

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. М. Марчишин

УДК 582.28+581.19+576.345

ОЧИСТКА ФУРАНОЛАКТАРАНАУ З БАЗИДИОМ СИРОЇЖКИ ЧОРНОЇ (RUSSULA ADUSTA (PERS. EX FR.) FR.)

© В. О. Антонюк

Інститут біології клітини НАН України

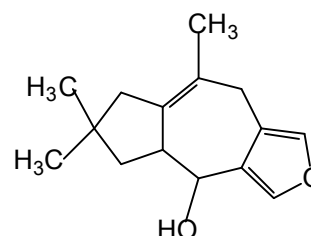
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Резюме: з висушених базидієм сиріожки чорної (*Russula adusta* (Pers. ex Fr.) Fr.) шляхом екстракції метилен хлоридом одержано екстракт, який містив речовину з жовто-зеленою флуоресценцією з таким самим значенням Rf, як і у аналогічному екстракті з базидієм *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr. При розділенні на колонці силікагелю цього екстракту з послідовною зміною розчинників речовину було очищено і досліджено її фізико-хімічні властивості. Встановлено, що одержана речовина – сесквітерпен 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол є ідентичною до речовини, одержаної нами раніше з базидієм *Lactarius pergamenus*. Очищена речовина має антимікробну, протигрибкову і антипроліферативну активність і може становити практичний інтерес. Через інтенсивну флуоресценцію в УФ-світлі на ТШХ вона може бути також використана в хемосистематичних дослідженнях для більш точного визначення систематичного положення того чи іншого виду грибів родини Russulaceae.

Ключові слова: *Russula adusta*, *Lactarius pergamenus*, сесквітерпени, 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол, очистка, властивості.

Вступ. Базидіальні гриби можуть бути джерелом різноманітних БАР медичного призначення, однак через певні обставин їх потенціал використовується поки що не повною мірою. Серед базидіальних грибів можна виділити велику за кількістю видів та поширеністю в лісах України родину сиріожкових (Russulaceae), метаболіти яких виявляють противірусну, антибактеріальну, антипроліферативну та цитотоксичну дію [1]. Ця родина складається лише з двох родів – *Russula* (сиріожка) і *Lactarius* (хрящ-молочник). Найважливішою ознакою, за якою ці роди можна відрізнити, – це наявність у базидіомах хрящів-молочників молочного соку. У роді сиріожка цей сік відсутній. Молочний сік у грибах роду *Lactarius* містить цілий комплекс речовин, одні з яких мають антимікробну, протигрибкову або відлякуючу для тварин дію, а інші стабілізують емульсію. Поки гриби молоді і базидіоми наповнені молочним соком, деякі з видів *Lactarius* не зазнають пошкодження мікроорганізмами, грибками і червами. До них належить хрящ-молочник пергаментний (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr.), хімічний склад якого нами досліджувався раніше [2, 3]. Результатом цих досліджень було встановлення факту, що серед ліпофільних речовин найбільшою антипроліферативною та протигрибковою активністю володіє сесквітерпенової природи сполука, структуру якої було визначено за допомогою мас- та ЯМР-спектроскопії. Сукупні дані мас-спектроскопії і ЯМР ¹H аналізу дозволили при-

пустити, що одержана речовина є 6,6,8-триметил-4,4а,5,6,7,9-гексагідро-2-оксациклопента[f]азулен-4-олом, або 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-олом із наступною структурою:



Це жовта, схожа на олію густа рідина, без запаху, застигає у тверду масу при температурі мінус (17±1) °C і є добре розчинною в метанолі, етанолі, гексані, ацетоні, димексиді, але не розчинна у воді. Характерною ознакою цієї речовини є також інтенсивна жовто-зелена флуоресценція в УФ-світлі при розгляді пластинок силуфолу, на яких проводили її хроматографування. Ця речовина цікава тим, що може бути використана для лікування мікозів стоп, викликаних *Candida albicans*, якщо її ввести у мазеву основу [4]. Необхідно зазначити, що у свіжих базидіомах *Lactarius pergamenus* її немає, вона з'являється лише в процесі сушки базидіом.

Через те, що названа речовина може становити певний практичний інтерес, ми вирішили встановити, чи можуть бути джерелом її одержання інші споріднені гриби родини Russulaceae. В результаті пошуку було виявлено, що подібна

жовто-зелена флуоресценція спостерігається в тонкошарових хроматограмах ліпофільних екстрактів цілого ряду інших грибів родини Russulaceae. І чи не найбільш інтенсивне світіння спостерігалось для ліпофільного екстракту сушених грибів сиріожки чорної (*Russula adusta* (Pers. ex Fr.) Fr. Тому цей гриб обрано нами для одержання сполуки з жовто-зеленою флуоресценцією і встановлення її ідентичності з речовиною такого ж світіння, одержуваної з базидієм *Lactarius pergamenus*.

Методи дослідження. Базидіоми грибів заготовляли у період їх масової появи у липні-серпні в мішаному лісі Сколівського району Львівської області. Протягом 12 год після збору їх доставляли у лабораторію. Їх поміщали в сушильну шафу при +52 °С, де їх протягом 24 – 48 год висушували.

У роботі використовували силікагель для колонкової хроматографії фірми Chemapol (Чехія) L40/160 меш, розчинники: метанол, н-гексан, етилацетат, ацетон, метиленхлорид (всі – ч.д.а.).

Висушені в сушильній шафі базидіоми сиріожки чорної та хряща-молочника пергаментного подрібнювали до порошку ($d < 0,5$), поміщали в апарат Соксклета і протягом 3-х год екстрагували метилен хлоридом. З одержаних екстрактів відганяли до невеликого об'єму розчинник, рештки якого випаровували у сушильній шафі при +52 °С. Одержаний сухий залишок зважували на аналітичних вагах.

Далі розділення одержаної суміші речовин сиріожки чорної здійснювали хроматографією на колонці силікагелю. З цією метою 0,5 г темно-коричневої густої маси, одержаної шляхом екстракції метилен хлоридом, розчиняли в 3,0 мл н-гексану (ч.д.а.), нерозчинений залишок відцентрифугували, висушували і зважували, а прозорий гексановий розчин наносили на колонку силікагелю Л 40/160 висотою 14 см і діаметром 1,5 см, яку було попередньо промито чистим н-гексаном. Збирали фракції по 1,5 мл в попередньо зважені на аналітичних вагах пробірки. Після того, як нанесений зразок увійшов в колонку, її мили послідовно наступними розчинниками: н-гексан (60 мл), гексан-етилацетат 7,5 : 1 (75 мл), гексан-етилацетат-метанол 4:2:1 (80 мл), і на кінець, метанолом (60 мл). Після цього колонка повністю очистилась від барвних речовин. Наявність фуранолактарану у фракціях визначали шляхом ТШХ у системі гексан-етилацетат 7,5 : 1 при перегляді хроматограм в УФ-світлі. Далі фракції поміщали в термостат, нагрітий до +50 °С і розчинник випаровували. Потім зважували кожену фракцію і будували графік № фракції – маса речовини у ній. Для остаточної очистки фуранолактарану

фракції, що його містили, об'єднували і проводили повторну хроматографію на колонці силікагелю. З цією метою 56 мг речовини з фракцій № 40 – 43 розчиняли в 1 мл н-гексану при +30 °С і наносили на колонку силікагелю Л 40/160 (висота – 10 см, діаметр – 1,2 см). Колонку промивали послідовно н-гексаном (20 мл), сумішшю н-гексан – ацетон 10:1 (30 мл) і сумішшю н-гексан – ацетон – етилацетат 4:2:1 (50 мл), збираючи фракції об'ємом 1 мл.

За допомогою ТШХ на пластинках "Силуфол" у одержаних фракціях виявляли речовину, що дає жовто-зелену флуоресценцію в УФ-світлі. Фракції, у яких спостерігалась лише жовто-зелена флуоресценція в УФ-світлі, без домішки інших свічень об'єднували, а розчинник випаровували. У одержаній речовині визначали температуру плавлення, розчинність у органічних розчинниках і воді, вимірювали УФ-спектр, а також визначали, чи спостерігається зниження температури плавлення при змішування з відомим зразком фуранолактарану, який було одержано з *Lactarius pergamenus*.

Результати й обговорення. З 30 г висушених подрібнених базидієм *Russula adusta* екстракцією метилен хлоридом було одержано 0,537 г темно-коричневої маси (1,79 %), коли за тих же умов з висушених базидієм *Lactarius pergamenus* було одержано 2,161 г (6,86 %) світлої жовто-коричневої твердої маси. Тверда консистенція екстракту висушених базидієм *Lactarius pergamenus* пояснюється високим вмістом стеаринової кислоти. Її вміст у метилен хлоридному екстракті може сягати 50 % і більше. У базидіомах *Russula adusta* стеаринова кислота відсутня [2]. Графік виходу маси речовин з колонки (рис. 1) показує, що у такому екстракті можна виділити щонайменше 7 різних фракцій, які відрізняються консистенцією, кольором та розчинністю. Речовина з жовто-зеленою флуоресценцією в УФ-світлі, яка за значенням R_f відповідала фуранолактарану *Lactarius pergamenus*, містилася у фракціях № 40 – 44.

Після доочистки об'єднаних фракцій хроматографією на колонці силікагелю (див. матеріали і методи) було одержано 42,3 мг світло-жовтої мазеподібної речовини добре розчинної у метанолі, гексані, метилен хлориді, ацетоні з максимумом поглинання в УФ-світлі при 230 нм. Одержана речовина мала температуру плавлення мінус 17 °С і не давала депресії температури плавлення при змішуванні із зразком 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-олу, який було одержано із базидієм *Lactarius pergamenus*. З цього можна зробити висновок, що обидві речовини є ідентичними.

Ця речовина виявляла певну антимікробну активність (проти *Staphylococcus aureus*) та досить

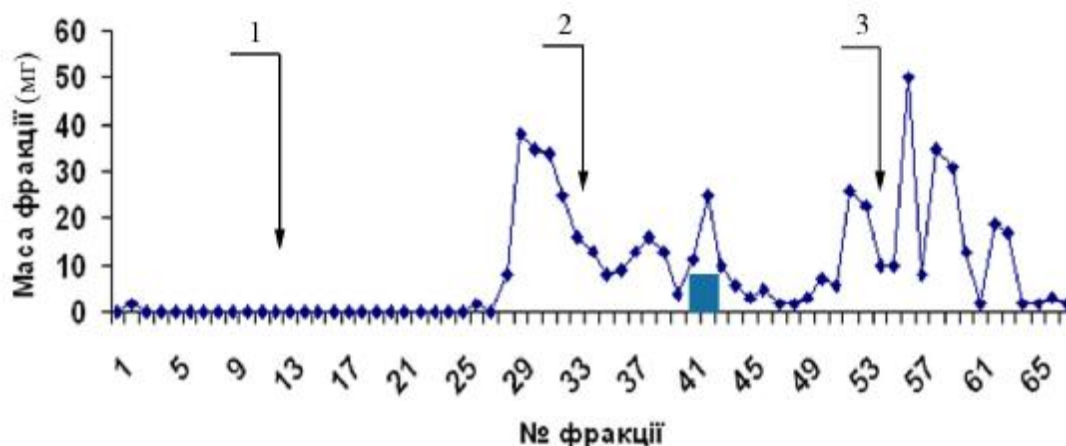


Рис. 1. Розділення метиленхлоридного екстракту *Russula adusta* на колонці силікагелю.

Примітки: цифрами позначено місця нанесення розчинників: 1 – гексан – етилацетат (7,5:1); 2 – гексан – етилацетат – метанол (4:2:1); 3 – метанол. Фракції, які були відібрані для подальшої очистки, позначені прямокутником.

виражену протигрибкову (проти *Candida albicans*) і цитотоксичну активність проти клітин мишачого лейкозу лінії L1210 [3, 4]. Разом з тим вона відсутня у свіжих грибах як *Lactarius pergamenus*, так і *Russula adusta*, утворюючись при сушці базидіом грибів при підвищеній температурі з більш лабільних попередників. У *Lactarius pergamenus* такими попередниками є дуже пекучі на смак діальдегіди, які утворюються на повітрі при пошкодженні базидіом з біологічно неактивних попередників, зокрема, із стеарату велютіналу [5]. Ось чому ліпофільні екстракти *Lactarius pergamenus* мають високий вміст стеаринової кислоти. У *Russula adusta* цілком очевидно таких стеаратів немає. Про це свідчить і відсутність пекучого смаку в сировіжці чорної та різний ступінь захищеності проти грибних паразитів. Так, якщо молоді гриби *Lactarius pergamenus* практично не бувають червивими, то дуже важко знайти базидіоми *Russula adusta*, які не пошкоджені личинками грибної мухи. Кінцеві продукти перетворень сесквітерпенів у різних грибів родини *Russulaceae* часто є одними і тими ж. Логічно було б вважати, що первинні продукти, які ведуть до утворення фуранолактарану, які містяться у свіжих грибах *Russula adusta*, мають вищу захис-

ну активність, але дія їх не є універсальною. Високий вміст цього фуранолактарану у *Russula adusta*, на відміну від інших грибів роду *Russula*, свідчить про філогенетичну близькість сировіжки чорної до роду *Lactarius*, на це вказують і ряд морфологічних ознак.

Висновки. Застосовуючи хроматографію на силікагелі за розробленою нами методикою з метилен хлоридного екстракту висушених базидіом сировіжки чорної (*Russula adusta*) можна ізолювати 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол з виходом 0,14 % від початкової маси базидіом. Ця речовина утворюється в процесі сушки з більш лабільних первинних речовин і була нами раніше ізольована з базидіом *Lactarius pergamenus*. Виявлення цієї речовини у висушених базидіомах сировіжки чорної свідчить про подібність хімічного складу грибів родів *Russula* і *Lactarius*. Ця речовина може становити певний практичний інтерес, оскільки проявляє протигрибкову і антимікробну активність. Через інтенсивне світіння в УФ-світлі на ТШХ вона може бути також використана в хемосистематичних дослідженнях для більш точного визначення систематичного положення того чи іншого виду грибів родини *Russulaceae*.

Література

1. Lindequist U. The pharmacological potential of mushrooms / U. Lindequist, T. Niedermeyer, W. – D. Jülich // eSAM. – 2005. – Vol. 2, N 3. – P. 285–299.
2. Хімічний склад вимороженого метанольного екстракту базидіом справжніх грибів / Л. В. Панчак, М. В. Цивінська, В. О. Антонюк [та ін.] // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 90-96.
3. Хімічний склад та антипроліферативна активність

- фракцій метанольного екстракту базидіом *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr / Л. В. Панчак, О. Ю. Ключівська, М. В. Цивінська [та ін.] // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 78 – 85.
4. Пат. 54969 Україна, МПК А61К9/06, А61К35/84. Мазева композиція для зовнішнього лікування мікозів стоп / О. І. Зайченко, Л. В. Панчак, В. О. Антонюк [та ін.]; заявник і патентовласник О. І. Зайченко,

Л. В. Панчак, В. О. Антонюк, О. О. Немченко, С. Б. Гошкіна, М. В. Цивінська, Р. С. Стойка, О. П. Корнійчук, В.В. Данилейченко – № у 2010 08043 ; заявл. 29.06.2010 ; опубл. 25.11.2010, Бюл. №22.

5. Jonassohn M. Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes. Structural properties that affect reactivity and bioactivity/ M. Jonassohn // Doctoral thesis. – Lund University (Sweden): Lund, 1996. – 83 p.

ОЧИСТКА ФУРАНОЛАКТАРАНА ИЗ БАЗИДИОМ ПОДГРУЗКА ЧЁРНОГО (RUSSULA ADUSTA (PERS. EX FR.) FR.)

В. А. Антонюк

Институт биологии клетки НАН Украины

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме: из высушенных базидиом подгрузка чёрного (*Russula adusta* (Pers. ex Fr.) Fr.) путём экстракции метилен хлоридом получен экстракт, который содержал вещество с жёлто-зелёной флюоресценцией с теми самими значениями Rf, что и у аналогичного экстракта из базидиом *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr. При разделении этого экстракта на колонке силикагеля с последовательной сменой растворителей вещество было очищено и исследовано его физико-химические свойства. Установлено, что полученное вещество – сесквитерпен 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол и является идентичным к веществу, полученному нами ранее из базидиом *Lactarius pergamenus*. Очищенное вещество имеет антимикробную, противогрибковую и антипролиферативную активность и может представлять практический интерес. Через интенсивную флюоресценцию в УФ-свете на ТСХ оно может быть также использовано в хемосистематических исследованиях для более точного определения систематического положения того или иного вида грибов семейства Russulaceae.

Ключевые слова: *Russula adusta*, *Lactarius pergamenus*, сесквитерпены, 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол, очистка, свойства.

PURIFICATION OF FURANOLACTARANE FROM BASIDIOMES WINECORK BRITTLLEGILL (*RUSSULA ADUSTA* (PERS. EX FR.) FR.)

V. O. Antonyuk

Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine

Lviv National Medical University by Danylo Halytsky

Summary: an extract from dried up basidiomes of Winecork brittlegill (*Russula adusta* /Pers. ex Fr./ Fr.) by extraction with methylene chloride was received. The extract contained a substance with yellow-green fluorescence with the same value of Rf, as in the analogical extract from basidiomes of *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr. At division of this extract on a silicagel column with the successive change of solvents a substance was purified and its physical and chemical properties were analyzed. It was determined, that the purified substance is a sesquiterpene of 3,14,15-trimethylfuranolactarane-8-ol and it is identical to the substance obtained before from *Lactarius pergamenus* basidiomes. The purified substance exerts antimicrobial, antifungal and antiproliferative activity and can be of practical interest. Using intensive fluorescence in UV-light on TLC this substance can be also used in chemosystematic research for more exact determination of systematic position of the type of mushrooms of Russulaceae family.

Key words: *Russula adusta*, *Lactarius pergamenus*, sesquiterpenes, 3,14,15-trimethylfuranolactarane-8-ol, purification, properties.