

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/234064141>

Muchomor czerwony (*Amanita muscaria*) jako obiecujące źródło ergosterolu (Fly agaric (*Amanita muscaria*) as promising source of ergosterol)

Article in PRZEMYSŁ CHEMICZNY · May 2012

CITATIONS

0

READS

5,078

6 authors, including:



Ewa Maciejczyk

Lodz University of Technology

10 PUBLICATIONS 88 CITATIONS

SEE PROFILE



Izabela Jasicka-Misiak

Opole University

73 PUBLICATIONS 1,030 CITATIONS

SEE PROFILE



Piotr Młynarz

Wrocław University of Science and Technology

164 PUBLICATIONS 2,904 CITATIONS

SEE PROFILE



Piotr P. Wieczorek

Opole University

267 PUBLICATIONS 4,241 CITATIONS

SEE PROFILE

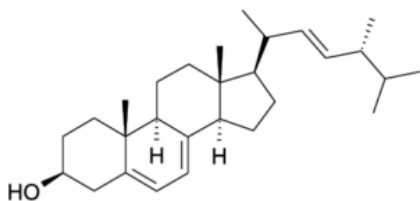
Muchomor czerwony (*Amanita muscaria*) jako obiecujące źródło ergosterolu

Fly agaric (Amanita muscaria) *as promising source of ergosterol*

Ergosterol (prowitamina D) jest jednym z głównych składników błon komórkowych grzybów. Ma on obiecujące właściwości immunostymulujące i przeciwrakowe. Muchomor czerwony stanowi bogate źródło ergosterolu, który po ekstrakcji *n*-heksanem lub octanem etylu łatwo jest otrzymać w formie krystalicznej.

Fly agaric was extd. with *n*-hexane or EtOH optionally under microwave aid to recover ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol and other steroids. The highest yield was achieved by extn. of the gills, EtOAc was more efficient than *n*-hexane as a solvent.

Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) (1) jest biologicznym prekursorem (prowitaminą) witaminy D₂¹⁾. Jest to główny steryd błon komórkowych grzybów. Ponieważ rzadko występuje w roślinach, jest stosowany jako ich specyficzny biomarker²⁾. Ergosterol wykazuje właściwości antyalergiczne, immunostymulacyjne i przeciwnowotworowe^{1, 3-6)} i dlatego poszukiwanie nowych źródeł tego związku cieszy się coraz większym zainteresowaniem.



(1)

Muchomor czerwony (*Amanita muscaria*) jest jednym z najpopularniej rosnących grzybów w Polsce. Klasyfikowany jest on jako

grzyb trujący, a mimo to jest spożywany w Meksyku i Włoszech po specjalnym przygotowaniu. Ze względu na charakterystyczny wygląd do przypadkowych zatruc w Polsce dochodzi rzadko, najczęściej u dzieci. Muchomor czerwony jest źródłem nietypowych związków chemicznych, z których wiele działa w różnorodny sposób na centralny układ nerwowy człowieka (neurotoksyny, halucynogeny, stymulanty)⁷⁾. Wiele z tych związków wciąż oczekuje na wydzielenie i identyfikację.

Poszukując nowych metabolitów wtórnych produkowanych przez muchomora czerwonego, w pierwszym etapie należało usunąć z jego tkanek substancje hydrofobowe. Okazało się, że dominującym związkiem znajdującym się w ekstraktach rozpuszczalnikami hydrofobowymi jest ergosterol. Dlatego też muchomora można uznać za interesujące źródło tego sterolu.

Od dawna wiadomo, że ergosterol jest głównym steroidem występującym w owocnikach grzybów kapeluszowych^{7, 8)}. Wiadomo też, że występuje on w owocnikach muchomora⁸⁾.

Dla celów przemysłu farmaceutycznego ergosterol otrzymywany jest z drożdży i olejów roślinnych. Ostatnio prowadzone są badania nad grzybami kapeluszowymi, w szczególności pieczarkami, jako użytecznym źródłem tego steroidu⁹⁾. Dlatego w tej pracy porównano zawartość ergosterolu w tkankach pieczarek i muchomora.

Część doświadczalna

Grzyby

Owocniki *Amanita muscaria* były zbierane jesienią 2009 i 2010 r. Grzyby przechowywano zamrożone. Do ekstrakcji używano próbek liofilizowanych, rozdrobnionych na proszek. Analizowano całe owocniki z obu zbiorów. Dodatkowo grzyby ze zbioru w 2009 r. frakcjonowano, oddzielając kapelusze od trzonów, a następnie

z kapeluszy wydzielono blaszki, miąższ, skórki i kropki. Do badań użyto również owocników pieczarki (*Agaricus bisporus*) dostępnej komercyjnie. Świeże grzyby zamrożono, a następnie poddano liofilizacji i przetwarzano identycznie jak próbki muchomora.

Metodyka badań

Ekstrakcję rozpuszczalnikami hydrofobowymi prowadzono w ten sposób, że próbkę o masie 5 g liofilizowanej pieczarki lub 7 g liofilizowanego muchomora ekstrahowano dwukrotnie (70 mL) *n*-heksanem lub octanem etylu (*n*-heksan 97%, Sigma-Aldrich; octan etylu 99,5%, POCh), stosując wytrząsarkę z częstotliwością 80 rpm. Ekstraktów nie łączono, ale po usunięciu rozpuszczalnika analizowano oddzielnie. Próbkę przechowywano w temp. 4°C.

Ekstrakcję *n*-heksanem wspomagana ultradźwiękami prowadzono w ten sposób, że 5 g owocników, 6 g blaszek, 6 g trzonów, 3 g miąższu, 3 g skórki lub 0,3 g kropek ekstrahowano trzykrotnie 10 mL/g *n*-heksanu przez 100 min w łaźni ultradźwiękowej. Otrzymane próbki odparowano do sucha w wyparce obrotowej w temp. 45°C, a następnie rozpuszczono w niewielkiej ilości rozpuszczalnika. Poziom ergosterolu i innych sterydów badano za pomocą GC-MS. Każdą procedurę powtarzano co najmniej trzykrotnie.

Z roztworów heksanowych pozostawionych w 4°C na kilka godzin krystalizował ilościowo czysty ergosterol.

Metody analityczne

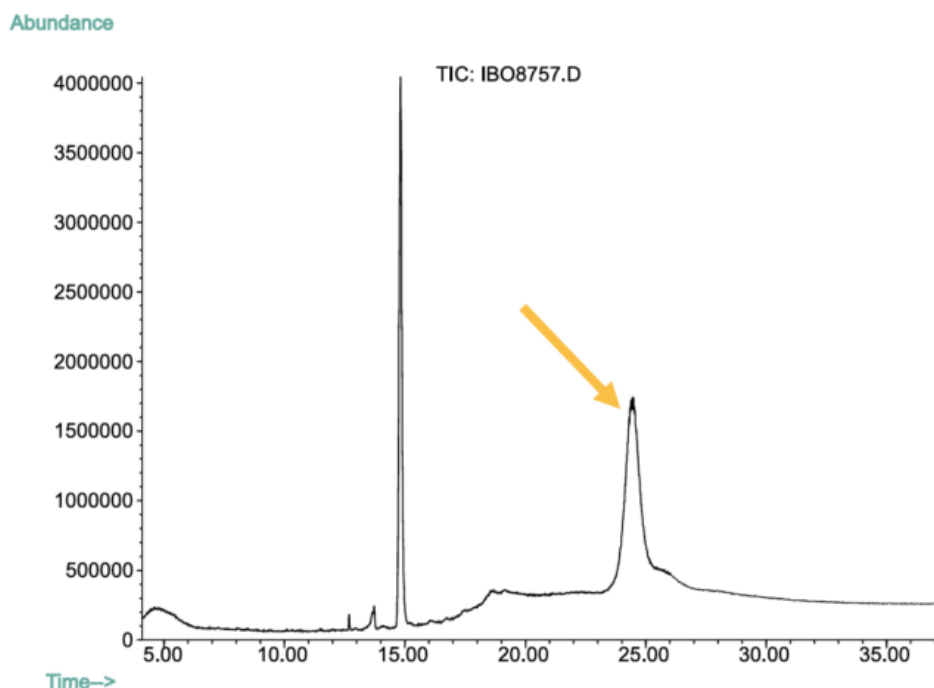
Analizy GC-MS wykonywano, stosując chromatograf gazowy HP 6890 sprzężony ze spektrometrem masowym HP 5973 Mass Selective Detector. Próbkę o objętości 1 µL wprowadzano metodą *on column* do kolumny kapilarnej HP5 MS o długości 30 m i średnicy 0,32 mm. Rozdział chromatograficzny prowadzono, stosując program temperaturowy: 50°C 2 min, 10°C/min, 280°C. Gazem nośnym był hel, którego prędkość przepływu ustalono na 2 mL/min. Energia jonizacji w detektorze mas wynosiła 70 eV. Identyfikacja substancji odbywała się na podstawie porównywania widma piku o określonym czasie retencji z widmami odpowiednich substancji zdeponowanymi w bazie danych NIST 1995 będącej elementem oprogramowania urządzenia sterującego pracą systemu GC-MS.

Strukturę ergosterolu badano metodą spektrometrii NMR.

Omówienie wyników

Badania potwierdziły, że ergosterol jest głównym składnikiem hydrofobowych ekstraktów muchomora czerwonego (rys.). Związek ten otrzymano w formie krystalicznej po rozpuszczeniu ekstraktu w małej ilości *n*-heksanu i wychłodzeniu roztworu w lodówce. Jego strukturę (w postaci monowodzianu) potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR oraz badań krystalograficznych⁽¹⁰⁾.

Wyniki ekstrakcji całych owocników muchomora *n*-heksanem i octanem etylu zebrane w tabeli 1 pokazują, że są one bogatym



Rys. Chromatogram tygodniowego ekstraktu z całych owocników muchomora czerwonego (*Amanita muscaria*). Ekstrahent – octan etylu; ergosterol pokazano strzałką

Fig. Chromatogram of ethyl acetate extract of *Amanita muscaria* obtained after one week long process. Ergosterol is indicated by arrow

Tabela 1. Ilość i rodzaj steroli otrzymanych po ekstrakcji całych owocników muchomora czerwonego (*Amanita muscaria*), mg/g suchej masy
Table 1. Sterols extracted from whole fungi, mg/g of dry mass

Rozpuszczalnik	Związek	Pierwsza ekstrakcja (1 tydzień)	Drua ekstrakcja (następny tydzień)
<i>n</i> -Heksan	ergosterol	24	0,8
Octan etylu	ergosterol	77	3
	ergosta-7,22-dien-3-ol	13	0,1
	ergosta-4,7,22-trien-3-ol	0	0,05

Tabela 2. Sterole otrzymane po wspomaganej ultradźwiękami ekstrakcji poszczególnych części owocników muchomora czerwonego *n*-heksanem, mg/g suchej masy

Table 1. Sterols extracted by using microwaves from fragments of fly agaric caps with *n*-hexane, mg/g of dry mass

Część owocnika	Związek	Pierwsza ekstrakcja	Druga ekstrakcja	Trzecia ekstrakcja
Cały owocnik	ergosterol	27	8	1
Trzon	γ -ergosterol	0,5	0,0	0,0
	ergosteron	0,4	0,0	1,0
	ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol	0,3	0,0	0,0
	ergosta-7,22-dien-3-ol	0,0	0,3	0,0
Mięsz kapelusza	ergosterol	13	11	0,7
Błaszki	ergosterol	24	21	0,7
Skórka kapelusza	ergosterol	13	3,3	1
Kropki	ergosterol	1	0,65	0,6

źródłem tego sterolu oraz że towarzyszą mu inne sterole, które można łatwo oddzielić przez krystalizację. Wyraźnie lepszym rozpuszczalnikiem okazał się octan etylu, którym ekstrahuje się dwukrotnie więcej ergosterolu niż heksanem.

Zawartość ergosterolu (i innych steroli) ekstrahowanych z użyciem mikrofal z poszczególnych części muchomora heksanem przytoczono w tabeli 2. Nieomal cała ilość ergosterolu występuje w kapeluszu muchomora, a pozostałe sterole stanowią zanieczyszczenia. Z trzonów muchomora ekstrahuje się znacznie mniej steroli i nie obserwuje się obecności ergosterolu w tym ekstrakcie. Skórka muchomora czerwonego, która jest najbogatszym źródłem związków toksycznych i halucynogennych⁷⁾, zawiera znacznie mniej ergosterolu, zaś kropki (będące pozostałością osłony muchomora) nie zawierają go prawie wcale. Co ciekawe, wspomagana mikrofalami ekstrakcja ergosterolu octanem etylu daje niższe wydajności tego związku niż taka sama ekstrakcja *n*-heksanem.

Zawartość tego związku w kapeluszach muchomora jest bardzo duża, wielokrotnie większa niż zawartość ergosterolu w pieczarkach (*Agaricus bisporus*). Największą ilość ergosterolu z 1 g pieczarki uzyskano po wspomaganej mikrofalami ekstrakcji octanem etylu i wynosiła ona (w sumie po dwóch cyklach) zaledwie 12 mg/g suchej masy grzyba.

Podsumowanie

Muchomor czerwony jest bogatym źródłem strukturalnie różnorodnych związków chemicznych o interesującej aktywności biologicznej. Nie wszystkie z nich zostały wyizolowane i zidentyfikowane. Wstępnym etapem wydzielania tych połączeń jest usunięcie frakcji związków hydrofobowych. Dokonuje się tego przez ekstrakcję pozbawionej wody tkanki grzyba niepolarnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Okazuje się, że otrzymane ekstrakty zawierają jako główny składnik ergosterol, czynnik

decydujący o leczniczych właściwościach wielu rodzajów grzybów. Muchomor można zatem uznać za tanie i użyteczne źródło tego cennego związku.

Badania sfinansowane ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” – BioMed (POIG.01.01.02-02-003/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Otrzymano: 26-03-2012

LITERATURA

1. L. Fan, H. Pan, A.T. Soccol, A. Pandey, C.R. Soccol, *Food Technol. Biotechnol.* 2006, **44**, 303.
2. Z. Parsi, T. Gorecki, *J. Chromatogr. A* 2006, **1130**, 145.
3. K. Yoshino, Y. Kondou, K. Ishiyama, T. Ikekawa, T. Matsuzawa, M. Sano, *J. Health Sci.* 2008, **54**, 76.
4. J.-H. Choi, E.-Y. Kwon, C.-M. Park, S.-M. Choi, D.-G. Lee, J.-H. Yoo, W.-S. Shin, D.A. Stevens, *Med. Mycol.* 2010, **48**, 704.
5. B.Z. Zaidman, M. Yassin, J. Mahajna, S.P. Wasser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, **67**, 453.
6. U. Lindequist, T.H.J. Niedermeyer, W.D. Jülich, *eCAM* 2005, **2**, 285.
7. D. Michelot, L.D. Melendez-Howell, *Mycol. Res.* 2003, **107**, 131.
8. S. Kohlmüntzer, J. Grzybek, *Wiadomości Botaniczne* 1972, **16**, 99.
9. H. Dahm, A. Ciesielska, [w:] *Advances in fungal biotechnology* (red. M. Rai), I.K. International Pub. House, 2009, pp. 408-433.
10. S.E. Hull, M.M. Woolfson, *Acta Crystallogr. B* 1976, **32**, 2370.

[\(PDF\) Muchomor czerwony \(*Amanita muscaria*\) jako obiecujące źródło ergosterolu \(Fly](#)

[agaric \(*Amanita muscaria*\) as promising source of ergosterol](#)