

УДК: 615.359:582.284

СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ *LACTARIUS PERGAMENUS* (FR.) FR
ТА БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ

- ¹ Л. В. Панчак, к. фарм. н., асис. каф. заг., біоорган. та фізкол. хімії
^{1,2} В. О. Антоноук, д. фарм. н., с. н. сп. ² від. проліфер. клітин та апопт., проф. ¹ каф. фармаког. та бот.
- ¹ Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
² Інститут біології клітини НАН України, м. Львів

Базиціальні гриби можуть бути джерелом різноманітних біологічно активних речовин (БАР) медичного призначення, однак поки що їх потенціал не використовується повною мірою [1, 6]. До даного класу грибів, які відзначаються значною видовою різноманітністю, а отже, великою кількістю потенційних джерел БАР, належить родина *Russulaceae* (сироїжкові або русулові). Найбільш дослідженою групою БАР грибів цієї родини, згідно літературних даних [10], є сесквітерпени, які відіграють важливу біологічну роль у більшості з видів роду *Lactarius DC. ex S. F. Gray* (хрящ-молочник). Так, з метанольного екстракту висушених грибів, сировинна база яких у західних областях України є достатньою, *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr. (хряща-молочника пергаментного) нами було очищено та ідентифіковано сесквітерпенову сполуку (3, 14, 15-триметил-фуранолактаран-8-ол), яка виявляє антимікробну, протигрибкову та антипроліферативну активність [8, 9].

Зважаючи на перспективу використання вищевказаної сировини та фармакологічно активної субстанції з неї на основі 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу у медицині виникає потреба у розробці методів їх стандартизації.

Метою даного дослідження була розробка методики контролю якості (МКЯ) висушених базидіом хряща-молочника (х.-м.) пергаментного та густого екстракту (субстанції) базидіом хряща-молочника пергаментного за вмістом основної діючої або найбільш характерної речовини для даної сировини та визначення основних числових показників та їх допустимих меж.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були висушені при $+52 \pm 2$ °С базидіоми х.-м. пергаментного, зібрані в Сколівському районі Львівської області протягом усього вегетаційного періоду (липень-вересень) та густий екстракт базидіом х.-м. пергаментного, який отримували шляхом упарювання метанольного екстракту, з наступною обробкою гексаном, як описано раніше [9].

Для розробки МКЯ на «Х.-м. пергаментного базидіоми» та «Х.-м. пергаментного базидіом густий екстракт» проведено дослідження з вибору параметрів стандартизації із врахуванням вимог ДФУ [2, 3, 4, 5],

за відсутності аналогу монографії на вищі гриби як об'єкту дослідження.

Результати дослідження та їх обговорення

Параметрами стандартизації для базидіом обрано: ідентифікацію (опис, тонкошарову хроматографію (ТШХ), температуру плавлення стеаринової кислоти); втрату в масі при висушуванні; загальну золу; золу, нерозчинну в 10 % розчині хлористоводневої кислоти; сторонні домішки; кількісний вміст 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу у перерахунку на абсолютно суху сировину.

Для густого екстракту базидіом було обрано наступні параметри стандартизації: ідентифікацію (опис, розчинність, ТШХ); втрату в масі при висушуванні; залишкові розчинники (гексан); важкі метали; мікробіологічну чистоту; кількісний вміст 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу у перерахунку на абсолютно суху сировину.

Опис. Цілі, фрагментовані або ламані базидіоми середніх та великих розмірів висушених грибів, що складаються з шапок і ніжок. Шапки 6-12 см у діам. (цілі), плоскі або увігнуто-розпростерті (лійкоподібні), зморшкуваті або гладкі, іноді з тріщинами. М'якуш щільний. Пластинки дуже густі, прямі або звивисті. Край шапки піднятий або рівний, іноді хвилястий. На зламі м'якуш шапки має кремове або світло-коричневе забарвлення, дещо темніша шкірочка, і найтемніші пластинки – від коричневого до темно-коричневого, контрастують з м'якушем.

Ніжки довгі (довжина не менше діаметра шапки), щільні або з порожниною, здебільшого зморшкуваті. М'якуш ніжки має таке ж забарвлення, як м'якуш шапки, і також дещо темнішу шкірочку. Запах приємний, грибний. Смак неспецифічний, злегка гіркуватий.

Втрата в масі при висушуванні (ДФУ 2.2.32) не більше 9,8% (1,0 г здрібненої на порошок сировини сушать при температурі 105 °С протягом 2 год); **загальна зола** (ДФУ 2.4.16) не більше 9%; **зола, не розчинна в хлористо-водневій кислоті** (2.8.1) не більше 8%; **сторонні домішки** (ДФУ 2.8.2) не більше 10% органів рослин, не більше 10% мінеральних часток і не більш 2% інших сторонніх домішок.

За зовнішніми ознаками висушені базидіоми *Lactarius pergamenus* практично неможливо відрізнити від висушених базидіом *L. piperatus*. Останній гриб ряд дослідни-

ків вважають лише різновидністю *L. pergamenus*. Вони дуже подібні до висушених базидіюм *L. vellereus* та *L. controversus*, які можливо відрізнити лише тоді, коли є достатньо великі фрагменти шапок і ніжок, на яких можна розрізнити густоту пластинок і оцінити розміри ніжок цих грибів. Не відрізняються вони і за мікроскопічними ознаками. Тому параметрами стандартизації обрано хімічний склад базидіюм.

Як показали наші попередні дослідження [7], висушені базидіюми *L. pergamenus* від споріднених видів (*L. vellereus* та *L. controversus*) суттєво відрізняються за вмістом стеаринової кислоти, вміст якої у метанольному екстракті висушених базидіюм досліджуваного виду може сягати понад 75 %, тоді як у *L. vellereus* та *L. controversus* він є нижчим за 15 %. У інших досліджуваних нами видах грибів роду *Lactarius* (*L. quietus*, *L. rufus*, *L. torminosus*, *L. volemus*) у метанольному екстракті міститься олеїнова та пальмітинова кислоти. Ось чому стеаринова кислота може бути специфічною речовиною-маркером висушених базидіюм *L. pergamenus*. Ідентифікувати вказані гриби за іншими речовинами, наприклад, сесквітерпенами, важко. Стеаринову кислоту з метанольного екстракту легко можна одержати у чистому стані шляхом його виморожування і трьохкратної перекристалізації одержаного осаду з метанолу. Тому «температура плавлення стеаринової кислоти» (+69 °C) нами вибрано як важливий параметр при ідентифікації висушених базидіюм хряща-молочника пергаментного.

Температура плавлення – відкритий капілярний метод (ДФУ 2.2.15).

Досліджуваний розчин. 10,0 г здрібненої на порошок сировини (500) (ДФУ 2.9.12) екстрагують гексаном у співвідношенні 1:8 на водяній бані в апараті Соксклета впродовж 1 год., упарюють до ¼ початкового об'єму і поміщають в морозильну камеру (-18 °C). Осад, що утворюється, промивають холодним гексаном (-18 °C) і ще

двічі перекристалізують із нагрітого до +40 °C гексану. Температура плавлення осаду (стеаринової кислоти) повинна становити +69 °C ± 1 °C.

Проведені раніше дослідження показали, що протигрибову активність проявляють сесквітерпенові сполуки, серед них найбільш активною виявилась 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-ол [9].

Властивість 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу флуоресціювати жовто-зеленим світлом за довжини хвилі 365 нм, може бути використана як для ідентифікації методом ТШХ, так і для кількісного визначення як базидіюм, так і густого екстракту базидіюм. При проведенні ідентифікації на хроматограмі досліджуваного розчину (метанольних і гексанових екстрактів) в УФ світлі в нижній третині хроматограми має виявлятися зона з жовто-зеленою флуоресценцією 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу на рівні пурпурового забарвлення алантолактону – розчину порівняння. Рухома фаза: гексан – етилацетат (8:1), ТШХ пластинка із шаром силікагелю.

Ця речовина має максимум поглинання при 230 нм (рис.).

Для **кількісного визначення** 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу можна застосовувати хроматоспектрофотометричний метод.

З цією метою 20,0 г висушених при +55 ± 5 °C базидіюм *L. pergamenus*, здрібнених на порошок (500), поміщають в апарат Соксклета і екстрагують гексаном на водяній бані протягом 1 год. Розчинник з екстракту відганяють, сухий залишок висушують у сушильній шафі при температурі не вище +70 °C, після чого його розчиняють у підігрітому до +40 – 50 °C гексані і після фільтрування поміщають у морозильну камеру на -18 °C на 2 год. Осад, що при цьому випадає, видаляють. Одержаний сухий залишок розчиняють в 10,0 мл гексану, фільтрують і поміщають у пробірку з скляним притертим корком для нанесення на хроматографічну пластинку.

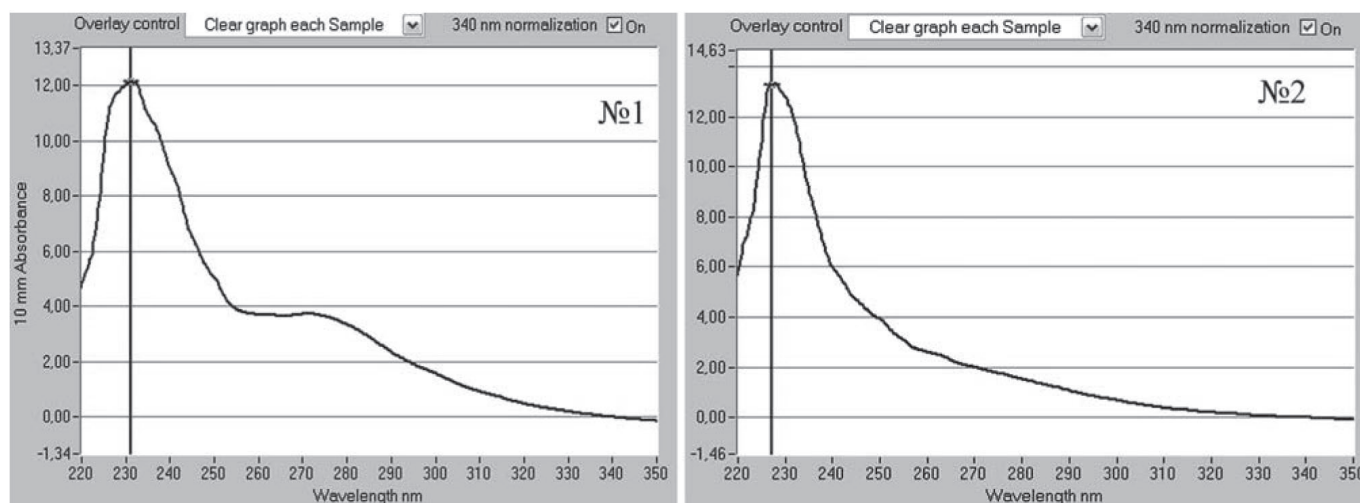


Рис. УФ-спектр 0,1 % метанольних розчинів 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу (№ 1) та алантолактону (№ 2), знятий на спектрофотометрі NanoDrop ND 1000

Одержаний розчин (0,1-0,2 мл) наносять смугою на хроматографічну пластинку із шаром силікагелю і хроматографують в системі гексан-етилацетат (8:1). Після висушування на повітрі при перегляді в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм на хроматограмах фракцій, що містять 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-ол, виявляється жовто-зелена флуоресціююча зона з R_f 0,3 ± 0,04. Ділянки сорбенту із речовиною на хроматографічних пластинках зішкрібають з основи пластинок і поміщають у пробірку. Силікагель збовтують з метанолом, фільтрують через скляний фільтр в чисту пробірку. Процедуру повторюють тричі. Одержаний елюат доводять метанолом до визначеного об'єму та вимірюють оптичну густину при довжині хвилі максимуму поглинання світла метанольного розчину алантолактону – 227 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм по відношенню до розчину порівняння.

Ці фракції об'єднують, розчинник випаровують. Готують 0,1 % розчин алантолактону в метанолі, який використовують як розчин порівняння. Вимірювання проводять на спектрофотометрі за максимуму поглинання алантолактону – 227 нм.

Кількісний вміст 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу в перерахунку на алантолактон у відсотках (X) оброблюють за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot C_0 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a \cdot V_2 \cdot (100 - b)},$$

де D_1 – оптична густина досліджуваного розчину при довжині хвилі 227 нм;

D_0 – оптична густина розчину стандартного зразка алантолактону при довжині хвилі 227 нм;

C_0 – концентрація розчину стандартного зразка алантолактону, г/мл;

a – маса сировини, г;

V_1 – загальний об'єм екстракту, мл;

V_2 – об'єм екстракту, нанесеного на хроматограму, мл;

V_3 – об'єм елюату з хроматограми, мл;

b – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

Аналіз кількісного вмісту 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу в густому екстракті здійснюють подібним чином з врахуванням того, що досліджуваний розчин готують безпосереднім розчиненням наважки в метанолі.

Вміст 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу в сировині у перерахунку на абсолютно суху сировину має бути не менше 0,6 %, а в густому екстракті – має бути не менше 8 % у перерахунку на алантолактон і густий екстракт.

Висновки

1. За відсутності аналогу монографії у Державній Фармакопеї України (ДФУ) вперше визначено основні числові показники, необхідні для стандартизації сировини висушених базидіальних грибів *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr. (хряща-молочника пергаментного) та субстанції із них.

2. Вперше запропоновано метод ідентифікації висушених базидіом *L. pergamenus*, що базується на визначенні температури плавлення стеаринової кислоти – найбільш характерної для даної сировини речовини.

3. Розроблено метод визначення кількісного вмісту 3, 14, 15-триметилфуранолактаран-8-олу (основної діючої речовини) у висушених базидіомах *L. pergamenus* хромато-спектрофотометричним методом.

Література

1. Біологічно активні речовини грибів відділу *Basidiomycota* / Т. С. Іванова, Н. А. Бісько, В. Ю. Барштейн, Т. А. Круподьорова // Пробл. харчування. – 2010. – № 1-2. – С. 42-47.
2. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
4. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Х.: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
5. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповнення 4. – Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.
6. Деякі аспекти фітохімічних досліджень базидіомицетів / О. В. Гречана, О. В. Мазулін, В. П. Буряк, Г. В. Мазулін // Запороз. мед. журн. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 55-56.

7. Панчак Л. В. Хімічний склад вимороженого метанольного екстракту базидіом справжніх грибів / Л. В. Панчак, М. В. Цивінська, В. О. Антонюк, Р. С. Стойка // Біотехнол. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 90-96.
8. 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. – № и 2010 08043; заявл. 29.06.2010; опубл. 25.11.2010, Біол. № 22.
9. Хімічний склад та антипроліферативна активність фракцій метанольного екстракту базидіом *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr / Л. В. Панчак, О. Ю. Ключівська, М. В. Цивінська [та ін.] // Біотехнол. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 78-85.
10. Abracham W.-R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? / W.-R. Abracham // Curr. Medi. Chem. – 2001. – Vol. 8, № 6. – P. 583-606.

Надійшла до редакції 19.02.2014

УДК: 615.359:582.284

Л. В. Панчак, В. О. Антонюк

СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ *LACTARIUS PERGAMENUS* (FR.) FR ТА БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ

Ключові слова: хрящ-молочник пергаментний, сесквітерпени, стеаринова кислота, хроматоспектрофотометрія.

Вперше запропоновано метод ідентифікації висушених базидієм *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr, визначено основні числові показники і розроблено метод кількісного визначення основної діючої речовини, необхідні для стандартизації сировини та субстанції.

Л. В. Панчак, В. О. Антонюк

СТАНДАРТИЗАЦІЯ СЫРЬЯ *LACTARIUS PERGAMENUS* (FR.) FR И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ

Ключевые слова: груздь пергаментный, сесквитерпены, стеариновая кислота, хроматоспектрофотометрия.

Впервые предложен метод идентификации высушенных базидием *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr, определены основные числовые показатели и разработан метод количественного определения основного действующего вещества, что необходимо для стандартизации сырья и субстанции.

L. V. Panchak, V. O. Antonyuk

STANDARDIZATION OF *LACTARIUS PERGAMENUS* (FR.) FR RAW MATERIAL AND BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCE

Keywords: *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr, sesquiterpenes, stearic acid, chromatographic spectrophotometric analysis.

A method for the identification of *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr dried basidiomes was first proposed, the main values were calculated and the method for the quantitative analysis of the main active substance has been worked out, which are necessary for standardization of the raw material and pharmacologically active substance.



УДК 615.2:577.127.4.

ПРЕНИЛ- И ГЕРАНИЛХАЛКАНОИДЫ, ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА

Сообщение 2. Фармакологическая оценка природных соединений дудника японского (*Angelica keiskei* (Miq.) Koidz.) (Обзор литературы)

■ ¹ В. И. Литвиненко, д. хим. н., проф, гл. н. с.

¹ Т. П. Попова, к. фарм. н., с. н. с.

² Н. В. Попова, д. фарм. н., зав. каф.нутрициол. и фармброматол.

¹ А. С. Аммосов, к. фарм. н., с. н. с.

² С. И. Дихтярев, д. фарм. н., проф. каф. промфармац. и эконом.

¹ Н. Ф. Маслова, д. биол. н., проф.

■ ¹ «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции» (ГП «ГНЦЛС»), г. Харьков

² Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

1. Введение

В предыдущем сообщении нами был приведен обзор литературы по изучению пренил- и геранилпроизводных халканоидов *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz., химическому составу рода Дудник (*Angelica*), локализации природных соединений в различных частях Дудника кейского (*Angelica Keiskei Koidzumi*). Установлено, что замещение пренильными (или геранильными) остатками в А и В-кольцах халконов увеличивает липофильность и модифицирует их молекулы, обладающие сродством к биологическим мембранам, что, в свою очередь, проявляется в многообразии лекарственных свойств природных соединений этих растений.

Произрастание *Angelica keiskei* – остров Нансё (Япония). Листья растения издавна использовались в качестве овощной культуры для питания и как растительное ле-

карственное средство. Растение содержит значительные количества природных соединений, имеющих желтую окраску, полученных из корней, стеблей, листьев и было классифицировано по двум типам на основе морфологических признаков и профилей элюции, полученных с помощью метода ВЭЖХ, по компонентам кумаринов [1, 10, 13]. Отмечено, что содержание халконов в новых побегах растения выше в стеблях, чем в листьях. В многолетних растениях (3 года), содержание халконов заметно увеличено в виде «запаса» в стеблях и корнях. Вместе с тем, содержание халконов в растениях не приводит к увеличению количества азота. Содержание халконов также не уменьшалось и при высушивании побегов, листьев и корней [13]. Таким образом, различия содержания халконов в порошке *Ashitaba* можно объяснить, главным образом, возрастом растений и образцов, взятых от них. Природ-