мл	ПДБК, IC_{50} , мкг/мл
<i>n</i> -Кумаровая кислота (ЛФ-3/1)	9.07 ± 0.27	30.75 ± 0.92
Кверцетин (ЛФ-3/2)	9.95 ± 0.20	6.02 ± 0.18
Кемпферол (ЛФ-3/3)	24.88 ± 0.75	15.23 ± 0.46
Кофейная кислота (ЛФ-3/4)	11.63 ± 0.34	42.89 ± 1.29
(+)-Катехин (ЛФ-3/5)	14.64 ± 0.42	133.68 ± 4.01
Галловая кислота (ЛФ-3/6)	0.98 ± 0.03	12.30 ± 0.37
5-Кофеилхинная кислота (ЛФ-3/7)	22.16 ± 0.61	50.12 ± 1.51

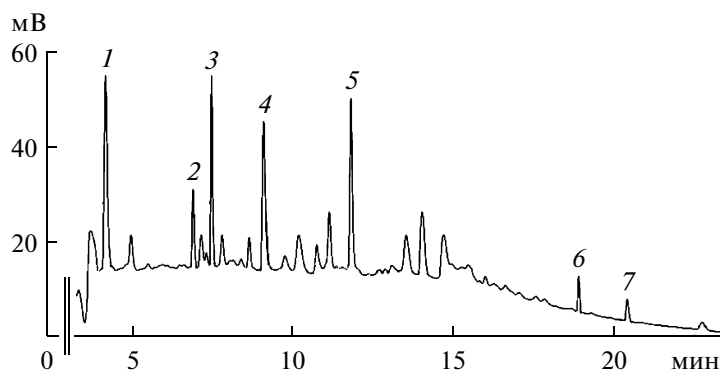


Рис. 4. Хроматограмма (ВЭЖХ) фракции ЛФ-3. Идентифицированные соединения: 1 – галловая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – хлорогеновая кислота, 4 – кофейная кислота, 5 – п-кумаровая кислота, 6 – кверцетин, 7 – кемпферол.

3 районах Иркутской области показало, что общее содержание фенольных соединений в сырье составило 1.44–5.34 мг/г, а общее содержание флавоноидов – 1.01–4.12 мкг/г (табл. 3).

Показатели общей антиоксидантной емкости – 105.41–354.73 мг/г, антирадикальной активности – 98.16–904.04 мкг/мл и восстановительной способности – 8.14–377.04 мМ Fe²⁺/г. Спиртовые вытяжки *L. sulphureus* оказывали выраженное защитное действие на модели пероксидной деструкции β-каротина: значения IC₅₀ находятся в диапазоне 71.14–167.28 мкг/мл. Применение корреляционного анализа показало, что для всех исследованных пар антиоксидантная активность–химический состав наблюдается удовлетворительная линейная зависимость со значениями коэффициента корреляции >0.6 (табл. 4).

Наличие фенольных соединений оказывало наибольшее влияние на показатели общего антиоксидантного потенциала и восстановительной способности.

Максимальные показатели содержания и активности характерны для плодовых тел *L. sulphureus*, собранных с плантаций Усть-Кутского района (сырье № Л-VIII, Л-IX, Л-X, табл. 3). Учитывая сведения о климатических условиях данного района, относящегося к среднетаежным ландшафтам, можно предположить, что определяющим фактором на характер накопления соединений оказывает температурный режим. Благодаря высокой теплообеспеченности в дневное время в данной местности образуется температурный оптимум для развития и плодоношения *L. sulphureus*. В то же время низкие ночные температуры, являющиеся неблагоприятными для гриба-термофила, приводят к накоплению компонентов

Таблица 3. Химический состав и антиоксидантная активность этанольных вытяжек *L. sulphureus*

Сырье*	ОФС, мг/г	ОФЛ, мкг/г	ОАП, мг/г	ДФПГ, IC ₅₀ , мкг/мл	ВС, мМ Fe ²⁺ /г	ПДБК, IC ₅₀ , мкг/мл
Л-1	1.94	1.26	111.32	365.32	10.84	153.88
Л-II	1.44	1.01	105.41	904.04	8.14	167.28
Л-III	1.89	1.21	118.69	403.49	20.60	142.98
Л-IV	2.10	2.66	210.00	708.44	136.12	117.50
Л-V	2.08	1.29	126.20	424.87	23.32	162.88
Л-VI	2.94	1.63	222.55	222.73	248.68	79.67
Л-VII	3.74	2.77	254.11	174.33	264.11	71.14
Л-VIII	5.34	4.12	354.73	98.16	377.04	50.12
Л-IX	4.87	3.47	304.57	104.75	322.47	58.14
Л-X	4.52	3.31	271.67	120.72	297.48	69.35

* Дата и место сбора плодовых тел: с. Быстрая, Слюдянский район – Л-1 (20.VIII.2005), Л-II (18.VIII.2006), Л-III (21.VIII.2007); пос. Большое Голоустное, Иркутский район – Л-IV (19.VIII.2005), Л-V (18.VIII.2006), Л-VI (25.VIII.2007), Л-VII (20.VIII.2008); г. Усть-Кут, Усть-Кутский район – Л-VIII (19.VIII.2005), Л-IX (20.VIII.2006), Л-X (21.VIII.2007).

Таблица 4. Уравнения регрессии и коэффициенты корреляции (r) зависимости антиоксидантной активности (ОАП, ДФПГ, ВС, ПДБК) от химического состава (ОФС, ОФЛ)

Показатель	ОАП	ДФПГ	ВС	ПДБК
ОФС	$y = 59.82x + 23.31$ $r = 0.9526$	$y = -156.68x + 836.20$ $r = 0.8184$	$y = 97.77x - 130.84$ $r = 0.9474$	$y = -30.29x + 200.75$ $r = 0.9270$
ОФЛ	$y = 75.98x + 35.21$ $r = 0.9595$	$y = 149.29x + 692.02$ $r = 0.6183$	$y = 117.83x - 96.95$ $r = 0.9053$	$y = 36.30x + 186.81$ $r = 0.8811$

фенольной природы, наличие которых оказывает первостепенное значение на проявление антиоксидантной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 08-04-98045).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wasser S.P., Weis A.L. // Int. J. Med. Mushrooms. 1999. V. 1. № 1. P. 31–62.
2. Zjawiony J.K. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. № 2. P. 300–310.
3. Raduc N., Injac R., Strukelj B. // Int. J. Med. Mushrooms. 2009. V. 11. № 2. P. 103–116.
4. Kang Ch.Y., Lee Ch.O., Chung K.S., Choi E., Kim B.K. // Arch. Pharm. Res. 1982. V. 5. № 2. P. 39–43.
5. Kanska G., Guillot J., Dusser M., Damez M., Botton B. // J. Biochem. 1994. V. 116. № 3. P. 519–523.
6. Okamura T., Takeno T., Fukuda Sh., Mohri A., Noda A., Iemoto A., Horie N., Ohsugi M. // Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci. 2000. V. 48. № 1. P. 65–68.
7. Okamura T., Takeno T., Dohi M., Yasumasa I., Hayashi T., Toyoda M., Noda K., Fukuda S., Horie N., Ohsugi M. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 89. № 5. P. 474–478.
8. Leon F., Quintana J., Rivera A., Estevez F., Bermejo J. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. № 12. P. 2008–2011.
9. Yoshikawa K., Bando S., Arihara S., Matsumura E., Katayama S. // Chem. Pharm. Bull. 2001. V. 49. № 3. P. 327–329.
10. Keller C., Maillard M., Keller J., Hostettmann K. // Pharm. Biol. 2002. V. 40. № 7. P. 518–525.
11. Turkoglu A., Duru E.M., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. // Food Chem. 2007. V. 101. № 2. P. 267–273.
12. Hwang H.S., Lee S.H., Baek Y.M., Kim S.W., Jeong Y.K., Yun J.W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. № 3. P. 419–429.
13. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Borovskii G.B., Penzina T.A., Rokhin A.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 5. P. 536–543.
14. Vermerris W., Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. N.Y.: Springer, 2006. P. 151–196.
15. Gálvez M., Martín-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1927–1933.
16. Ren D., Zhang Sh. // Food Chem. 2008. V. 106. № 1. P. 410–414.
17. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Samuelsen A.B. // Chem. Natural Comp. 2006. V. 42. № 3. P. 265–268.
18. Preto P., Pineda M., Aguilar M. // Anal. Biochem. 1999. V. 269. № 2. P. 337–341.
19. Lee Y., Howard L.R., Villalon B. // J. Food Sci. 1995. V. 60. № 3. P. 473–476.
20. Mathew S., Ablaham T.E. // Food. Chem. 2006. V. 94. № 2. P. 520–528.
21. Kim M.-Y., Seguin Ph., Ahn J.-K., Kim J.-J., Chun S.-Ch., Kim E.-H., Seo S.-H., Kang E.-Y., Kim S.-L., Park Y.-J., Ro H.-M., Chung I.-M. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 16. P. 7265–7270.

Antioxidant Components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. Fruit Bodies

D. N. Olennikov^a, L. M. Tankhaeva^a, and S. V. Agafonova^b

^a Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Sakhyanovoi 6, Ulan-Ude, Buryatia Republic, 670047 Russia

e-mail: oldaniil@rambler.ru

^b Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Lermontova 137, Irkutsk, 664033 Russia

Received September 22, 2010

Abstract—Antioxidant activity of fruit bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (Polyporales) obtained by the natural plantation growing method in Pribaikal'e (Irkutsk region) has been studied. It was determined that the ethyl acetate fraction of *L. sulphureus*, which was chromatographically separated into seven compounds identified as quercetin, kaempferol, (+)-catechin, *p*-coumaric, gallic, caffeic, and chlorogenic acids was characterized with more expressed antioxidant activity. All compounds were extracted from this basidiomycete species for the first time. The quantitative amount of the substances isolated from *L. sulphureus* was determined by HPLC. It was found that antioxidant activity of preparations obtained from *L. sulphureus* is conditioned by phenolic compounds.