

Методика оценки фотозащитных свойств экстрактов из макромицетов

О.М. ХРАМЧЕНКОВА

Исследовали фотозащитные свойства экстрактов из плодовых тел культивируемых и дикорастущих макромицетов. Применяли экстрагирование по Сокслету с использованием органических растворителей в качестве экстрагентов. На основе определения растворимости экстрактов в этаноле, измерения оптической плотности растворов в области ультрафиолета Б (290 ÷ 320 нм), изучения спектров поглощения растворов экстрактов в диапазоне 290 ÷ 400 нм предложена методика оценки фотозащитных свойств экстрактов из макромицетов с возможностью выявления минимальной концентрации, обеспечивающей фотозащитный эффект.

Ключевые слова: макромицеты, плодовые тела, экстракты, растворимость в этаноле, ультрафиолет, спектры поглощения, параметры фотозащиты.

The photoprotective properties of extracts from the fruiting bodies of cultivated and wild macromycetes were studied. Soxhlet extraction was applied using organic solvents as extractants. The solubility of the extracts in ethanol was determined, the optical density of the solutions in the ultraviolet B region (290 ÷ 320 nm) was measured, and the absorption spectra of the extract solutions were studied in the range of 290 ÷ 400 nm. As a result, a method has been proposed for assessing the photoprotective properties of extracts from macromycetes with the ability to identify the minimum concentration that provides a photoprotective effect.

Keywords: macromycetes, fruiting bodies, extracts, solubility in ethanol, ultraviolet, absorption spectra, photoprotection parameters.

Введение. В последние десятилетия культивируемые и дикорастущие макромицеты находятся в центре внимания исследователей в качестве источника уникальных биологически активных веществ, что обуславливает их возможное применение в косметической промышленности. Для плодовых тел и мицелия культивируемых макромицетов показано наличие высоких концентраций полисахаридов, различных фенольных соединений, терпеноидов, витаминов и многих других соединений. Многие из них в отношении кожи человека обладают хорошими антиоксидантными, противовоспалительными, антибактериальными, противовирусными и иными свойствами [1], [2]. Технологии выращивания мицелия и плодовых тел макромицетов хорошо разработаны, базируются на использовании местных отходов лесного и сельского хозяйства, пищевой и текстильной промышленности. Получаемые из культивируемых грибов вещества все более активно используются в косметологии, в том числе – солнцезащитной [3].

В настоящей работе нами обобщен опыт получения экстрактов из макромицетов с использованием органических растворителей и определения их фотозащитных свойств [4], [5]. Оговоримся, что водные экстракты из плодовых тел макромицетов представляют собой субстанции принципиально иного состава, чем полученные с использованием ацетона, бензола, метанола или любого другого органического растворителя.

Полученный экстракт нуждается в отгонке растворителя и высушивании до твердого состояния. Здесь возможны методические трудности, связанные с тем, что далеко не все экстракты из плодовых тел макромицетов, полученные с использованием органических растворителей различной полярности, при высушивании становятся твердыми и измельчаются до порошкообразного состояния. Экстракты бывают смолоподобными, в силу чего их следует высушивать, распределяя на подложке тонким слоем и постоянно перемешивая, до достижения постоянной массы при условиях сушки. До использования можно рекомендовать хранение экстрактов в герметичных емкостях при низких температурах (например, минус 18 °С).

В зависимости от вида дальнейшего исследования, экстракты из плодовых тел макромицетов растворяют в том или ином растворителе. В случае определения фотозащитных свойств экстракта, его растворяют в 96 % этаноле, при этом раствор не бывает прозрачным – сухой экстракт никогда полностью не растворяется даже в растворителе, при помощи которого он был получен. Следовательно, следующей задачей является отделение нерастворимой

части экстракта и последующее определение концентрации получаемого раствора, на основании чего возможно приготовление целевых растворов (200 мкг/мл). Именно такую концентрацию экстракта рекомендовано использовать для спектрофотометрического определения величин солнцезащитного фактора SPF (Sun Protection Factor), а также критической длины волны ($\lambda_{\text{крит}}$) и показателя широты фотозащиты в диапазонах ультрафиолета Б (УФ-Б, 280 ÷ 320 нм) и ультрафиолета А (УФ-А, 320 ÷ 400 нм) [6], [7].

Прежде чем изучать фотозащитные свойства растворов экстрактов из плодовых тел макромицетов с концентрацией 200 мкг/мл, целесообразно получить их спектры поглощения в диапазоне 290 ÷ 400 нм, убедиться в том, что значения оптических плотностей растворов не выходят за пределы шкалы спектрофотометра. Для растворов экстрактов из плодовых тел макромицетов такое вполне возможно. В этом случае необходимо доказать линейности зависимости оптической плотности растворов экстрактов от их концентрации, а также установить параметры данной зависимости, что позволит вычислить искомые значения показателей фотозащитности для заданной концентрации целевого раствора.

Методы исследований. Образцы плодовых тел грибов были получены из лаборатории микологии кафедры лесохозяйственных дисциплин биологического факультета Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. Навески воздушно-сухой биомассы экстрагировали ацетоном, бензолом, метанолом и этанолом по Сокслету, растворители отгоняли, экстракты высушивали при комнатной температуре. Опытным путем установлено, что для ацетоновых экстрактов вклад несрастворимой в этаноле фракции составлял 23,1 ÷ 29,9 процентов массы экстракта; для бензольных – 29,1 ÷ 42,2 %; для метанольных – 13,3 ÷ 15,6 %; для этанольных – 9,8 ÷ 14,8 %. Повторность всех операций – пятикратная, средство измерения – спектрофотометр Solar PB 2201, измерительные кюветы – кварцевые, длина оптического пути 10 мм. Анализ результатов исследования осуществляли с помощью программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Предлагаемая методика распространяется на экстракты из плодовых тел культивируемых и дикорастущих макромицетов, полученные путем экстракции по Сокслету с использованием ацетона, бензола, метанола и этанола в качестве растворителя и представляет собой метод *in vitro* определения SPF (Sun Protection Factor – солнцезащитного фактора), значения критической длины волны ($\lambda_{\text{крит}}$) и показателя ширины солнцезащиты (УФ-А/УФ-Б).

Термины и определения [8]–[10]. Спектрофотометр (spectrophotometer) – прибор, который измеряет свойства поглощения (или пропускания) испытуемой среды в зависимости от длины волны.

Ультрафиолетовое излучение типа В (ultraviolet В, UVB): Электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 290 до 320 нм.

Ультрафиолетовое излучение типа А (ultraviolet А, UVA): Электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 320 до 400 нм.

SPF – Sun Protection Factor (солнцезащитный фактор) – сила защитного действия косметического продукта от УФ-Б-излучения. Показывает во сколько раз увеличивается минимальная эритемная доза при использовании данного солнцезащитного средства. Уровень фотозащиты субстанции считается низким при SPF = 2–6; средним – при SPF = 8–12; высоким – при SPF = 15–25; очень высоким – при SPF = 30–50; сверхвысоким – при SPF > 50 [7].

Величина критической длины волны ($\lambda_{\text{крит}}$) – значение, при котором площадь под кривой спектра поглощения анализируемой субстанции в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм достигает 90 % от максимального значения. Шкала эффективности солнцезащитных средств: 0 ($\lambda_{\text{крит}} < 325$); 1 ($325 < \lambda_{\text{крит}} < 335$); 2 ($335 < \lambda_{\text{крит}} < 350$); 3 ($350 < \lambda_{\text{крит}} < 370$) и 4 ($370 < \lambda_{\text{крит}}$). Субстанции с длиной $\lambda_{\text{крит}}$ более 370 нм и SPF > 15,0 признаются солнцезащитными [7], [9].

УФ-А/УФ-Б – мера широты защитных свойств анализируемых субстанций. По величине УФ-А/УФ-Б солнцезащитные средства делятся на слабые (0 ÷ 0,2); средние (0,2 ÷ 0,4); хорошие (0,4 ÷ 0,6); превосходные (0,6 ÷ 0,8) и максимальные ($\geq 0,8$) [9].

Сущность метода. Метод основан на экстракции по Сокслету измельченной воздушно-сухой массы плодовых тел культивируемых и дикорастущих макромицетов с отгонкой растворителя и высушиванием экстракта, последующим растворением экстракта в этаноле, спектрофотометрическим определением спектра поглощения растворов, расчетом показателей фотозащиты.

Средства измерения, оборудование, вспомогательные материалы, посуда, реактивы. Спектрофотометр с диапазоном измерений $200 \div 1000$ нм, точностью ± 1 нм; шкаф сушильный лабораторный; шкаф вытяжной лабораторный; мельница лабораторная для размола твердых веществ, сухих растительных проб с влажностью не более 10 %; весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания $\pm 0,0005$ г; экстрактор Сокслета; испаритель ротационный вакуумный; дозаторы автоматические; чашки выпарительные; колбы мерные объемом 25 мл, 50 мл и 100 мл; кюветы кварцевые с длиной оптического пути 10 мм; вода дистиллированная; ацетон; бензол; метанол; спирт этиловый; бумага фильтровальная лабораторная.

Подготовка к анализу. Образцы плодовых тел макромицетов высушивают до постоянной массы при температуре 45°C , после чего измельчают.

Экстракция по Сокслету. Навеску высушенной и измельченной биомассы плодовых тел макромицетов помещают в готовый патрон или заворачивают в фильтровальную бумагу, помещают в экстрактор. Размер образца должен составлять около половины высоты экстрактора. Соответствующий растворитель наливают в колбу на $2/3$ ее объема. В колбу укрепляют экстрактор, к верхней части которого присоединяют обратный холодильник. Нагрев аппарата Сокслета следует вести с учетом температуры кипения используемого растворителя. После 20 циклов работы аппарата Сокслета контролируют полноту экстракции. Для этого при помощи капилляра из экстрактора извлекают каплю растворителя, испаряют ее на предметном стекле. Отсутствие пятен экстракта на стекле свидетельствует об исчерпывающем экстрагировании сырья.

Получение экстрактов. Содержимое колбы аппарата Сокслета переносят в ротационный вакуумный испаритель, при помощи которого отгоняют растворитель. Экстракт переносят в выпарительную чашку, где при комнатной температуре в вытяжном шкафу досушивают экстракт до постоянной массы. Полученный экстракт взвешивают, определяют его химический выход как процент от массы экстрагированного образца, после чего помещают в герметичную емкость из химически инертного материала и хранят до анализа при минус $15 \div 18^\circ\text{C}$.

Приготовление растворов экстрактов. Взвешивают 1 г экстракта, переносят в колбу, разбавляют этанолом до объема 100 мл, хорошо встряхивают, фильтруют через предварительно взвешенный бумажный фильтр. Фильтр с не растворившейся долей экстракта высушивают, повторно взвешивают. Определяют концентрацию экстракта в растворе, рассчитывают аликвоту для получения раствора с концентрацией 200 мкг/мл в колбах на 50 мл и 25 мл, соответственно.

Выполнение измерений. Для раствора с концентрацией 200 мкг/мл получают спектр поглощения образца в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм. Если линия спектра выходит за пределы шкалы спектрофотометра (рисунок 1), или приближается к таковым, необходимо произвести разведения: либо 25 мкг/мл; 50 мкг/мл; 75 мкг/мл ... 175 мкг/мл; либо 20 мкг/мл; 40 мкг/мл; 60 мкг/мл ... 180 мкг/мл.

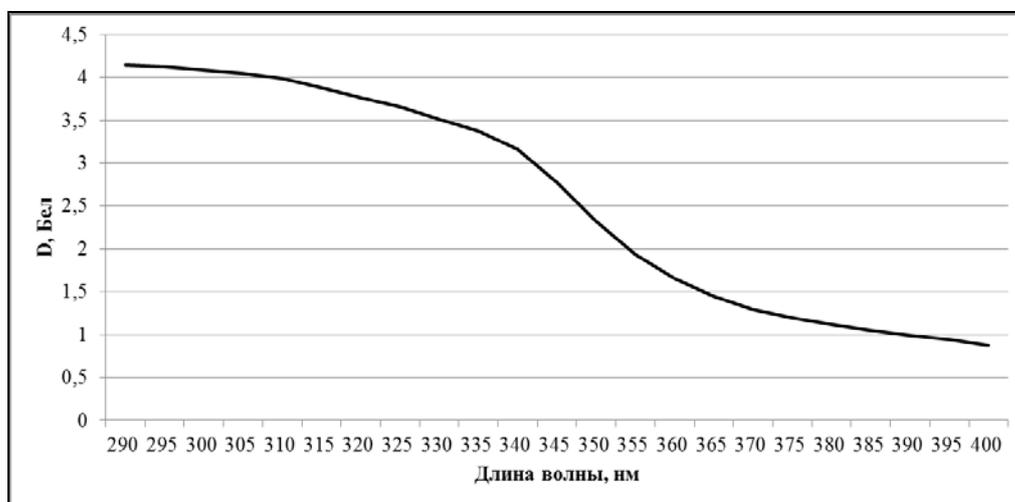


Рисунок 1 – Спектр поглощения спиртового раствора экстракта

Для каждой концентрации разведения следует получить спектр поглощения в диапазоне $\lambda = 290 \div 400$ нм, после чего выделить диапазон концентраций, в котором линии спектра не выходят за пределы шкалы спектрофотометра (рисунок 2). Относительная параллельность спектральных линий растворов разведения косвенно свидетельствует о наличии линейной зависимости оптической плотности раствора от его концентрации.

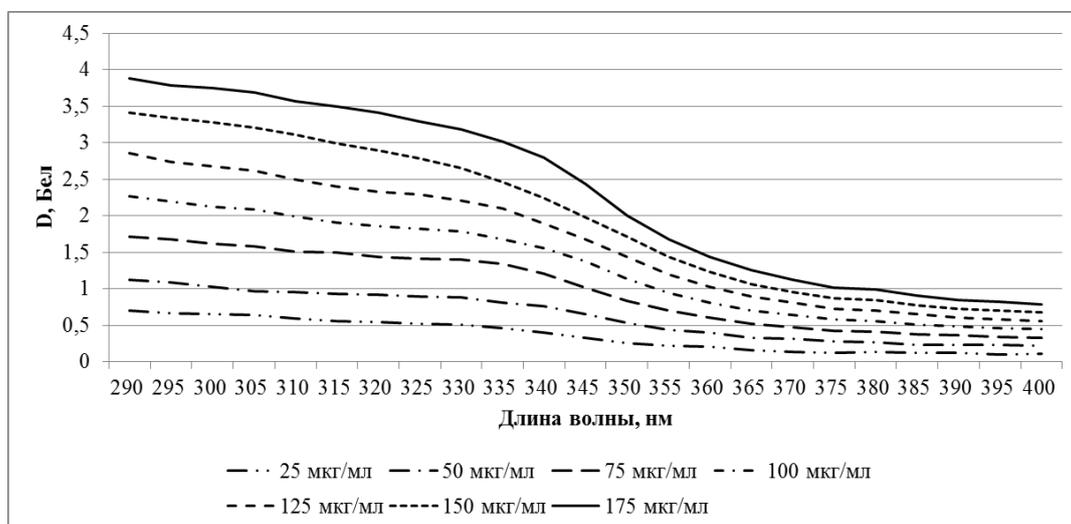


Рисунок 2 – Спектры поглощения растворов разведения экстракта

Значения оптических плотностей растворов разведения для определенной длины волны с ростом концентрации образуют линейную зависимость, свидетельствующую об отсутствии химического взаимодействия между растворителем (этанолом) и веществами, слагающими экстракт из макромицетов (рисунок 3).

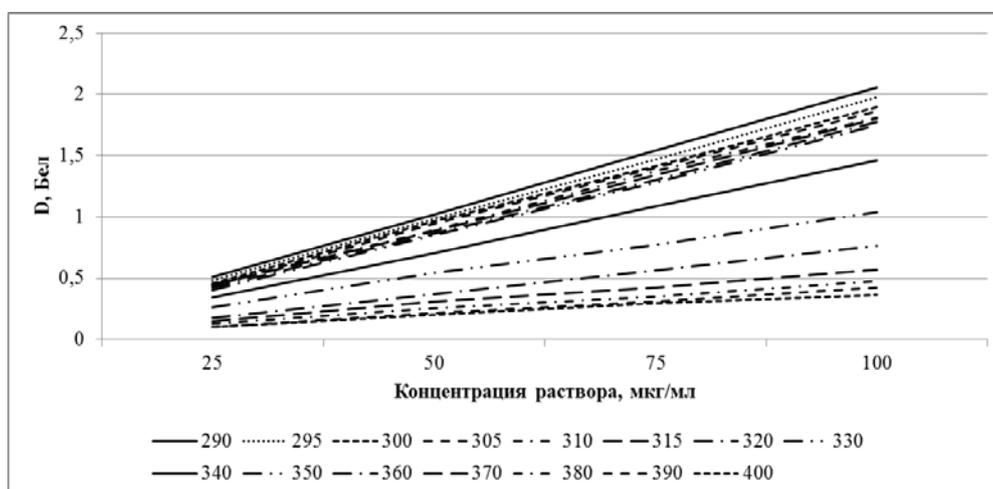


Рисунок 3 – Зависимости оптических плотностей растворов разведения экстракта от их концентрации

Аппроксимация линейной зависимостью найденных рядов значений оптических плотностей позволяет определить величины углового коэффициента, свободного члена уравнения и коэффициента регрессии. Для различных длин волн в диапазоне $290 \div 400$ нм с шагом 5 нм вычисляют величины оптических плотностей растворов разведения вплоть до 200 мкг/мл.

Расчет параметров фотозащиты. Для измеренных или вычисленных величин оптической плотности раствора при 290 нм, 295 нм, 300 нм ... 320 нм по формуле Мансура [6] вычисляют величины SPF соответствующих растворов экстрактов из макромицетов.

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda), \quad (1)$$

где CF – поправочный коэффициент (равен 10); $EE(\lambda)$ – спектр эритемного эффекта; $I(\lambda)$ – спектр солнечной интенсивности; $Abs(\lambda)$ – оптическая плотность образца.

Величина $EE(\lambda) \cdot I(\lambda)$ является константой [6].

Далее для растворов, показавших высокий уровень фотозащиты, рассчитывают величины $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б [7], [8]:

$$\int_{290\text{нм}}^{\lambda_{\text{крит}}} Abs(\lambda)d\lambda = 0,9 \times \int_{290\text{нм}}^{400\text{нм}} Abs(\lambda)d\lambda, \quad (2)$$

где: $Abs(\lambda)$ – оптическая плотность образца;

$$\text{УФ-А/УФ-Б} = \frac{\int_{320\text{нм}}^{400\text{нм}} Abs(\lambda)d\lambda}{\int_{290\text{нм}}^{320\text{нм}} Abs(\lambda)d\lambda}. \quad (3)$$

На основании полученных данных делают вывод об уровне фотозащиты экстракта из макромицетов соответствующей концентрации. После выполнения измерений и расчетов возможно определение минимальной концентрации экстракта, обеспечивающей фотозащитный эффект.

Заключение. Исследовали фотозащитные свойства ацетоновых, бензольных, метанольных и этанольных экстрактов из плодовых тел культивируемых и дикорастущих макромицетов. Показано, что вклад нестворимой в этаноле фракции для ацетоновых экстрактов составлял 23,1 ÷ 29,9 процентов массы экстракта; для бензольных – 29,1 ÷ 42,2 %; для метанольных – 13,3 ÷ 15,6 %; для этанольных – 9,8 ÷ 14,8 %. На основе определения растворимости экстрактов в этаноле, измерения оптической плотности растворов в области ультрафиолета Б (290 ÷ 320 нм), изучения спектров поглощения растворов экстрактов в диапазоне 290 ÷ 400 нм предложена методика оценки фотозащитных свойств экстрактов из макромицетов с возможностью выявления минимальной концентрации, обеспечивающей фотозащитный эффект.

Литература

1. Saraswat, A. Assessing cosmeceuticals properties of some macrofungi for improved skin care / A. Saraswat, P. Mathur, D. Sanyal // *Int J Pharm Pharm Sci.* – 2020. – Vol. 12 (2). – P. 15–19.
2. Mycelial culture extracts of selected wood-decay mushrooms as a source of skin-protecting factors / K. Sułkowska-Ziaja [et al.] // *Biotechnology Letters.* – 2021. – Vol. 43. – P. 1051–1061.
3. Hyde, K. D. Fungi – an unusual source for cosmetics / K. D. Hyde, A. H. Bahkali, M. A. Moslem // *Fungal diversity.* – 2010. – Vol. 43. – С. 1–9.
4. Храменкова, О. М. Фотозащитные свойства экстрактов из плодовых тел макромицетов / О. М. Храменкова // *Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины.* – 2022. – № 6 (135) – С. 61–65.
5. Храменкова, О. М. Фотозащитные, антиоксидантные и цитотоксические свойства экстрактов из двух видов полипоровых грибов / О. М. Храменкова, М. В. Матвеев // *Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины.* – 2023. – № 6 (141) – С. 57–61.
6. Mansur, J. S. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria / J. S. Mansur, M. N. R. Breder, M. C. A. Mansur, R. D. Azulay // *An. Bras. Dermatol.* – 1986. – Vol. 61 (4). – P. 121–124.
7. Sayre, R. M. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas / R. M. Sayre, P. P. Agin, G. J. Levee, E. Marlowe // *Photochem Photobiol.* – 1979. – Vol. 115. – P. 559–566.
8. Springsteen, A. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance / A. Springsteen, R. Yurek, M. Frazier, K. F. Carr // *Analytica Chimica Acta.* – 1999. – Vol. 380 (2-3). – P. 155–164.
9. Donglikar, M. M. Sunscreens : A review / M. M. Donglikar, S. L. Deore // *Pharmacognosy Journal.* – 2016. – Vol. 6 (3). – P. 171–179.
10. Guan, L. L. Sunscreens and photoaging: a review of current literature / L. L. Guan, H. W. Lim, T. F. Mohammad // *American journal of clinical dermatology.* – 2021. – Vol. 22 (6). – P. 819–828.