

УДК 582.284:547.[56+57+58]:543.422.3

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГРИБЕ *XEROCOMUS SUBTOMENTOSUS*

Лукашов Р.И., Мандрик Н.И., Савицкая Д.И.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты оптимизации методики определения суммы фенольных соединений в грибе *Xerocomus subtomentosus*. Рекомендуется однократное экстрагирование спиртом этиловым 30 %-ым при 100 °C на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 60 минут и при соотношении сырья и экстрагента 1 : 8. Далее экстракт без кусочков гриба переливается в отдельную колбу с притертым горлом для остывания до комнатной температуры с последующим прохождением через ватный тампон в мерную колбу и доведением объема раствора экстрагентом до первоначального объема. Затем готовится реакционная смесь из 0,3 мл извлечения, 0,3 мл реактива ФЧ, 4,5 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и 4,90 мл воды, время реакции 22 минуты, измерение оптической плотности при длине волн 740 нм относительно компенсационного раствора, состоящего из 0,3 мл реактива ФЧ, 4,8 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и 4,90 мл воды. Рекомендуется тщательное перемешивание реакционной смеси после добавления каждого реагента.

Ключевые слова: *Xerocomus subtomentosus*; фенольные соединения; методика; экстракция; оптимизация.

Введение. На территории Республики Беларусь произрастает большое количество грибов с различной пищевой ценностью. Одним из часто употребляемых в пищу грибов является моховик зелёный (*Xerocomus subtomentosus*). Помимо пищевой ценности исследованы некоторые виды его фармакологической активности: антиоксидантная, противомикробная, противогрибковая, антигидролазная [1; 2]. Для изучения перспектив использования гриба в медицине необходимо оптимизировать методику экстракции фенольных соединений (ФС), одной из основных групп биологически активных веществ в плодовых телах, а также методику определения суммы ФС.

Цель работы – оптимизировать методику спектрофотометрического определения суммы фенольных соединений в грибе *Xerocomus subtomentosus*.

Задачи исследования: Экспериментальным путем определить оптимальные условия экстракции фенольных соединений (экстрагент, температура, время экстракции, соотношение «сырье : экстрагент», метод разделения); определить оптимальные объемы извлечения и реактивов, времени реакции, длины волны в спектрофотометрическом определении.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались плодовые тела моховика зелёного, выращенные в естественных условиях в лесах на территории Республики Беларусь и хранящиеся при температуре –18 °C. При исследовании использовались следу-

ющие реактивы: реагент Фолина – Чиокалтеу (ООО «Аналит Комплект», Россия), натрий углекислый безводный (х.ч., ООО «АО РЕАХИМ», Россия), спирт этиловый технический (марки «Экстра-М», 96,41 %), вода очищенная; стандарт – галловая кислота (98 %, Acros Organics BVBA, Бельгия); оборудование: аквадистиллятор электрический АЭ-25, весы аналитические Explorer EX125D, баня водяная WB-12, плитка электрическая Goodhelper ES-10P10, спектрофотометр SOLAR PB 2201.

Методология исследования основана на статье [3]. Извлечение ФС из сырья грибного происхождения проводилось методом экстрагирования с обратным холодильником при различных условиях с последующим охлаждением до комнатной температуры, отделением осадка и доведением до необходимого объема извлечения. Затем проводилось определение суммы ФС в полученных извлечениях спектрофотометрическим методом [4]. Исследование проводили в трех повторностях. Расчет суммы ФС в пересчете на галловую кислоту осуществлялся с использованием построенного ранее градуировочного графика [1] и выведенных формул [3].

Все результаты были подвержены статистической обработке и представлены в виде среднего значения и полуширины доверительного интервала. Значимость отличий по извлечению ФС из сырья при разных условиях экстракции оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента, сравнивались два условия экстрак-

ции с наибольшими значениями содержания суммы ФС в пересчете на галловую кислоту. Статистическая обработка результатов химического эксперимента осуществлялась с использованием пакета «Анализ данных» компьютерной программы Microsoft office Excel 2019.

Результаты и их обсуждение. В качестве растворителей для получения извлечения из сырья выбраны вода, спирт этиловый в следующих концентрациях: 30 %, 40 %, 70 %, 96 %. Экстрагирование осуществлялось однократно при температуре 100 °C на кипящей водяной бане с обратным холодильником 60 минут при соотношении сырья и экстрагента 1 : 8. Результаты подбора оптимального экстрагента представлены на рис. 1. Проанализировав график и результаты статистической обработки, можно сделать вывод, что ФС из плодовых

тел моховика зелёного лучше всего извлекаются при экстрагировании спиртом этиловым 30 %-ым.

Извлечение ФС из плодовых тел исследовалось при комнатной температуре 20 °C, а также на водяной бане с обратным холодильником при 40 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C. Экстрагирование осуществлялось спиртом этиловым 30 %-ым в течение 60 минут при соотношении сырья и экстрагента 1 : 8. Результаты подбора оптимальной температуры экстракции представлены на рис. 2. На основании полученных данных и результатов статистической обработки можно сделать вывод, что при температуре 100 °C происходит интенсификация извлечения ФС из плодовых тел.

Извлечение ФС в течение 30, 45, 60, 75, 90, 120 и 150 минут осуществлялось спиртом

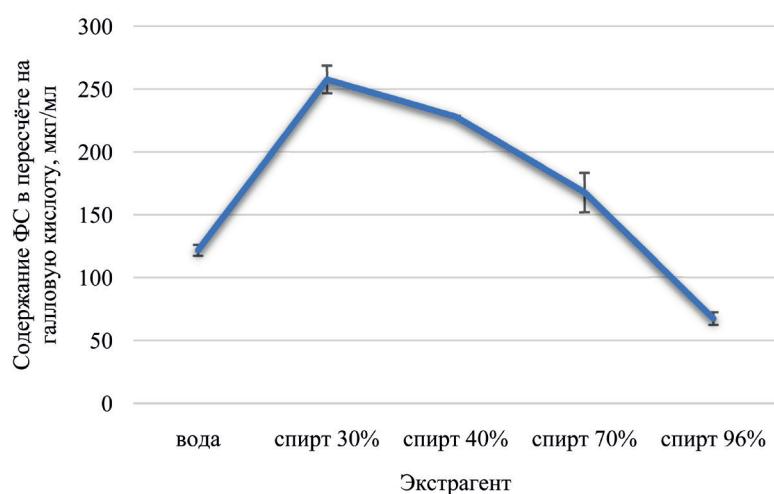


Рис. 1. Зависимость извлечения ФС от экстрагента

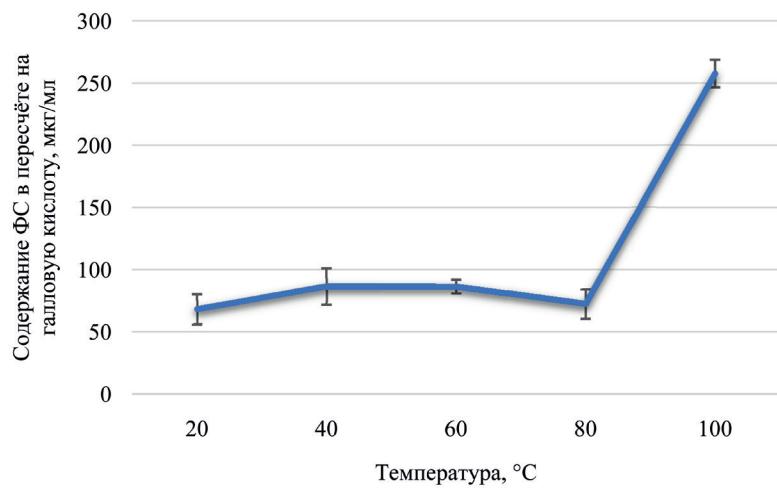


Рис. 2. Зависимость извлечения ФС от температуры экстракции

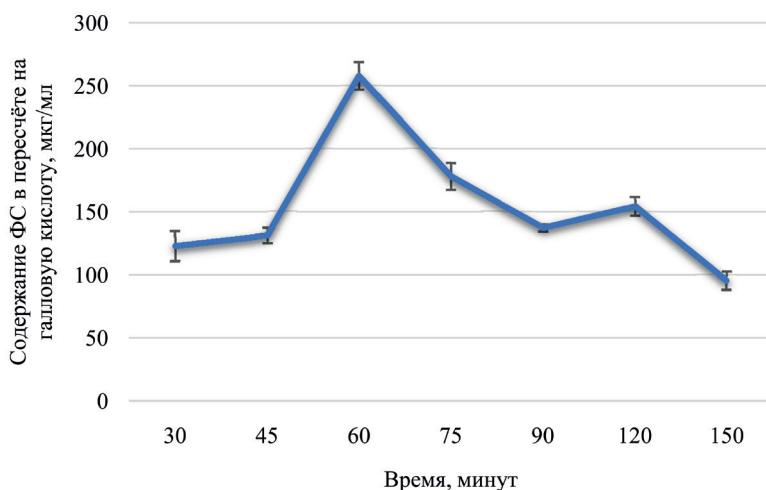


Рис. 3. Зависимость извлечения ФС от времени экстракции

этиловым 30 %-ым при температуре 100 °C и соотношении «сырьё : экстрагент» 1 : 8 однократно. Результаты подбора оптимальной продолжительности экстракции представлены на рис. 3. На основании полученных данных и результатов статистической обработки можно сделать вывод, что оптимальное время экстракции ФС 60 минут.

Далее исследовали, при каком соотношении сырья и экстрагента (1 : 5, 1 : 8, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20 (г/мл)) будет наблюдаться наибольшее извлечение ФС из плодовых тел. Экстрагирование осуществлялось спиртом этиловым 30 %-ым при температуре 100 °C в течение 60 минут однократно. Все значения пересчитаны на одинаковую массу сырья (1 г) для сопоставления результатов и представлены

на рис. 4. После статистической обработки сделан вывод, что оптимальное соотношение сырья и экстрагента 1 : 8.

Затем исследовали извлечение ФС из плодовых тел при однократной, двукратной и трехкратной экстракции. Экстрагирование осуществлялось спиртом этиловым 30 %-ым при температуре 100 °C в течение 60 минут при соотношении «сырьё : экстрагент» 1 : 8. При двукратной и трехкратной экстракции каждая порция извлечения сливалась в отдельную колбу для последующего охлаждения до комнатной температуры, а в колбу с остатками гриба после предыдущей экстракции добавляли точный объем экстрагента и снова помещали на водянную баню на 60 мин. Затем объединяли охлажденные извлечения (в однократной –

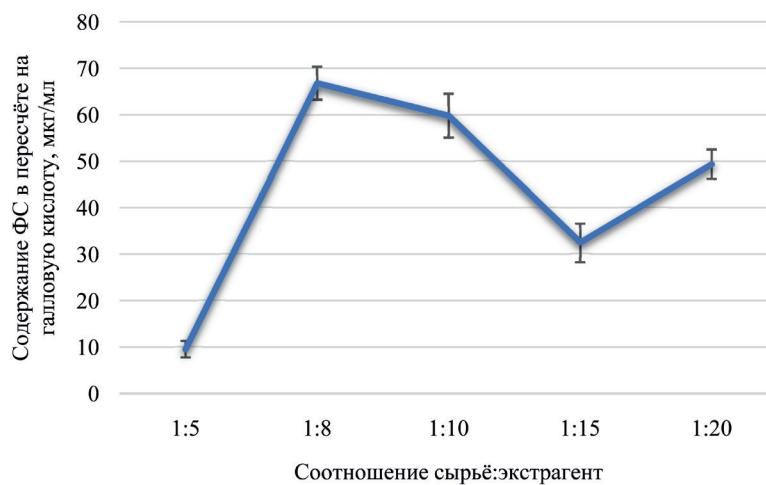


Рис. 4. Зависимость извлечения ФС от соотношения «сырьё : экстрагент»

одно, в двукратной – два, в трехкратной – три), процеживали в мерную колбу через ватный тампон и доводили объем до метки в подходящей мерной колбе; в расчетах для возможности сопоставления результатов был учтен разный объем полученного извлечения. Все значения пересчитаны на одинаковый объем (25 мл) для сопоставления результатов (рис. 5). На графике и по результатам статистической обработки видно, что при однократной и двукратной экстракции степень извлечения ФС статистически значимо не отличается. Для уменьшения затрат времени рекомендуется проводить однократную экстракцию.

После снятия извлечения с водяной бани при переливании в другую колбу в него могут попадать маленькие частички гриба, при охлаждении постепенно снижается растворимость балластных веществ, на которые могут адсорбироваться ФС, поэтому необходимо подобрать оптимальный способ их отделения. Поскольку при разделении есть вероятность адсорбции ФС на вспомогательных материалах или их осаждения, следует изучить, при каком методе разделения (отстаивание, процеживание через ватный тампон, двойное процеживание (извлечение процеживали через ватный тампон в отдельную емкость, затем снова процеживали через новый ватный тампон в мерную колбу, вымывая впитанное в вату извлечение спиртом этиловым 30 %-ым при доведении до метки), фильтрация с помощью фильтровальной бумаги «белая лента» и центрифугирование) потери ФС будут наименьшими. Извлечение ФС проводилось однократно спиртом этиловым 30 %-ым при температур-

ре 100 °C в течение 60 минут при соотношении сырья и экстрагента 1 : 8. По представленным на рис. 6 данным и результатам статистической обработки видно, что наибольшее количество ФС сохраняется при отделении осадка с помощью процеживания через ватный тампон. Фильтрация через фильтр «белая лента» и двойное процеживание способствуют осаждению большого количества ФС на вспомогательном материале, центрифугирование способствует осаждению ФС вместе с осадком.

Далее с полученным по оптимизированной методике извлечением осуществлялась оптимизация методики спектрофотометрического определения суммы ФС в пересчете на галловую кислоту.

Исследовалась реакционная смесь из 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 мл извлечения, 0,15 мл реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ), 4,76 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и воды до 10 мл. Через 30 минут измерялась оптическая плотность раствора при длине волн 760 нм. Для каждого извлечения был параллельно приготовлен компенсационный раствор с пересчитанным объемом 10 %-го раствора натрия карбоната для получения суммарного объема извлечения 10,0 мл. Все значения были пересчитаны на одинаковый объем извлечения для возможности сопоставления результатов. На основании данных на рис. 7 и результатов статистической обработки видно, что наибольшее значение суммы ФС в пересчете на галловую кислоту наблюдается при использовании 0,3 мл извлечения.

Далее исследовалась реакционная смесь из 0,3 мл извлечения, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30,

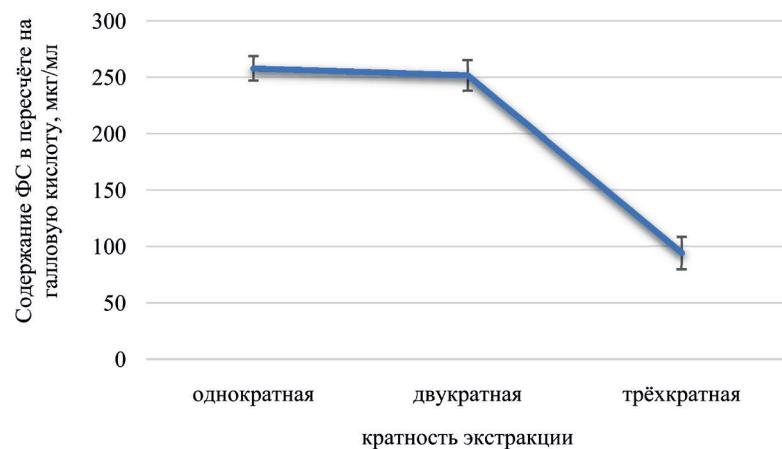


Рис. 5. Зависимость извлечения ФС от кратности экстракции

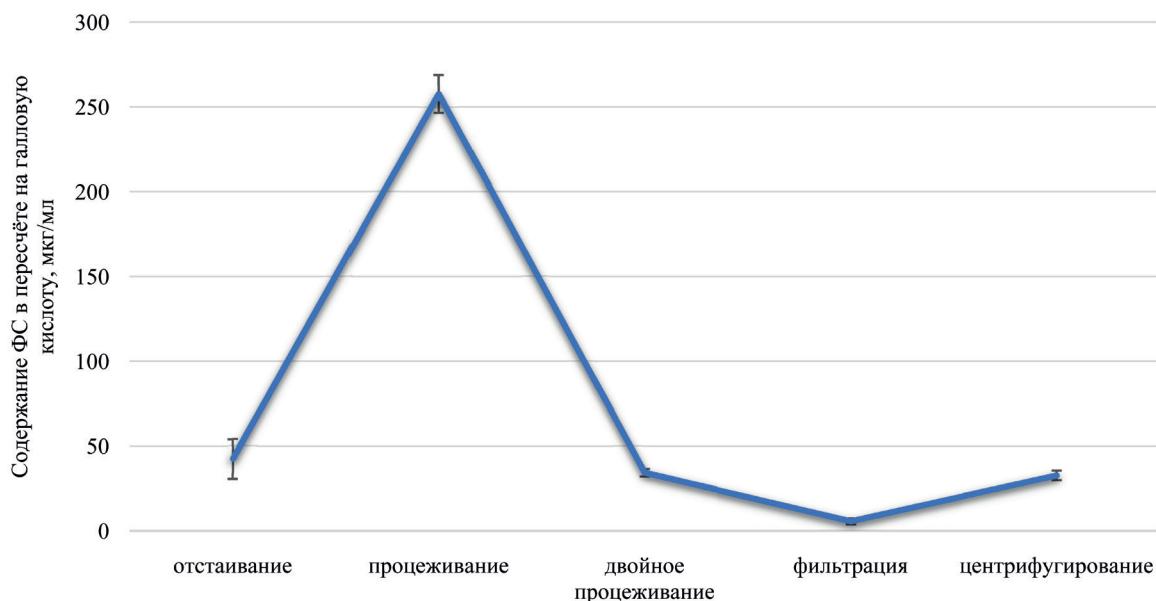


Рис. 6. Зависимость содержания ФС от метода разделения

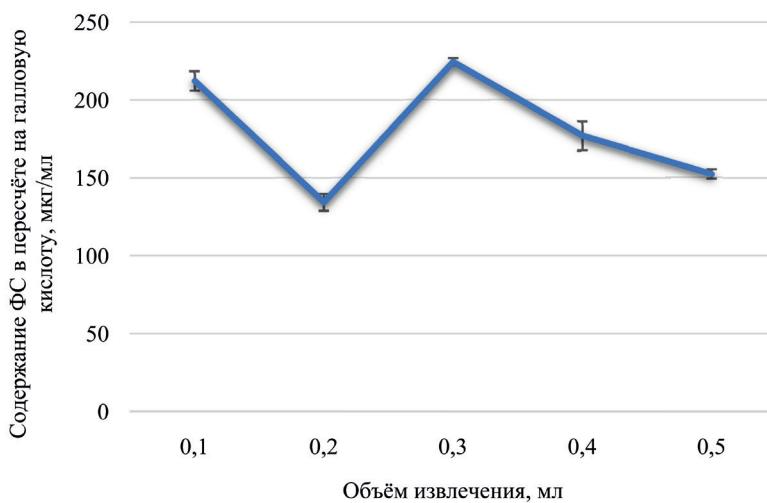


Рис. 7. Зависимость содержания ФС от объема извлечения

0,35, 0,40 мл реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ), 4,76 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и воды до 10 мл. Через 30 минут измерялась оптическая плотность раствора при длине волнны 760 нм. Для каждого извлечения был параллельно приготовлен компенсационный раствор с соответствующим количеством реагтива ФЧ. На рис. 8 и по результатам статистической обработки видно, что наибольшее содержание суммы ФС в пересчете на галловую кислоту определено при использовании 0,3 мл реактива ФЧ.

Далее исследовалась реакционная смесь из 0,3 мл извлечения, 0,30 мл реактива ФЧ, 4,00,

4,20, 4,25, 4,30, 4,45, 4,50, 4,76, 4,90, 5,00, 5,10, 5,20, 5,25, 5,30, 5,40, 5,50 и 5,60 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и воды до 10 мл. Через 30 минут измерялась оптическая плотность раствора при длине волнны 760 нм. Для каждого извлечения был параллельно приготовлен компенсационный раствор с соответствующим количеством 10 %-го раствора натрия карбоната. На рис. 9 и по результатам статистической обработки видно, что наибольшее содержание суммы ФС в пересчете на галловую кислоту определено при использовании 4,5 мл 10 %-го раствора натрия карбоната.

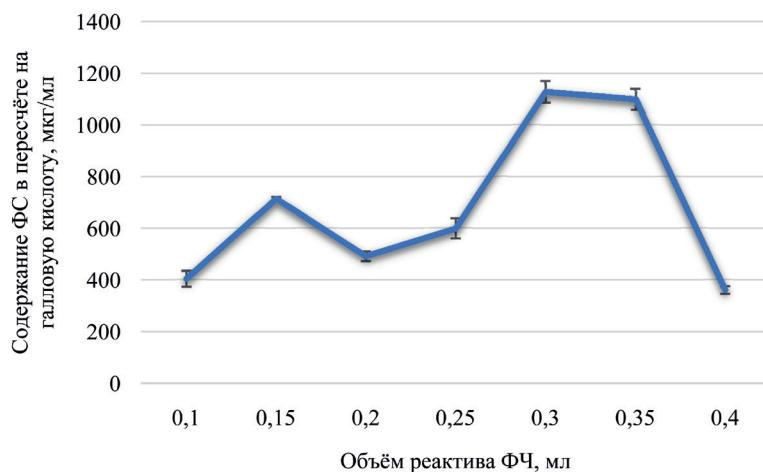


Рис. 8. Зависимость содержания ФС от объема реактива ФЧ

Для определения времени реакции регистрировали оптическую плотность полученного раствора (0,30 мл извлечения, 0,30 мл реактива ФЧ, 4,50 мл раствора натрия карбоната, 4,90 мл воды) при длине волн 760 нм каждые две минуты на протяжении 120 мин. На рис. 10 видно, что через 22 минуты реакции оптическая плотность раствора значимо не изменяется, что может свидетельствовать о том, что все ФС в растворе вступили в реакцию с реагентом ФЧ образованием гетерополикомплексов.

Далее регистрировали спектр поглощения раствора (0,30 мл извлечения, 0,30 мл реактива ФЧ, 4,50 мл раствора натрия карбоната, 4,90 мл

воды) через 22 минуты в диапазоне длин волн от 700 нм до 800 нм для определения оптимальной длины волны в измерении оптической плотности раствора. На рис. 11 видно, что в диапазоне длин волн 734–744 нм оптическая плотность раствора значимо не изменяется. В дальнейшем в работе измерение оптической плотности проводилось при 740 нм.

Для извлечений из плодовых тел моховника зелёного была проведена проверка влияния количества воды на оптическую плотность и содержание ФС в извлечении. Регистрировали оптическую плотность реакционной смеси (0,30 мл извлечения, 0,30 мл реактива ФЧ, 4,50 мл раствора натрия карбоната, без воды,

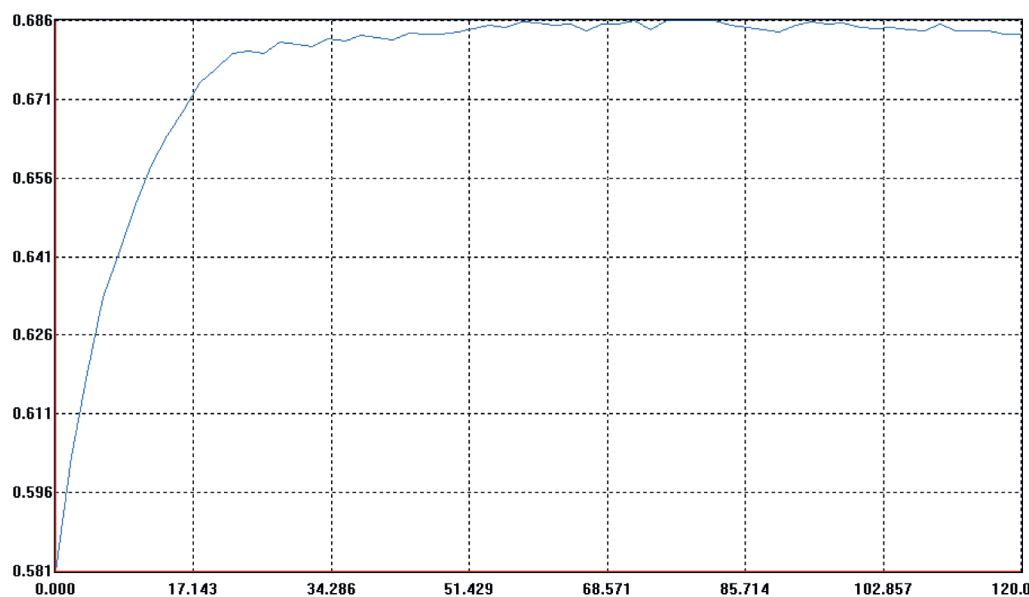


Рис. 9. Зависимость содержания ФС от объема 10 %-го раствора натрия карбоната

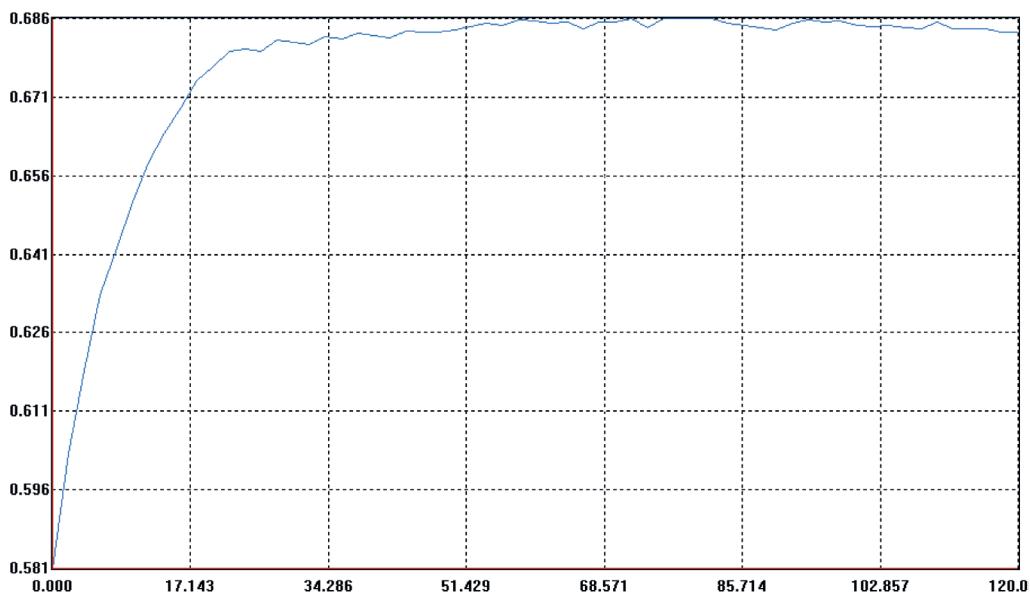


Рис. 10. Зависимость оптической плотности раствора от времени реакции

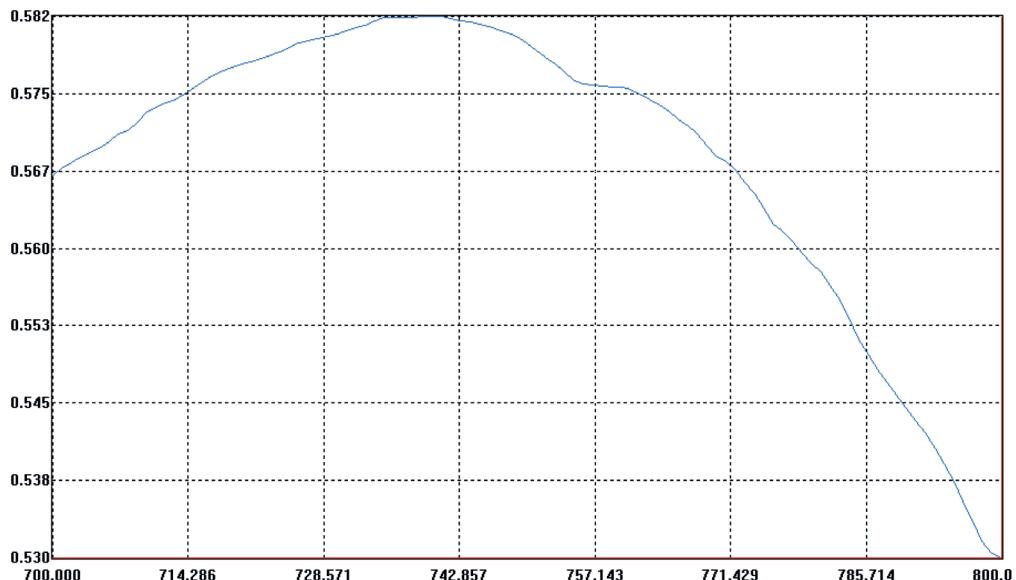


Рис. 11. Зависимость оптической плотности раствора от длины волны

с добавлением 1,00, 2,50, 3,00, 3,90, 4,90 мл воды) через 22 минуты при 740 нм относительно параллельно приготовленных компенсационных растворов с соответствующим объемом воды. Для возможности сопоставления результатов все значения оптических плотностей были приведены к одинаковому общему объему раствора (10,0 мл). На рис. 12 и по результатам статистической обработки видно, что наибольшая сумма ФС наблюдалась, если не добавлять воду к реакционной смеси. Однако полученные значения оптической плот-

ности слишком высоки для прибора, поэтому рекомендовано проводить определение ФС с разбавлением раствора до объема 10 мл, т.е. с добавлением 4,90 мл воды к реакционной смеси.

Заключение. Оптимальным методом извлечения ФС из плодовых тел моховика зелёного является однократное экстрагирование спиртом этиловым 30 %-ым при температуре 100 °C на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 60 минут и при соотношении сырья и экстрагента 1:8.

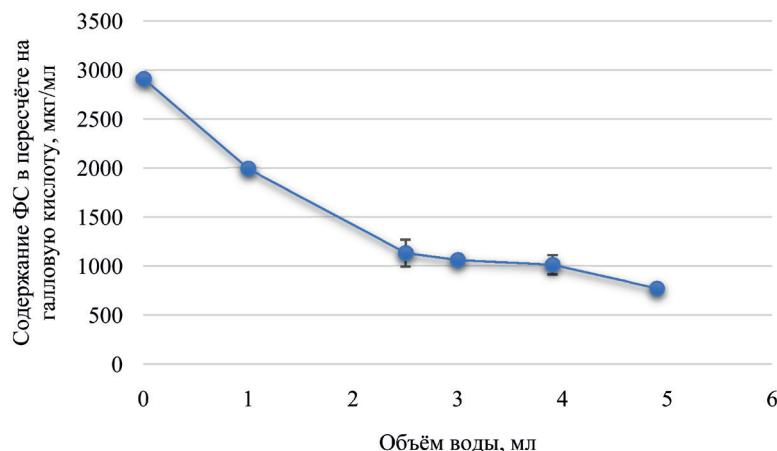


Рис. 12. Зависимость содержания ФС от объема воды в реакционной смеси

Далее экстракт без кусочков гриба переливается в отдельную колбу с притертым горлом для остывания до комнатной температуры с последующим процеживанием через ватный тампон в мерную колбу и доведением объема раствора экстрагентом до первоначального объема.

При спектрофотометрическом определении суммы ФС рекомендуется использовать реакционную смесь из 0,3 мл полученного извлече-

ния, 0,3 мл реагтива ФЧ, 4,5 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и 4,90 мл воды, время реакции 22 минуты, измерение оптической плотности при длине волны 740 нм относительно параллельно приготовленного компенсационного раствора, состоящего из 0,3 мл реагтива ФЧ, 4,8 мл 10 %-го раствора натрия карбоната и 4,90 мл воды. Рекомендуется тщательное перемешивание реакционной смеси после добавления каждого реагтива.

Список цитированных источников

1. Скрининг противомикробной и антиоксидантной активности шляпочных грибов, произрастающих в Ленинградской области / А.К. Уэйли, А.О. Уэйли, В.В. Новикова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 111–125. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1576>
2. Antioxidant, Antimicrobial and Cosmeceutical Potential of Wild Mushroom Extracts / T. Martins, L. Machado-Carvalho, A. Aires [et al.] // Applied Microbiology. – 2023. – Vol. 3, № 2. – P. 562–579. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3020040>
3. Методика определения суммы фенольных соединений в грибе *Climacodon septentrionalis* / Н.И. Мандрик, Д.И. Савицкая, Р.И. Лукашов, М.Н. Повыдыши // Гербарийум. – 2025. Т. 2. – № 2. – С. 30–40. <https://doi.org/10.33380/3034-3925-2025-2-2-29>
4. Tsialretskaya, V. A. Dynamics of the accumulation of phenolic compounds in *Taraxacum officinale* roots, leaves and flowers / V.A. Tsialretskaya, R. I. Lukashou // Revista Farmaceutică a Moldovei. – 2021. – Vol. 45, № 1. P. 58–61.

METHOD FOR DETERMINING THE TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS IN THE XEROCOMUS SUBTOMENTOSUS MUSHROOM

Lukashou R.I., Mandryk N.I., Savitskaya D.I.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The results of optimization of the method for determining the sum of phenolic compounds in the *Xerocomus subtomentosus* mushroom are presented. A single extraction with 30 % ethyl alcohol at 100 °C in a boiling water bath with a reflux condenser for 60 minutes and with a raw material and extractant ratio of 1:8 is recommended. Then the extract without mushroom pieces is poured into a separate flask with a ground neck to cool to room temperature, followed by filtering through a cotton swab into a measuring flask and bringing the volume of the solution with the extractant to the original volume. Then a reaction mixture is prepared from 0.3 ml of the extract, 0.3 ml of the FC reagent, 4.5 ml of a 10 % sodium carbonate solution and 4.90 ml of water, the reaction time is 22 minutes, the optical density is measured at a wavelength of 740 nm relative to the compensation solution consisting of 0.3 ml of the FC reagent, 4.8 ml of a 10 % sodium carbonate solution and 4.90 ml of water. Thorough mixing of the reaction mixture after adding each reagent is recommended.

Keywords: *Xerocomus subtomentosus*; phenolic compounds; methodology; extraction; optimization.