



Очистка эргостерину з базидіом грузлика димчатого (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.)

¹Інститут біології клітини НАН України, м. Львів,

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: ергостерин,
Clitocybe nebularis, очистка.

Джерелом отримання вітаміну D₂ у промисловості є ергостерин, тому пошук його дешевих і багатих джерел є актуальним. Серед 22 видів справжніх грибів, які ми дослідили, його вміст виявився найвищим у грузлика димчатого (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.). З метою розробки раціональної методики його отримання здійснили очистку ергостерину з сушених вичавок базидіом двома методами: лужного гідролізу та екстракції сировини метанолом із наступною хроматографією на силікагелі. Встановили, що хроматографічна очистка на колонці силікагелю має переваги над лужним гідролізом сировини, даючи змогу отримати чистий ергостерин в одну стадію з високим виходом (2,54%) і відкриває можливість виділення інших речовин, які містяться в метанольній витяжці.

Очистка эргостерина из базидиом говорушки серой (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.)

В. А. Антонюк

Источником получения витамина D₂ в промышленности является эргостерин, поэтому актуален поиск его дешевых и богатых источников является актуальным. Среди исследованных нами 22 видов настоящих грибов его содержание оказалось самым высоким в говорушке серой (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.). Поэтому с целью разработки рациональной методики его получения осуществлена очистка эргостерина из сушеных выжимок базидиом 2 методами: щелочного гидролиза и экстракции сырья метанолом со следующей хроматографией на силикагеле. Установлено, что хроматографическая очистка на колонке силикагеля имеет преимущества над щелочным гидролизом сырья, позволяя получить чистый эргостерин в одну стадию с высоким выходом (2,54%) и открывает возможность получения других веществ, которые содержатся в метанольной вытяжке.

Ключевые слова: эргостерин, *Clitocybe nebularis*, очистка.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 54–56

Ergosterol purification from basidiomes of Clouded Agaric (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.)

V. O. Antonyuk

Aim. Ergosterol is an industrial source of vitamin D₂ obtaining; therefore the search of its cheap and rich sources is an actual issue. Methods and results. Among 22 investigated species of mushrooms the greatest quantity of ergosterol has been detected in Clouded Agaric (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm.). Therefore ergosterol purification from the dried basidiomes marc has been carried out using two methods: 1) alkaline hydrolysis and 2) extractions of raw material by methanol with the following silica gel chromatography.

Conclusion. It has been determined that the chromatography silica gel column purification has advantage over the alkaline hydrolysis of raw material and allows to obtain a purified ergosterol in one stage with a high yield (2,54 %) and also opens possibility to obtain other matters which are contained in the methanol extract.

Key words: Ergosterol, *Clitocybe nebularis*, Purification.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 54–56

Ергостерин (ергоста-5,7,22-трієн-3β-ол) є стероїдною сполукою, що характерна для грибів, його не виявляють у рослинних чи тваринних клітинах. Поширення ергостерину обмежується більш високоорганізованими таксонами грибів, у примітивніших таксонах містяться інші стерини. Це превалуючий стерин в аскоміцетах і базидіомицетах [1]. Промисловим джерелом отримання ергостерину є пекарські дріжджі, де його вміст може становити 2% від сухої маси. Ультрафіолетове випромінювання перетворює ергостерин (через ряд проміжних стадій) на вітамін D₂, з яким він є структурно близьким, тому і становить певний інтерес для медицини. Однак у різних видах базидіомікозових грибів його вміст дуже сильно відрізняється. Найчастіше найбільша частина сухої речовини базидіомікозових

грибів (до 50–65%) – моно- та олігосахариди і структурні полісахариди стінок грибів. Вільні цукри становлять близько 11% вуглеводів сухої речовини, вміст маніту може досягати 80% [2].

Протягом дослідження метанольних екстрактів сухих базидіом 22 видів грибів, серед них 21 вид належить до класу базидіальних грибів і 1 був представником сумчастих грибів, ергостерин за даними газорідинної хроматографії-мас-спектрометрії (ГРХ-МС) виявили у 8 видів. Однак найбільший його вміст – у грузлика димчатого (*Clitocybe nebularis* (Fr.) Kumm., родина *Tricholomataceae*) [3]. Отже, цей гриб можна вважати перспективним джерелом ергостерину, але в науковій літературі відсутні дані про отримання ергостерину з цього гриба.

Мета роботи

Розробити раціональну методику отримання ергостерину з базидієм грузлика димчатого та оцінити перспективність цієї сировини для його одержання.

Матеріали і методи дослідження

Базидіями грибів заготовляли у період їхньої масової появи у другій половині вересня – першій половині жовтня в мішаному лісі Сколівського району Львівської області. Протягом 12 год після збору їх доставляли у лабораторію. Зі свіжих базидієм вичавлювали сік, який використовували для отримання лектину [4], а вичавки поміщали в сушильну шафу при +60°C, де їх протягом 24–48 год висушували і використовували для очистки ергостерину.

Для вибору кращого методу очистки ергостерин одержували двома методами: методом лужної декструкції, який використовується при отриманні ергостерину із пекарських дріжджів [5] та екстракції сировини метанолом з наступною хроматографією на силікагелі.

Для оцінювання трудомісткості та порівняння виходу за першим методом ергостерин отримували як із пекарських дріжджів, так і з висушених плодкових тіл грузлика димчатого.

З цієї метою 400 г пекарських дріжджів висушували в сушильній шафі при +60°C до постійної ваги. Вихід – 105,4 г сухих дріжджів. 100,0 г сухих дріжджів та окремо 100,0 г порошкових висушених вичавок грузлика димчатого поміщали у круглодонну колбу (1,0 л) і заливали при перемішуванні 400 мл 20% розчину гідроксиду натрію. Колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 6 годин. Суміш охолоджували, переносили у ділильну лійку і збовтували з 200 мл метиленхлориду. Нижній метиленхлоридний шар відділяли і процедуру екстракції повторювали ще двічі. Для обезводнення метиленхлоридний шар фільтрували через безводний сульфат натрію, а розчинник відганяли до невеликого об'єму і висушували у фарфоровій чашці. 2,0 г неочищеного ергостерину розчиняли в 100 мл 96° етанолу при нагріванні його до кипіння. Розчин фільтрували, прозорий етанольний розчин поміщали в холодильник для кристалізації ергостерину. Осад висушували і ще раз перекристалізовували із 25–30 мл суміші 96° етанол – бензол (1:1). Після охолодження суміші кристали промивали водою і висушували.

Іншу методику застосували для отримання ергостерину лише для грузлика димчатого. Для цього 100,0 г подрібнених висушених вичавок грузлика поміщали в апарат Соксклета і протягом 3 годин екстрагували метанолом. Метанольний екстракт ще гарячим фільтрували, метанол відганяли до 80–120 мл і поміщали в морозильну камеру при -18°C на три години. Осад, що при цьому випадав, швидко відфільтровували на лійці Бюхнера, промивали охолодженням до -18°C метанолом і висушували в сушильній шафі при +60°C. Далі очистку ергостерину здійснювали хроматографією на силікагелі L 40/160. 1,0 г осаду (точна наважка) розчиняли в 8,0 мл гексану і наносили на колонку силікагелю (90×15 мм), попередньо промиту гексаном. Колонку промивали послідовно

гексаном; гексан – етилацетат (6:1); гексан-етилацетат-метанолом 4:2:1 (по 100 мл кожного). Збирали фракції по 1,5 мл у попередньо зважені з точністю до третього знака після коми епендорфівські пробірки. Розчинник після хроматографії випаровували, пробірки зважували.

Аналіз ергостерину. Аналіз речовин здійснювали газорідною хроматографією – мас-спектрометриєю (ГРХ – МС), якісною реакцією на стероїдне ядро, ТШХ на силікагелі.

Осад, який отримали виморожуванням метанольного екстракту грузлика димчатого, досліджували за допомогою мас-спектрометра 6С/MS Agilent Technologies 6890 N/5975 В, приєднаного до хроматографічної колонки (модель HP-5МС, довжина – 30 м, діаметр – 0,25 мм, наповнювач: 95% диметилполісилоксан + 5% дифенілполісилоксан; газ-носій – гелій із постійним потоком 1,5 мл/хв). Промивали колонку метанолом.

Газова хроматографія запрограмована на рівень зростання температури на 15°C/хв від 75° до 300°C. Початкову температуру підтримували протягом 1 хв, а кінцеву – протягом 8 хв. Використали мас-селективний детектор із температурою інтерфейсу T=250°C, іонізацію здійснювали електронним ударом, енергія іонізації – 70 eV, температура іонного джерела T=230°C; температура квадруполя T=150°C.

Стероїдну природу речовин, що отримали, підтверджували за допомогою реакції Лібермана-Бурхарда. З цієї метою 10 мг очищеної речовини розчиняли в 1,0 мл оцтового ангідриду. До розчину обережно, щоб не змішувались рідини, доливали 96% сульфатної кислоти. Протягом 1–3 хв спостерігали за результатом реакції.

Виявлення ергостерину у фракціях, що витікали з колонки, а також контроль за чистотою речовин здійснювали шляхом ТШХ на силікагелі. Хроматографували у системі гексан-етилацетат-метанол 40:6:1. Хроматограму обприскували насиченим розчином хлориду стибію у хлороформі. При наявності ергостерину через 30 хв можна спостерігати фіолетові плями у місці його знаходження [5].

Результати та їх обговорення

Із 100 г сухих пекарських дріжджів шляхом лужного гідролізу сировини з наступною екстракцією метиленхлоридом, кристалізацією з етанолу та суміші бензолу з етанолом отримали 0,71 г білого порошку, нерозчинного у воді, але розчинного в органічних розчинниках. Аналогічні процедури, що виконали з висушеними вичавками грузлика димчатого, дали можливість отримати 0,52 г речовини.

Обидві речовини давали позитивну реакцію Лібермана-Бурхарда на стероїдне ядро. Через хвилину після змішування реактивів на межі двох рідин виникало рожево-фіолетове кільце, а верхній шар забарвлювався у зеленій колір.

ТШХ на силікагелі обох отриманих речовин виявила по одній плямі з однаковим значенням R_F, що через декілька хвилин забарвлювались у фіолетовий колір при обприскуванні хроматограм хлоридом стибію (рис. 1). Це може бути доказом, що ці речовини є ергостерином.

При екстракції 100,0 г вичавок грузлика димчатого метанолом з наступною відгонкою розчинника і кристалізації основної речовини з охолодженого до -18°C

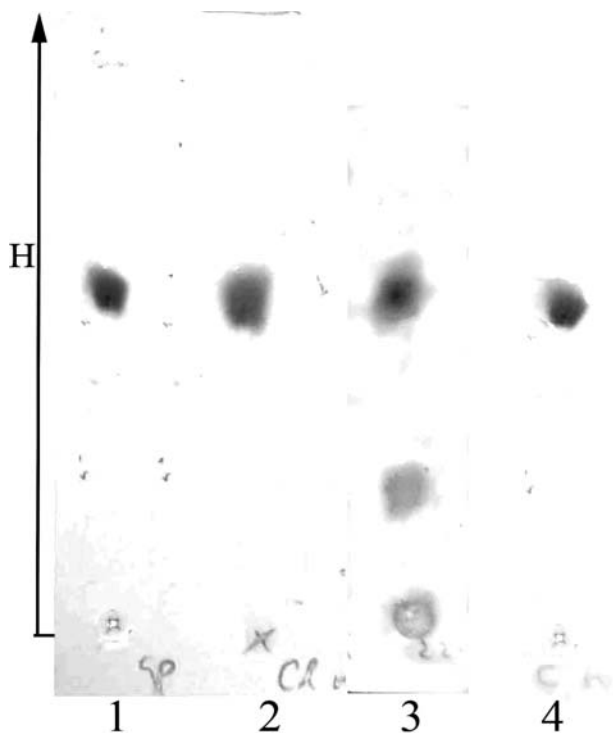


Рис. 1. Тонкошарова хроматограма зразків ергостерину.

Примітки: 1 – із сухих дріжджів; 2 – із грузлика димчатого лужним гідролізом плодових тіл; 3 – виморожений метанольний екстракт перед нанесенням на колонку силікагелю; 4 – після очистки хроматографією на колонці силікагелю.

Таблиця 1

Результати аналізу ГРХ – МС субстанції метанольного екстракту грузлика димчатого, що одержана виморожуванням

Речовина	Вміст у субстанції (у %)	Ступінь достовірності*
Ліноленова кислота	8,9	38 %
Ергоста-5,7,22-трієн-3β-ол (ергостерин)	91,1	96 %

Примітка: ступінь достовірності обчислювали комп'ютерною програмою при порівнянні з відомими мас-спектрами бібліотеки NIST02 (до 174000 речовин).

Список літератури

- Weete J.D. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols / J.D. Weete, M. Abril, M. Blackwell // *PLoS One* – 2010. – Vol. 5. – № 5. – e 10899.
- Wani B.A. Nutritional and medicinal importance of mushrooms / B.A. Wani, R.H. Bodha, A.H. Wani // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2010. – Vol. 4. – № 24. – P. 2598–2604.
- Аналіз хімічного складу вимороженого метанольного екстракту із плодових тіл справжніх грибів / [Л.В. Панчак, М.В. Цивінська, В.О. Антонюк, Р.С. Стойка] // *Біотехнологія*. – 2011. – Т. 4. – № 5. – С. 90–96.
- Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Л.: Кварт. – 2005. – 554 с.
- Лазурьевский Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазурьевский, И.А. Терентьева, А.А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. – С. 127–129.

Відомості про автора:

Антонюк В.О., д. фарм. н., с. н. с. відділу проліферації клітин та апоптозу, Інститут біології клітини НАН України, професор каф. фармакогнозії та ботаніки, Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua.

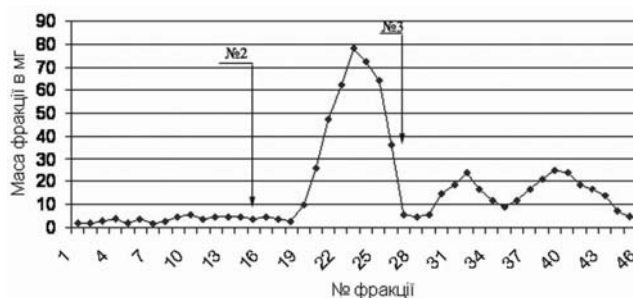


Рис. 2. Розділення вимороженого залишку метанольного екстракту грузлика димчатого на колонці силікагелю.

Примітки: №2 – місце початку промивки колонки системою гексан – етилацетат – метанол 40:6:1; №3 – початок промивки колонки системою гексан – етилацетат – метанол 4:2:1.

метанольного розчину отримали 6,6 г жовто-коричневої субстанції, яка при ТШХ на силікагелі виявляла пляму ергостерину, але ще містила додаткову пляму (рис. 1). Цю субстанцію проаналізували ГРХ – МС (табл. 1).

Очистка на колонці силікагелю дала кращі результати із меншими втратами основної речовини, ніж його кількаретова перекристалізація. Графік очистки ергостерину наведений на рис. 2. За даними ТШХ, ергостерин містився у 19–26 фракції. Ці фракції об'єднували, а розчинник випаровували, зважували й аналізували за допомогою ТШХ на силікагелі (рис. 2).

Висновки

За допомогою газорідинної хроматографії-мас-спектрометрії у базидіомах грузлика димчатого виявили високий вміст ергостерину. Ергостерин при виморожуванні метанольного екстракту випадає в осад у майже чистому стані.

ТШХ отриманого зразка із достовірним зразком ергостерину, який виділили із пекарських дріжджів, підтвердила правильність ідентифікації.

Хроматографічна очистка на колонці силікагелю має переваги над лужним гідролізом сировини і дала можливість отримати чистий ергостерин в одну стадію з вищим виходом (виділили 2,54 г (2,54%) чистого ергостерину; це більше, ніж із кращих сортів дріжджів). Цей метод очистки відкриває можливість також для отримання інших речовин, що містяться в метанольній витяжці.

References

- Weete, J. D., Abril, M., & Blackwell, M. (2010) Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLoS One*, 5(5), e 10899.
- Wani, B. A., Bodha, R. H., Wani, A. H. (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2598–2604.
- Panchak, L. V., Tsyvinska, M. V., Antonyuk, V. O., Stoika, R. S. (2011) Analiz khimichnoho skladu vymorozhenoho metanolnoho ekstraktu iz plodovykh til spravzhnich hrybiv [Analysis of chemical composition of substances, obtained at freezing of the methanol extract of fruit bodies of genuine mushrooms]. *Biotechnologiya*, 4(5), 90–96. [in Ukrainian].
- Antonyuk, V. O. *Lektyny ta yikh syrovynni dzherela [The lectins and their resources]*. Lviv: Quart. [in Ukrainian].
- Lazur'yevskij, G. V., Terent'yeva, I. A., Shamshurin, A. A. (1966) *Prakticheskie raboty po khimii prirodnykh soedineniy [Practical works from chemistry of natural compounds]* Moscow: Higher school. [in Russian].

Надійшла в редакцію 27.03.2014 р.