

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ВИМОРОЖЕНОГО МЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ БАЗИДИОМ СПРАВЖНІХ ГРИБІВ

Л. В. Панчак¹
М. В. Цивінська^{2, 3}
В. О. Антонюк^{1, 4}
Р. С. Стойка^{2, 4}

¹Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького

²Львівський національний університет імені Івана Франка

³Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
при ГУМВС України у Львівській області

⁴Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua, stoika@cellbiol.lviv.ua

Дослідження хімічного складу грибів та розроблення методів одержання з них біологічно активних сполук є сьогодні актуальним завданням, оскільки вони можуть слугувати джерелом важливих фармакологічно активних або харчових субстанцій. У роботі досліджено хімічний склад осадів, які утворюються за охолодження до -18°C метанольних екстрактів, одержаних із базидіом справжніх грибів. Осади з базидіом 22 видів грибів (21 — базидіальних і 1 — сумчастих грибів) вивчали за допомогою газорідинної хроматографії — мас-спектрометрії. В одержаних осадах достовірно ідентифіковано декілька груп речовин: 1) сахароспирти (маніт і сорбіт); 2) жирні кислоти та їхні похідні; 3) ергостерол (провітамін D_2); 4) гіберелін A_3 (незначний відсоток у деяких грибів).

Встановлено, що в осадах метанольного екстракту грибів усіх чотирьох досліджених представників роду *Russula* переважає маніт (100% у *R. aeruginosa*, 98,3% у *R. adusta*, 96,2% у *R. foetens* та 79,2% у *R. delica*). В осаді деяких представників роду *Lactarius*, крім маніту і сорбіту, виявлено високий вміст вищих жирних кислот та їхніх похідних. Зокрема, у споріднених видів грибів *L. piperatus*, *L. pergamenus* і *L. vellereus* знайдено високий вміст стеаринової кислоти. Менше її у *L. quietus*, *L. repraesentaneus*, *L. rufus*, а в *L. controversus*, *L. volemus* переважає олеїнова кислота. За даними мас-спектрометрії, осад, одержаний із метанольного екстракту *Amanita muscaria*, складався з метилового ефіру олеїнової кислоти (28%) та олеїнової кислоти (72%). У восьми видів грибів в осаді метанольного екстракту було знайдено ергостерол, вміст якого в *Clitocybe nebularis* сягав 91%, а у *Fomistopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus* та *Sarcoscypha coccinea* перевищував 50%. В осаді метанольного екстракту із базидіом *L. rufus* та *L. flexuosus* виявлено гіберелін A_3 . На підставі результатів проведеного дослідження зроблено висновок про доцільність застосування стадії виморожування метанольного екстракту в технологічному процесі очищення біологічно активних речовин із базидіом грибів.

Ключові слова: гриби, екстракція метанолом, мас-спектрометрія, маніт, сорбіт, жирні кислоти, ергостерол, гіберелін A_3 .

Справжні гриби (підцарство Fungi) стають інтересом як джерело одержання багатьох біологічно активних речовин. Зокрема, нами досліджено високотоксичний щодо низки пухлинних клітин протеїн, який було отримано з базидіом *Amanita phalloides* /Vaill. Fr./Secr [1]. Із базидіом *Lactarius rufus* /Scop. ex Fr./Fr.[2], *Mycena pura* /Fr./ Kumm. [3], *Amanita virosa* Secr. [4] одержано лектини і здійснено їхню біохімічну характеристику.

Слід зазначити, що після екстракції водорозчинних сполук залишаються вичавки базидіом грибів, які за більш комплексного використання сировини можуть слугувати джерелом одержання багатьох цінних біоло-

гічно активних ліпофільних речовин. Для екстракції останніх застосовують органічні розчинники, такі як гексан, хлороформ, діетиловий ефір, метанол та ін. Метанол є одним з найкращих екстрагентів і його часто використовують для вилучення різноманітних органічних речовин із рослинних об'єктів. Наприклад, екстракція метанолом є першим етапом очищення таких природних речовин, як сапоніни [5], серцеві глікозиди [6], флавоноїди [7], жирні кислоти та вітаміни [8].

Досліджуючи екстрактивні речовини грибів роду *Lactarius*, ми звернули увагу на те, що під час охолодження метанольного екстракту, одержаного з базидіом хряща-

молочника пергаментного (*L. pergamenus* (Fr.) Fr), випадає в осад кристалічна речовина. Після чотирикратної перекристалізації з метанолу було отримано білу кристалічну речовину з температурою плавлення +69 °С. Вона мала кислотні властивості і її кислотне число, визначене за методикою Державної Фармакопеї СРСР, XI видання [9], становило 213. Використання методу газорідинної хроматографії — мас-спектрометрії дозволило встановити, що ця речовина на 98,5% складається зі стеаринової кислоти з 1,5% -ю домішкою метилового ефіру стеаринової кислоти. Охолодження до -18 °С концентрованого метанольного екстракту дало змогу одержати значну кількість осаду і очистити метанольний екстракт від малоактивних речовин, що суттєво полегшило подальшу роботу з очищення речовин, які мають антипроліферативні властивості.

У зв'язку з тим, що виморожування метанольного екстракту з інших грибів цього роду та інших родин також давало значну кількість осаду, ми вирішили більш детально дослідити хімічний склад таких осадів за допомогою методу газорідинної хроматографії — мас-спектрометрії. Відомо, що застосування цього методу аналізу дозволяє в багатьох випадках розділити суміш органічних речовин, а потім швидко ідентифікувати хімічні сполуки, які містяться в суміші, з оцінюванням їх відносного кількісного вмісту.

Матеріали і методи

Базидіоми грибів заготовляли в період їх масової появи у мішаному лісі Сколівського району Львівської області. Протягом 12 год після збору гриби доставляли в лабораторію, вміщували в сушильну шафу при +50 °С, де впродовж 24 год висушували до повітряно-сухої сировини.

Усього було досліджено плодові тіла 21 виду грибів, що належать до класу базидіальних, серед яких 18 видів грибів порядку пластинчастих (*Agaricales*), з них 15 — родини *Russulaceae* (11 видів роду *Lactarius* і 4 — роду *Russula*), а також декілька представників інших родин цього порядку — синяк (*Boletus luridus* Fr., родина *Boletaceae*), мухомор червоний [*Amanita muscaria* (Fr.) *Hooker*, родина *Amanitaceae*], грузлик сірий [*Clitocybe nebularis* (Fr.) *Kumm.*, родина *Tricholomataceae*] та три представники порядку непластинчастих грибів (*Aphyllorhales*), серед них два — родини кортицієвих *Corticaceae* — трутовик обрамлений

[*Fomistopsis pinicola* (Fr.) *Karst.*] і сірчано-жовтий трутовик [*Laetiporus sulphureus* (Fr.) *Bond et Sing.*] та один представник родини їжовикових *Hydnaceae* — їжовик жовтуватий (*Hydnum repandum* Fr.). Також досліджено одного представника класу сумчастих грибів порядку пецицієвих — саркосцифу яскраво-червону [*Sarcoscypha coccinea* (Fr.) *Lambotte*].

Базидіоми висушених грибів подрібнювали до часточок розміром 1 мм, просіваючи через відповідне сито, і 20,0 г одержаного матеріалу поміщали в апарат Соксклета, де його екстрагували 120 мл метанолу протягом 3 год. Витяжку концентрували відгонкою метанолу до 1/4 початкового об'єму (30 мл) і згущений метанольний екстракт вміщували у морозильну камеру при -18 °С на 3 год. Утворений осад двічі промивали невеликою кількістю (10 мл) холодного метанолу і висушували при +50 °С.

Осад зважували на аналітичних вагах, одержані зразки досліджували за допомогою мас-спектрометра 6С/MS Agilent Technologies 6890 N/5975 В, приєднаного до хроматографічної колонки (модель НР-5МС, довжина 30 м, діаметр — 0,25 мм, наповнювач: 95% -й диметилполісилоксан + 5% -й дифенілполісилоксан; газ-носієй — гелій з постійним потоком 1,5 мл/хв). Промивання колонки проводили метанолом.

Газову хроматографію було запрограмовано на рівень зростання температури на 15 °С/хв від 75 °С до 300 °С. Початкову температуру підтримували протягом 1 хв, а кінцеву — протягом 8 хв. Було використано мас-селективний детектор з температурою інтерфейсу $T = 250$ °С; іонізацію здійснювали електронним ударом, енергія іонізації — 70 еВ, температура іонного джерела $T = 230$ °С; температура квадруполя $T = 150$ °С.

Через недостатню леткість сорбіту і маніту газорідинні хроматограми деяких зразків не показували достатньо доброго розділення. Тому зразки, які, за попередніми даними, мали високий вміст сахароспиртів, повторно аналізували після їх ацетилювання, яке здійснювали за методикою, описаною в літературі [10]. Із цією метою в пробірки вміщували по 2,0 мг відповідних препаратів та еталонних цукрів (маніту, сорбіту й дульциту). Зразки розчиняли в суміші з 0,4 мл піридину та 0,6 мл оцтового ангідриду. Суміш інкубували на водяній бані при +60 °С протягом 30 хв, після чого розчинник випаровували при +50 °С і сухі залишки розчиняли в метанолі. Після проведення ГРХ порівнювали хроматограми ацетилюваних

еталонних цукрів із хроматограмами ацетильованих цукрів із відповідних виморожених осадів екстрактів грибів.

Ідентифікацію низки виявлених мас-спектрометрією сполук підтверджували, визначаючи температуру плавлення або за допомогою тонкошарової хроматографії на силікагелі, чи хроматографією на папері.

Температуру плавлення визначали за методом ДФ СРСР, XI вид. [9]. Із цією метою висушену речовину вміщували в капілярну трубку, запаяну з нижнього кінця. Капілярну трубку з досліджуваним зразком поміщали у внутрішню пробірку приладу для з'ясування температури плавлення. У зовнішній колбі нагрівали воду (у разі визначення температури плавлення стеаринової кислоти) або гліцерол (якщо встановлювали температуру плавлення маніту та сорбіту).

Зокрема, для ідентифікації стеаринової кислоти вимірювали температуру плавлення досліджуваного зразка порівняно з достовірним зразком цієї кислоти ($t_{пл} = 69,2 - 69,9 \text{ } ^\circ\text{C}$) та визначали кислотне число (200 — 218). Для ідентифікації маніту температуру плавлення одержаної речовини порівнювали з достовірним зразком ($t_{пл} = 165 - 166 \text{ } ^\circ\text{C}$). Сорбіт має суттєво нижчу температуру плавлення ($t_{пл} = 96 \text{ } ^\circ\text{C}$).

Хроматографічне дослідження сахароспиртів здійснювали на папері Ватман №1 в системі *n*-пропанол — егілацетат — вода 7 : 1 : 2. Плями виявляли, оприскуючи хроматограми 1%-м розчином калію перманганату в 2%-му водному розчині карбонату натрію [10].

Результати та обговорення

Загальну кількість екстрагованих метанолом речовин оцінювали після видалення розчинника, визначаючи загальний вміст викристалізованих речовин з охолодженого до $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$ метанолу (рис. 1). Кількість екстрактивних речовин становила від 14,5% у трутовика сірчано-жовтого до 44,9% у хрящ-молочника повстистого. У більшості випадків вона становить 20–40% від маси висушених базидіюм грибів. Із цього матеріалу шляхом виморожування можна виділити від 1,3% (*Fomitopsis pinicola*) до 22,7% (*L. vellereus*) екстрактивних речовин, рахуючи від загальної маси висушених базидіюм грибів.

Якщо кількість екстрагованих метанолом речовин прийняти за 100%, то під час виморожування нами було одержано від 55,8% у *Russula delica* до 6,3% маси речовини у *Fomitopsis pinicola* (рис. 2).

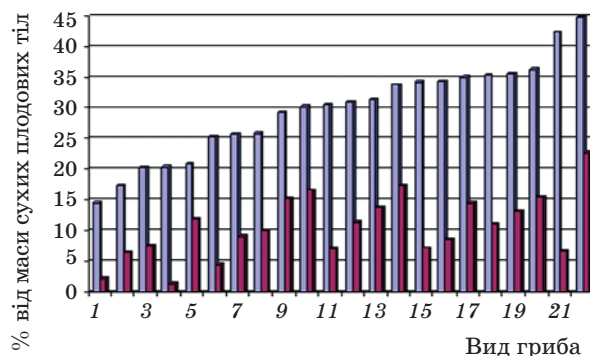


Рис. 1. Загальна маса екстрагованих метанолом речовин та маса речовин, одержаних

при виморожуванні ($-18 \text{ } ^\circ\text{C}$, 3 год) екстракту: 1 — трутовик сірчано-жовтий [*Laetiporus sulphureus* (Fr.) *Bong et Sing*]; 2 — сиріюжка чорна [*Russula adusta* (Fr.) Fr.]; 3 — хрящ-молочник тополевий [*L. controversus* (Fr. ex Fr.) Fr.]; 4 — трутовик обрамлений [*Fomitopsis pinicola* (Fr.) *Karst*]; 5 — сиріюжка біла [*Russula delica* (Fr.)]; 6 — їжовик жовтуватий (*Hydnum repandum* Fr.); 7 — хрящ-молочник дубовий [*L. quietus* (Fr.) Fr.]; 8 — підмолочник, хрящ-молочник червоно-коричневий [*L. volemus* (Fr.) Fr.]; 9 — валуй [*Russula foetens* (Fr.) Fr.]; 10 — хрящ-молочник оливково-чорний [*L. necator* (Fr.) *Karst*.]; 11 — хрящ-молочник перцевий [*L. piperatus* (Fr.) *S. F. Gray*]; 12 — хрящ-молочник золотисто-жовтий ліловіючий (*L. repraesentaneus* *Britz.*); 13 — хрящ-молочник сіро-рожевий (*Lactarius flexuosus* Fr. *S. F. Gray*); 14 — сиріюжка зелена велика (*R. aeruginea* *Lindbl. ex Fr.*); 15 — синяк (*Boletus luridus* Fr.); 16 — саркосцифа яскраво-червона [*Sarcoscypha coccinea* (Fr.) *Lambotte*]; 17 — мохначка [*L. torminosus* (Fr.) *S.F. Gray*]; 18 — хрящ-молочник пергаментний [*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr.]; 19 — хрящ-молочник гірчак [*Lactarius rufus* (Fr.) Fr.]; 20 — мухомор червоний [*Amanita muscaria* (Fr.) *Hooker*]; 21 — грузлик сірий [*Clitocybe nebularis* (Fr.) *Kumm*]; 22 — хрящ-молочник повстистий [*L. vellereus* (Fr.) Fr.].
 ■ — % екстрактивних речовин;
 ■ — % речовин, одержаних виморожуванням метанольного екстракту

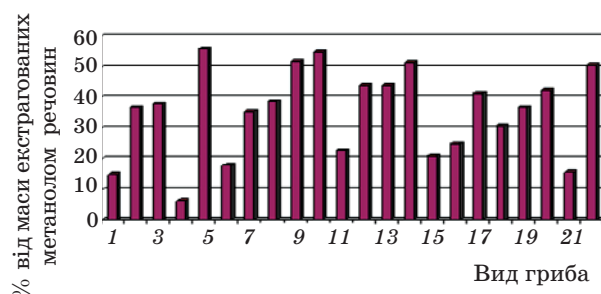


Рис. 2. Частка речовин, що виморожуються з метанольного екстракту ($-18 \text{ } ^\circ\text{C}$, 3 год) (загальну масу метанольного екстракту прийнято за 100%)

Примітка: види грибів — як на рис. 1.
 ■ — % речовин, одержаних виморожуванням метанольного екстракту

Маса речовин, одержаних при охолодженні концентрованого метанольного екстракту, здебільшого становила 20–50% від суми екстрактивних речовин. Оскільки маса осаду залежить від умов експерименту, ми намагалися максимально точно витримувати умови екстракції, концентрування екстракту, виморожування та промивання утвореного осаду. У більшості випадків під час виморожування утворювався жовтуватий кристалічний осад. Виняток становили осади з екстрактів *Amanita muscaria*, з підмолочника (*L. volemus*) та саркосцифи яскраво-червоної, які були твердими за низької температури і рідкими — за кімнатної.

В одержаних осадах за допомогою мас-спектрометрії достовірно ідентифіковано декілька груп речовин: 1) сахароспирти (маніт і сорбіт); 2) жирні кислоти та їхні похідні; 3) ергостерол (провітамін D₂); 4) гіберелін A₃ (невеликий відсоток у деяких грибів).

Для прикладу на рис. 3 наведено газорідинну хроматограму зразка вимороженого осаду, одержаного з *L. pergamenus*.

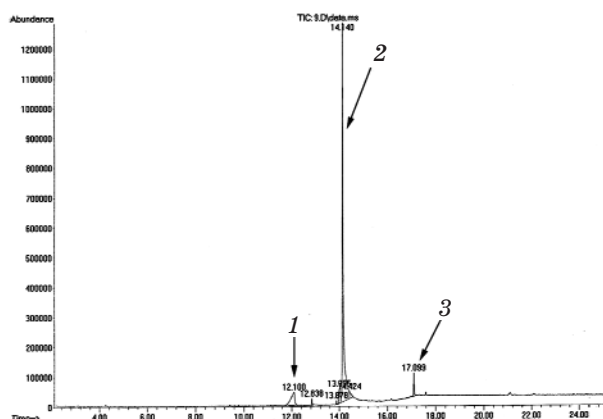


Рис. 3. Газорідинна хроматограма зразка вимороженого осаду метанольного екстракту *Lactarius pergamenus*: 1 — маніт (11,7%); 2 — стеаринова кислота (79,06%); 3 — гліцерол-1-моноолеат (3,01%)

Висновок про наявність волеміту у *L. volemus* було зроблено виходячи з таких міркувань: 1) мас-спектр фракції при газорідинній хроматографії вимороженого осаду *L. volemus* на 64% збігався з еталонним зразком волеміту; 2) під час ТПХ на папері було виявлено сполуку з $R_f = 0,3$, трохи нижчим, ніж для сорбіту та маніту, що характерно для цього цукру за нижчезазначених умов хроматографії; 3) наявності даних літератури про присутність волеміту в базидіомах цього гриба.

Інші речовини, які було виявлено в аналізованих зразках за допомогою газорідин-

ної хроматографії переважно становили незначний відсоток і є домішками, зумовленими недостатнім очищенням осаду, оскільки ми здійснювали лише одну кристалізацію, що недостатньо для одержання речовин у чистому стані. Крім того, деякі речовини, які були в невеликій кількості, не вдалося достовірно ідентифікувати, тому їх на графіках не подано.

За результатами проведених аналізів можна говорити про декілька загальних тенденцій. Зокрема, в осадах усіх досліджених (чотирьох) представників роду *Russula* переважає маніт (100% — *R. aeruginea*, 98,3% — *R. adusta*, 96,2% — *R. foetens* та 79,2% — *R. delica*) (рис. 4). Лише в осаді *R. adusta* крім маніту було виявлено 0,65% цис-олеїнової кислоти. Газорідинна хроматограма зразка вимороженого осаду, одержаного з *R. aeruginea* після ацетилювання, що її наведено на рис. 5, була такою самою, як у зразка ацетильованого маніту.

На відміну від спорідненого роду *Russula*, у вимороженому метанольному екстракті деяких представників роду *Lactarius* окрім маніту і сорбіту відзначався високий вміст

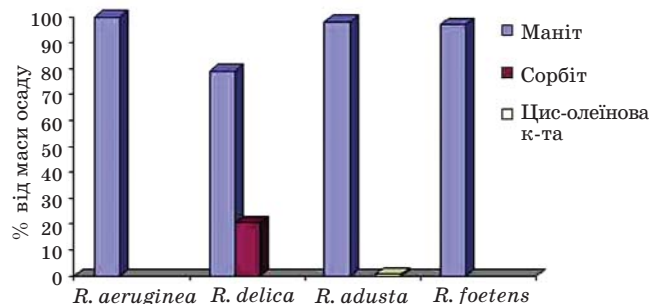


Рис. 4. Якісний та кількісний вміст речовин, одержаних виморожуванням (–18 °С, 3 год) метанольних екстрактів грибів роду *Russula*

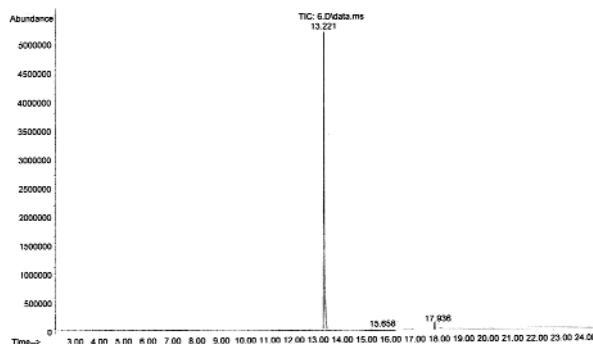


Рис. 5. Газорідинна хроматограма зразка вимороженого осаду метанольного екстракту *Russula aeruginea* після ацетилювання

вищих жирних кислот та їхніх похідних. Якщо в *Lactarius necator* виморожений осад повністю складається із суміші маніту та сорбіту, то в *L. quietus*, *L. repraesentaneus*, *L. rufus* та *L. torminosus* вміст маніту трохи нижчий, хоча перевищує 80% (рис. 6). Водночас в інших представників роду *Lactarius* в метанольному екстракті є вищі жирні кислоти та їхні похідні (рис. 7). Зокрема, споріднені види грибів *L. piperatus*, *L. pergamenus* і *L. vellereus* характеризуються високим вмістом стеаринової кислоти. Менше її у *L. quietus*, *L. repraesentaneus*, *L. rufus*, а в *L. controversus*, *L. volemus* переважає олеїнова кислота. У *L. controversus* виявлено високий відсоток транс-олеїнової (елаїдинової) кислоти з вищою температурою плавлення ($t_{пл} = +44-46\text{ }^\circ\text{C}$), тоді як у *L. volemus* була присутня цис-олеїнова кислота з нижчою температурою плавлення ($t_{пл} = +13-16\text{ }^\circ\text{C}$). Остання сполука, очевидно, є більш поширеною у грибах. Так, цю кислоту або її похідні, крім вищезгаданих грибів, було знайдено в *Russula adusta*, *Lactarius pergamenus*, *L. torminosus*, *Amanita muscaria*.

В інших 7 видах грибів, що не належать до родини *Russulaceae*, хімічний склад осаду, одержаного виморожуванням метанольного екстракту, відрізнявся більше. Маніт було виявлено в осаді, одержаному з базидієм їжовика жовтуватого (*Hydnum repandum*) — 100%, синяка (*Boletus luridus*) — 95,6% та саркосцифи яскраво-червоної (*Sarcoscypha coccinea*) — 7,1%, тоді як в інших 4 видах грибів (*Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis pinicola*, *Amanita muscaria*, *Clitocybe nebularis*) маніту і сорбіту в осаді не було знайдено.

Осад, одержаний виморожуванням метанольного екстракту мухомора червоного (*Amanita muscaria*), за даними мас-спектро-

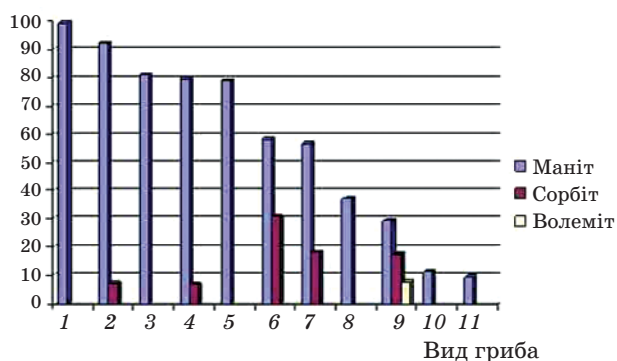


Рис. 6. Вміст сахароспиртів у складі речовин, одержаних виморожуванням ($-18\text{ }^\circ\text{C}$, 3 год) метанольних екстрактів грибів роду *Lactarius*: 1 — *L. flexuosus*; 2 — *L. necator*; 3 — *L. rufus*; 4 — *L. quietus*; 5 — *L. repraesentaneus*; 6 — *L. vellereus*; 7 — *L. torminosus*; 8 — *L. controversus*; 9 — *L. volemus*; 10 — *L. pergamenus*; 11 — *L. piperatus*

метрії, складався з олеїнової кислоти (72%) та її метилового ефіру (28%).

В осаді 8 видів грибів було виявлено ерго-стерол. Серед них — 3 види грибів роду *Lactarius* (*L. volemus*, *L. quietus* та *L. torminosus*) та 5 представників інших родин (рис. 8).

В однократно викристалізованому осаді з *L. torminosus*, *L. quietus* та *Boletus luridus* вміст ергостеролу сягає 1 — 3%, у *L. volemus* — 7,0%, а в двох представників родини кортицієвих — сірчано-жовтому трутовіку (*Laetiporus sulphureus*) та трутовіку обрамленому (*Fomitopsis pinicola*) — 57,3% та 81,3%, відповідно. Ще вищий вміст ергостеролу зафіксовано у грузлика сірого (*Clitocybe nebularis*, родини *Tricholomataceae*) — понад 91% вимороженого осаду, тобто більше 5% усіх екстрактивних речовин цього гриба, що може становити практичний інтерес для одержання цієї біологічно активної речовини. Слід зазначити, що ергостерол

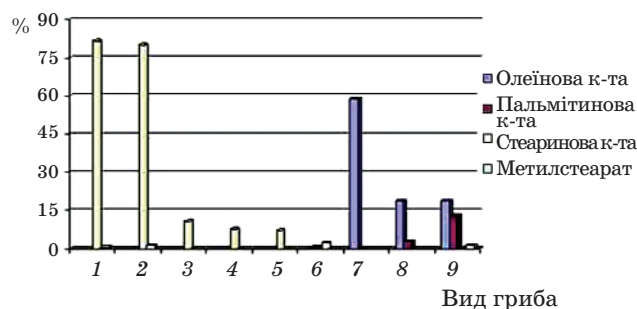


Рис. 7. Вміст жирних кислот у складі речовин, одержаних виморожуванням ($-18\text{ }^\circ\text{C}$, 3 год) метанольних екстрактів грибів роду *Lactarius*: 1 — *L. pergamenus*; 2 — *L. piperatus*; 3 — *L. vellereus*; 4 — *L. repraesentaneus*; 5 — *L. quietus*; 6 — *L. rufus*; 7 — *L. controversus*; 8 — *L. torminosus*; 9 — *L. volemus*

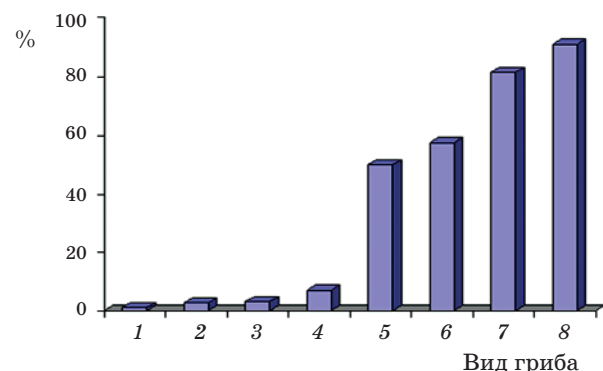


Рис. 8. Вміст ергостеролу в складі речовин, одержаних виморожуванням метанольного екстракту грибів: 1 — *L. torminosus*; 2 — *L. quietus*; 3 — *Boletus luridus*; 4 — *L. volemus*; 5 — *Sarcoscypha coccinea*; 6 — *Laetiporus sulphureus*; 7 — *Fomitopsis pinicola*; 8 — *Clitocybe nebularis*

можна одержати також із *L. volemus* багатократною перекристалізацією осаду. Так, після триразової перекристалізації осаду з гарячого метанолу вміст ергостеролу підвищився до 61,8%, а після шестикратною перекристалізації — його було одержано в майже чистому стані (96% -ї чистоти).

Важливим також є виявлення гібереліну A_3 — природного стимулятора росту рослин сесквітерпенової природи — у плодкових тілах *L. rufus* (1,04%) та *L. flexuosus* (0,76%).

Таким чином, очищення метанольного екстракту з базидієм вищих грибів шляхом

виморожування дозволяє звільнити його від таких речовин, як маніт, сорбіт та вищі жирні кислоти.

В осаді, одержаному виморожуванням метанольного екстракту з деяких грибів, міститься низка цінних біологічно активних речовин. У грузлика сірого (*Clitocybe nebularis*, родина *Tricholomataceae*) понад 91% вимороженого осаду становить ергостерол — більше 5% усіх екстрактивних речовин. Ергостерол легко одержати з *L. volemus* і це може становити практичний інтерес. Вартим уваги для подальшого дослідження є стимулятор росту рослин гіберелін A_3 , виявлений у плодкових тілах *L. rufus* та *L. flexuosus*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Stasyk T., Lutsik-Kordovsky M., Wernstedt C. et al. New highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is oxidase of L-aminoacids // *FEBS J.* — 2010. — V. 277. — P. 1260–1269.
2. Панчак Л. В. Антонюк В. О. Очищення лектину з плодкових тіл *Lactarius rufus* /Scor. ex Fr./ Fr. та дослідження його вуглеводної специфічності // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — №2. — С. 123–127.
3. Антонюк В. О., Яценко А. М., Антонюк Р. В., Амбарова Н. О. Вуглеводна специфічність лектину, одержаного з плодкових тіл міцени чистої (*Muscena pura* /Fr./ Kumm.) та його використання в гістохімічних дослідженнях // *Біополімери і клітина.* — 2009. — Т. 25, № 6. — С. 466–475.
4. Antonyuk V. O., Klyuchivska O. Yu, Stoika R. S. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells // *Toxicol.* — 2010. — V. 55. — P. 1297–1305.
5. Tava A., Mella M., Bialy Z., Jurzysta M. Stability of Saponins in Alcoholic Solutions: Ester Formation as Artifacts // *J. Agric. Food Chem.* — 2003. — V. 51, N 7. — P. 1797–1800.
6. Bruneton J. Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants. 2nd ed. — Paris, 1999. — 1119 p.
7. Andersen O. M., Markham K. R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. — Publ. Taylor and Francis Group, 2006. — 1245 p.
8. Ahmad A., Alkarhi A. F. M., Hena S. et al. Optimization of Soxhlet Extraction of Herba Leonuri Using Factorial Design of Experiment // *Intern. J. Chem.* — 2010. — V. 2 (1). — P. 198–205.
9. *Государственная Фармакопея СССР*, XI изд., вып. 1. Общие методы анализа. — М.: Медицина, 1987. — С. 16–20, 191–192.
10. *Хроматография на бумаге* /Под ред. И. М. Хайса, К. Мацека. — М.: Изд-во ИЛ, 1962. — 852 с.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВЫМОРОЖЕННОГО МЕТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ БАЗИДИОМ НАСТОЯЩИХ ГРИБОВ

Л. В. Панчак¹, М. В. Цивинская^{2,3},
В. О. Антонюк^{1,4}, Р. С. Стойка^{2,4}

¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко

³Научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр при ГУМВД Украины во Львовской области

⁴Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua,
stoika@cellbiol.lviv.ua

Исследование химического состава грибов и разработка методов получения из них биологически активных веществ является сегодня

CHEMICAL COMPOSITION OF THE FROZEN OUT METHANOL EXTRACTS FROM TRUE MUSHROOMS BASIDIOMS

L. V. Panchak¹, M. V. Tsivinska^{2,3},
V. O. Antonyuk^{1,4}, R. S. Stoika^{2,4}

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University

²Ivan Franko Lviv National University

³Scientific-Research Center of Criminalistic Expertise in Lviv Region at the Ministry of Internal Affairs of Ukraine

⁴Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua,
stoika@cellbiol.lviv.ua

Nowadays the research of the mushroom chemical composition and elaboration of the methods of bioactive substances obtaining from them is an important task because they can serve

актуальной задачей, поскольку они могут служить источником важных фармакологически активных или пищевых субстанций.

В работе исследован химический состав осадков, которые образуются при охлаждении до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ метанольных экстрактов, полученных из базидиом настоящих грибов. Осадки из базидиом 22 видов грибов (21 — базидиальных и 1 — сумчатых грибов) изучали с помощью газожидкостной хроматографии — масс-спектрометрии. В полученных осадках достоверно идентифицировано несколько групп веществ: 1) сахароспирты (маннит и сорбит); 2) жирные кислоты и их производные; 3) эргостерол (провитамин D_2); 4) гиббереллин A_3 (незначительный процент у некоторых грибов).

Установлено, что в осадках из метанольного экстракта грибов всех четырех исследованных представителей рода *Russula* преобладает маннит (100 % у *R. aeruginea*, 98,3% у *R. adusta*, 96,2% у *R. foetens* и 79,2% у *R. delica*). В осадке у некоторых представителей рода *Lactarius*, кроме маннита и сорбита, выявлено высокое содержание высших жирных кислот и их производных. В частности, у родственных видов грибов *L. piperatus*, *L. pergamenus* и *L. vellereus* найдено высокое содержание стеариновой кислоты. Меньше ее в *L. quietus*, *L. repraesentaneus*, *L. rufus*, а в *L. controversus*, *L. volemus* преобладает олеиновая кислота. По данным масс-спектрометрии, осадок, полученный из метанольного экстракта *Amanita muscaria*, состоит из метилового эфира олеиновой кислоты (28%) и олеиновой кислоты (7%). У восьми видов грибов в осадке метанольного экстракта был найден эргостерол, содержание которого у *Clitocybe nebularis* достигало 91%, а у *Fomistopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus* и *Sarcoscypha coccinea* — превышало 50%.

В осадке метанольного экстракта из базидиом *L. rufus* и *L. flexuosus* обнаружен гиббереллин A_3 . На основании результатов проведенного исследования сделан вывод о целесообразности применения стадии вымораживания метанольного экстракта в технологическом процессе очистки биологически активных веществ из базидиом грибов.

Ключевые слова: грибы, метанольная экстракция, масс-спектрометрия, маннит, сорбит, жирные кислоты, эргостерол, гиббереллин A_3 .

as a source of important pharmacological active or food substances.

The chemical composition of sediments that are created at freezing to $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ of the methanol extracts obtained from true mushrooms basidioms was investigated in the work. The sediments from the fruit bodies of basidioms of 22 species of mushrooms (21 basidial species and 1 ascomycetes species) were analyzed by gas-liquid chromatography — mass-spectrometric analysis. Several groups of substances: sugar alcohols (mannitol and sorbitol); 2) fatty acids and its derivatives; 3) ergosterol (provitamin D_2); 4) gibberellin A_3 (little per cent in some mushrooms) were definitely identified in the obtained sediments.

It was determined that mannitol predominated in sediments of methanol extracts from all 4 examined *Russula* mushrooms species (100 % in *R. aeruginea*, 98,3 % in *R. adusta*, 96,2 % in *R. foetens* and 79,2 % in *R. delica*). In methanol extract sediments of some *Lactarius* species, except for mannitol and sorbitol, it was found out high content of fatty acids and their derivatives. In particular, high content of stearic acid was found in related species of mushrooms *L. piperatus*, *L. pergamenus* and *L. vellereus*. Less content of stearic acid has been founded in *L. quietus*, *L. repraesentaneus*, *L. rufus*, and oleic acid showed predominance in *L. controversus*, *L. volemus*. According to mass-spectroscopic data, a sediment from methanol extract of *Amanita muscaria* consisted of methyl ester oleic acid (28%) and oleic acid (72%). Ergosterol was found in sediment of 8 species. *Clitocybe nebularis* contained 91% of ergosterol, and *Fomistopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus* and *Sarcoscypha coccinea* — contained over 50% of ergosterol.

Gibberellin A_3 was found in methanol extracts of the basidiomes of *L. rufus* and *L. flexuosus*. Based on the results of the study it was concluded that a stage of freezing of methanol extracts was reasonable to use in technology of purification of biologically active substances from the mushroom basidiomes.

Key words: fungi, methanol extract, mass-spectrometry, mannitol, sorbitol, fatty acids, ergosterol, gibberellin A_3 .