

Звіт № 1431-3/2020

про наукове дослідження зразка капсул^{1*}

9.09.2020 для проведення наукового дослідження від Замовника ТОВ "МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР МЕДЕУС" було одержано зразок біологічно-активної добавки у вигляді капсул. 28.09.2020 було одержано додаткову порцію зразка №1431/3, після чого було розпочато дослідження. Зразку було призначено внутрішній номер 1431/3. Фото отриманого зразка наведено у Додатку, Рис. 1.

Метою наукового дослідження були:

- проведення огляду індексованих англомовних наукових публікацій з метою виявлення описаного дослідниками складу олій, екстрагованих з грибів рейші чи зі спор грибів рейші, зокрема - жирнокислотного складу таких олій, а також - описаного переліку тритерпенів, характерних для таких олій, або характеристичних спектральних даних для подібних продуктів;
- проведення наукового дослідження з метою порівняння складу внутрішнього вмісту зразка № 1431/3 або зареєстрованих для нього характеристичних спектральних даних, та відповідних параметрів, виявлених за результатами п. 2.1;
- проведення наукового дослідження з метою оцінки достовірності заявленого виробником основного складника зразка № 1431/3.

Інформація про склад зразка №1431/3, заявлена виробником

Відповідно до інформації, наведеної на сайті виробника <https://www.uszhongke.com/collections/reishi-mushroom/products/p019-html>, капсула має містити 500 мг масла зі спор грибів «Рейші» (*Ganoderma lucidum*), з яких $\geq 40\%$ маси складають тритерпени (див. Додаток, рис. 2).

Замовником було надано наступну інформацію (переклад українською): «в якості сировини використовується 100% споровий порошок грибів «Рейші» (*Ganoderma lucidum*).

^{1*} Складні аналізи мають науково-дослідницький характер. Результати таких досліджень можуть підтверджувати або спростовувати факти, носити характер дослідження фахівця зі спеціальною освітою, слугувати доказами в суді, виконавці досліджень можуть виступати спеціалістами в судовому процесі. Результати стосуються лише зразків, що були доставлені у лабораторію.

Завдяки застосуванню технології надкритичної екстракції CO₂, екстраговане масло містить більше 32% ефективних тритерпенів Рейші» (див. Додаток, рис. 3).

ЕТАП 1. ОГЛЯД НАУКОВИХ ПУБЛІКАЦІЙ

Ganoderma lucidum - лікарський гриб роду *Ganoderma*, що використовується кілька тисяч років в азіатських країнах, таких як Китай (розповсюджена назва "Lingzhi"), Японія (розповсюджена назва "**Reishi**" або "Mannentake"), Тайвань (розповсюджена назва "Lingzhi") і Корея (розповсюджена назва "Yeongji"). Він використовується як народний засіб для профілактики та лікування різних захворювань людини, в тому числі раку, імунологічних розладів, для підвищення життєвої сили людини та сприяння довголіття (*Hsu, C.-L., & Yen, G.-C. (2014). Ganoderic Acid and Lucidenic Acid (Triterpenoid). Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids, 33–56. doi:10.1016/b978-0-12-802215-3.00003-3.*

Сучасні дослідження показали, що гриб «Reishi» містить різноманітні біоактивні інгредієнти: тритерпени, полісахариди, стероли, жирні кислоти, нуклеозиди та алкалоїди (*Paterson, R. R. M. (2006). Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 67(18), 1985–2001. doi:10.1016/j.phytochem.2006.07.004.*

Ергостерол - стерол клітинної мембрани грибів, котрий здатний активувати експресію ряду захисних генів та підвищувати стійкість грибів до збудників хвороб (*Yuan, J.-P., Wang, J.-H., Liu, X., Kuang, H.-C., & Huang, X.-N. (2006). Determination of Ergosterol in Ganoderma Spore Lipid from the Germinating Spores of Ganoderma lucidum by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(17), 6172–6176. doi:10.1021/jf0617059*). У даній публікації науковці дослідили рідину зі спор грибів виду *Ganoderma lucidum* методом рідинної хроматографії і, завдяки підібраним елюенту та програмі елюювання, їм вдалось розділити та ідентифікувати такі біоактивні складові екстракту як ергостерол, α -токоферол та α -токоферол ацетат.

В науковій публікації *Lv, G., Zhao, J., Duan, J., Tang, Y., & Li, S. (2012). Comparison of sterols and fatty acids in two species of Ganoderma. Chemistry Central Journal, 6(1). doi:10.1186/1752-153x-6-10* дослідники визначали вміст ергостеролу та 10 жирних кислот в 19 екстрактах грибів виду *Ganoderma lucidum* методом газової хроматографії з мас-спектрометричною детекцією (ГХ-МС). За результатами досліджень було встановлено, що мажорними

жирними кислотами є пальмітинова (16:0), лінолева (18:2), олеїнова (18:1) та стеаринова (18:0) кислоти. Вимірний вміст ергостеролу варіювався в межах 0.2-1.4 мг/г.

В науковій публікації Ge, F.-H., Duan, M.-H., Li, J., & Shi, Q.-L. (2017). *Ganoderin A, a novel 9,11-secoesterol from Ganoderma lucidum spores oil*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19(12), 1252–1257. doi:10.1080/10286020.2017.1313834 дослідники встановили присутність ергостеролу, стелластеролу та ганодерину А в олії зі спор грибів *Ganoderma lucidum*.

В науковій публікації Seo, H. W., Hung, T. M., Na, M., Jung, H. J., Kim, J. C., Choi, J. S., Min, B. S. (2009). *Steroids and triterpenes from the fruit bodies of Ganoderma lucidum and their anti-complement activity*. *Archives of Pharmacal Research*, 32(11), 1573–1579. doi:10.1007/s12272-009-2109-x дослідники встановили присутність ергостеролу, ергостерол пероксиду та стелластеролу в метанольних екстрактах грибів *Ganoderma lucidum*.

Відповідно до інформації, наведеної у вищеперерахованих публікаціях, гриби виду *Ganoderma lucidum* можуть містити такі стероли та сполуки: ергостерол, ергостерол пероксид, стелластерол, α -токоферол, α -токоферол ацетат, ганодерин А. Для перевірки їх присутності можна використовувати методи газової та/або рідинної хроматографії. Відповідно, присутність набору таких речовин на хроматограмі зразка №1431/3 може з високою ймовірністю свідчити про те, що досліджуваний зразок містить масло гриба.

В наукових публікаціях:

- Zhou, D., Zhou, F., Ma, J., & Ge, F. (2019). *Microcapsulation of Ganoderma Lucidum spores oil: Evaluation of its fatty acids composition and enhancement of oxidative stability*. *Industrial Crops and Products*, 131, 1–7. doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.031;
- Deng, Z.-L., Yuan, J.-P., Zhang, Y., Xu, X.-M., Wu, C.-F., Peng, J., & Wang, J.-H. (2013). *Fatty Acid Composition in Ergosteryl Esters and Triglycerides from the Fungus Ganoderma lucidum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(10), 1495–1502. doi:10.1007/s11746-013-2296-y ;
- Salvatore, M. M., Elvetico, A., Gallo, M., Salvatore, F., DellaGreca, M., Naviglio, D., & Andolfi, A. (2020). *Fatty Acids from Ganoderma lucidum Spores: Extraction, Identification and Quantification*. *Applied Sciences*, 10(11), 3907. doi:10.3390/app10113907 ;

дослідники встановили жирнокислотний склад олії зі спор грибів виду *Ganoderma lucidum* методом газової хроматографії з мас-спектрометричною детекцією (ГХ-МС) після процедури переестерифікації. За результатами досліджень мажорними жирними кислотами є пальмітинова (16:0), лінолева (18:2), олеїнова (18:1), гексадецена (16:1) та стеаринова (18:0) кислоти.

Згідно з інформацією, наведеною у вищеперерахованих публікаціях, олія гриба виду *Ganoderma lucidum* має характерний набір жирних кислот, котрі можуть бути ідентифіковані методом ГХ-МС після виконання процедури переестерифікації. Отже, шляхом порівняння жирнокислотного складу зразка №1431/3 та жирнокислотного складу олії з гриба, описаного в наукових публікаціях, можна буде зробити висновок про джерело походження досліджуваного зразка.

За останні два десятиліття понад 130 тритерпеноїдів (включаючи похідні ганодерової кислоти) були виділені з плодових тіл, міцелію та спор грибів виду *Ganoderma lucidum* (R.Y. Chen, D.Q. Yu, *Acta Pharm. Sin.* 25 (1990) 940–953; J. Luo, Z.B. Lin, *Acta Pharm. Sin.* 37 (2002) 574–578).

В науковій публікації Wang, X.-M., Yang, M., Guan, S.-H., Liu, R.-X., Xia, J.-M., Bi, K.-S., & Guo, D.-A. (2006). *Quantitative determination of six major triterpenoids in Ganoderma lucidum and related species by high performance liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 838–844. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.053 дослідники за допомогою методу рідинної хроматографії визначали вміст шести мажорних тритерпеноїдів, котрі називаються ганодерними кислотами C2, B, AM₁, K, H, D в екстрактах гриба виду *Ganoderma lucidum*. Було встановлено, що сумарний вміст цих сполук варіюється в межах 2-11 мг/г (0.2 – 1.1%).

В наукових публікаціях Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from Ganoderma lucidum: optimization study using the response surface methodology*. *Food & Function*, 9(1), 209–226. doi:10.1039/c7fo01601h та Yang, M., Wang, X., Guan, S., Xia, J., Sun, J., Guo, H., & Guo, D. (2007). *Analysis of triterpenoids in Ganoderma lucidum using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(5), 927–939. doi:10.1016/j.jasms.2007.01.012 дослідникам вдалось розділити та охарактеризувати тритерпени, екстраговані з грибів виду *Ganoderma lucidum* за допомогою методу рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометричною детекцією (PX-МС-МС). В цих статтях наведені m/z аддуктів тритерпенів та їх дочірніх іонів.

Отже, застосовуючи метод PX-МС-МС, можна перевірити присутність мікрокількостей вибраних тритерпенів.

В наукових публікаціях Yanjie Huang, Xian Li, Xingrong Peng and others. *NMR-based Structural Classification, Identification, and Quantification of Triterpenoids from Edible Mushroom Ganoderma resinaceum*. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 2816–2825. Doi:10.1021/acs.jafc.9b07791 та Wubshet, S. G., Johansen, K. T., Nyberg, N. T., & Jaroszewski, J. W. (2012). *Direct ¹³C NMR Detection in*

HPLC Hyphenation Mode: Analysis of Ganoderma lucidum Terpenoids. Journal of Natural Products, 75(5), 876–882. doi:10.1021/np200915c науковці зареєстрували ^1H - та ^{13}C -ЯМР спектри тритерпенів, екстрагованих з грибів виду *Ganoderma lucidum*.

Отже за допомогою методу ЯМР-спектроскопії можна перевірити зразок №1431/3 на присутність в ньому помітних кількостей тритерпенів та оцінити їх вміст.

В результаті опрацювання наукових публікацій, присвячених компонентному складу масла зі спор грибів виду *Ganoderma lucidum*, було зроблено висновок про доцільність використання наступних методів для дослідження зразка №1431/3:

- ІЧ-спектроскопія;
- ЯМР-спектроскопія;
- ГХ-МС;
- РХ-МС.

ЕТАП 2. ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРАЗКА №1431/3

Дослідження зразка №1431/3 методом інфрачервоної спектроскопії

З метою характеристики хімічної природи інкапсуляту та оболонки, капсулу спочатку було розрізано скальпелем, інкапсулят вичавлено, а оболонку промито від залишків інкапсуляту декілька разів гексаном та висушено.

Інкапсулят та оболонку було досліджено методом інфрачервоної спектроскопії (ІЧ). Зареєстрований ІЧ-спектр інкапсуляту було порівняно з бібліотечними ІЧ-спектрами та встановлено його збіжність за формою та положенням смуг поглинання зі спектрами олій природного походження (див. Додаток, рис.4).

Зареєстрований ІЧ-спектр оболонки було порівняно з бібліотечними ІЧ-спектрами та встановлено його збіжність за формою та положенням смуг поглинання зі спектром желатину (див. Додаток, рис.5).

Встановлення маси інкапсуляту в зразку №1431/3

Масу інкапсуляту було обраховано як різницю маси капсули та маси оболонки. Спочатку було зважено капсулу, її маса склала 0.6850 г. Після цього оболонку було

розрізано, два рази промито від масла гексаном та висушено (див. Додаток, Рис. 6). Маса оболонки склала 0.1842 г. Відповідно, вміст інкапсуляту склав $0.6850 - 0.1842 = 0.5008$ г (500.8 мг), що відповідає інформації, наведеній на упаковці.

Дослідження інкапсуляту зразка №1431/3 методом ЯМР-спектроскопії

Для характеристики хімічного складу інкапсуляту зразка № 1431/3 за хімічним оточенням протонів (тобто присутністю протонів в різних специфічних структурних фрагментах молекули) та карбону, його було досліджено методом спектроскопії ядерного магнітного резонансу на ядрах атомів водню (^1H -ЯМР спектроскопія) та атомів карбону (^{13}C -ЯМР спектроскопія).

На ^1H -ЯМР спектрі інкапсуляту зразка №1431/3 (див. Додаток, рис.7) присутні сигнали протонів метильних груп $-\text{CH}_3$ (0.87 м.ч.), метиленових груп $-\text{CH}_2-$ (1.3, 1.62 м.ч.), ненасичених замісників (2.03, 2.77, 5.37 м.ч.), гліцеринового фрагменту (5.26, 4.22 м.ч.), поблизу естерних груп (2.32 м.ч.), котрі характеризують даний спектр як спектр тригліцеридів жирних кислот, які типово входять у склад олій.

За профілем та співвідношенням інтенсивностей сигналів, зареєстрований ^1H -ЯМР спектр найбільше схожий на ЯМР спектри масла гриба виду *Ganoderma lucidum* (Salvatore, M. M., Elvetico, A., Gallo, M., Salvatore, F., DellaGreca, M., Naviglio, D., & Andolfi, A. (2020). **Fatty Acids from *Ganoderma lucidum* Spores: Extraction, Identification and Quantification**. *Applied Sciences*, 10(11), 3907. doi:10.3390/app10113907), а також на ЯМР-спектр оливкової олії Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Marinescu, A., Stefanescu, I., & Ionete, R. E. (2015). **Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics**. *Food Control*, 48, 84–90. doi:10.1016/j.foodcont.2014.04.046. Зареєстрований ^1H -ЯМР спектр та ^1H -ЯМР спектр екстракту спор гриба виду *Ganoderma lucidum* наведено в Додатку, Рис. 7.

Відповідно до інформації, наведеної на упаковці, $\geq 40\%$ маси інкапсуляту складають тритерпени. Зареєстрований ^1H -ЯМР спектр зразка №1431/3 було порівняно з ^1H -ЯМР спектром тритерпенів, екстрагованих з грибів виду *Ganoderma lucidum* (Yanjie Huang, Xian Li, Xingrong Peng and others. **NMR-based Structural Classification, Identification, and Quantification of Triterpenoids from Edible Mushroom *Ganoderma resinaceum***. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 2816–2825. Doi:10.1021/acs.jafc.9b07791) та встановлено відсутність сигналів помітної інтенсивності, описаних для тритерпенів (див. Додаток, Рис. 8).

На ^{13}C -ЯМР спектрі інкапсуляту зразка №1431/3 (див. Додаток, рис.9) присутній набір сигналів карбонів, характерних для рослинних олій (*Liezel Retief. Analysis of vegetable oils, seeds and beans by TGA and NMR spectroscopy. University of Stellenbosch, Department of Chemistry and Polymer Science*). Зареєстрований ^{13}C -ЯМР спектр зразка №1431/3 було порівняно з ^{13}C -ЯМР спектром тритерпенів, екстрагованих з грибів виду *Ganoderma lucidum*, а саме Lucidenic acid N, Ganoderic acid H, Lucidenic acid E (*Wubshet, S. G., Johansen, K. T., Nyberg, N. T., & Jaroszewski, J. W. (2012). Direct ^{13}C NMR Detection in HPLC Hyphenation Mode: Analysis of Ganoderma lucidum Terpenoids. Journal of Natural Products, 75(5), 876–882. doi:10.1021/np200915c*) та підтверджено відсутність сигналів, описаних для даних тритерпенів (див. Додаток, Рис. 10).

В результаті дослідження зразка №1431/3 методом ЯМР-спектроскопії було виявлено, що спектр інкапсуляту схожий зі спектром оливкової олії, масла з гриба виду *Ganoderma lucidum* або їх суміші. Згідно з результатами дослідження методом ЯМР-спектроскопії, інкапсулят зразка №1431/3 або не містить тритерпенів, описаних дослідниками як характерних для грибів виду *Ganoderma lucidum*, або містить їх у слідових кількостях.

Одержані результати спростовують твердження виробника про присутність у зразку №1431/3 « $\geq 40\%$ тритерпенів грибів виду *Ganoderma lucidum*».

Дослідження інкапсуляту зразка №1431/3 методом газової хроматографії

З метою ідентифікації летких компонентів, метанольний екстракт інкапсуляту зразка №1431/3 було досліджено методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Хроматограму наведено в Додатку, рис. 11. Результати ідентифікації сполук за мас-спектрами піків наведено в Таблиці 1 (див. нижче).

Таблиця 1

Результати ідентифікації сполук на хроматограмі метанольного екстракту інкапсуляту зразка №1431/3

| Час виходу, хв | Речовина | CAS№ |
|-----------------------|--------------------------|-------------|
| 32.21 | н-гексадеканова кислота | 57-10-3 |
| 35.24 | Лінолева кислота | 60-33-3 |
| 35.43 | Олеїнова кислота | 112-80-1 |
| 36.04 | Етиловий естер олеїнової | 111-62-6 |

| | кислоти | |
|-------|---------------------|------------|
| 43.94 | Гліцерил моноолеат | 111-03-5 |
| 47.66 | δ-токоферол | 119-13-1 |
| 48.87 | β- токоферол | 148-03-8 |
| 49.06 | γ- токоферол | 7616-22-0 |
| 50.09 | α- токоферол | 59-02-9 |
| 50.85 | ергостерол | 57-87-4 |
| 51.03 | стеластерол | 2465-11--4 |
| 51.2 | кампестерол | 474-62-4 |
| 51.58 | β-стігмастерол | 83-48-7 |
| 51.81 | фунгістерол | 516-78-9 |
| 52.34 | β-ситостерол | 83-46-5 |
| 52.5 | ланостерол | 79-63-0 |
| 53.22 | еберікол | 6890-88-6 |

В результаті дослідження екстракту зразка №1431/3 методом ГХ-МС було встановлено присутність в ньому жирних кислот, ізомерів вітаміну Е та набору стеролів, серед якого присутні стероли (ергостерол, стеластерол), описані для грибів, зокрема для грибів виду *Ganoderma lucidum* (див. Етап 1).

Встановлення жирнокислотного профілю інкапсуляту зразка №1431/3 було проведено за модифікованою методикою *ГОСТ 30418-96 «Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава»*. Суть методу полягала у переестерифікації олії метиловим спиртом з метилатом натрію (каталізатор) та одержанні розчину, що містив метилові естери всіх жирних кислот, які є в зразку. Розчин потім мав досліджуватися хроматографічно.

5 мл гексанового розчину інкапсуляту зразка №1431/3 було оброблено 2 мл 2М розчину метилату натрію в метанолі протягом 10 хв із інтенсивним струшуванням, після чого рідину було відцентрифуговано. Гексановий шар, що містив метилові естери жирних кислот, було досліджено методом газової хроматографії із мас-спектрометричним детектуванням. Хроматограму наведено в Додатку, рис. 12. Результати ідентифікації сполук за мас-спектрами піків наведено в Таблиці 2 (див. наступну сторінку).

Таблиця 2

Результати ідентифікації сполук на хроматограмі гексанового розчину зразка №1431/3 після переестерифікації

| Час виходу, хв | Відносна площа піку*, % | Сполука | CAS№ | Характер жирної кислоти |
|----------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 22.96 | 0.03 | Метил лаурат | | C12:0 |
| 27.51 | 0.2 | Метил міридат | 124-10-7 | C14:0 |
| 29.62 | 0.39 | Метил пентадеканоат | 7132-64-1 | C15:0 |
| 31.14 | 0.22 | Метил пальмітолеат | 1120-25-8 | C16:1-9c |
| 31.34 | 2.61 | Метил пальмітолеат (ізомер) | 56875-67-3 | C16:1-7c |
| 31.7 | 20.31 | Метил пальмітат | 112-39-0 | C16:0 |
| 32.94 | 0.01 | Метил 9,12-гептадекадієноат | | C17:2-9,12c |
| 33.04 | 0.07 | Метил цис-10-гептадеценоат | | C17:1-10c |
| 33.56 | 0.12 | Метил маргарат | 1731-92-6 | C17:0 |
| 34.74 | 16.98 | Метил лінолеат | 112-63-0 | C18:2-9,12c |
| 34.98 | 51.2 | Метил олеат | 112-62-9 | C18:1-9c |
| 35.44 | 6.22 | Метил стеарат | 112-61-8 | C18:0 |
| 36.61 | 0.01 | Метил цис-10-нонадеценоат | | C19:1-10c |
| 37.17 | 0.01 | Метил нонадеканоат | 1731-94-8 | C19:0 |
| 38.21 | 0.02 | Метил цис-11,14-ейкозадієнат | | C20:2-11,14c |
| 38.35 | 0.34 | Метил цис-11-ейкозаноат | | C20:1-11c |
| 38.86 | 0.37 | Метил арахідат | 1120-28-1 | C20:0 |
| 40.49 | 0.02 | Метил хенеїкозаноат | 6064-90-0 | C21:0 |
| 41.58 | 0.03 | метил 11-докозеноат | | C22:1-11c |
| 42.06 | 0.42 | Метил бехенат | 929-77-1 | C22:0 |
| 43.56 | 0.03 | Метил трикозаноат, | 2433-97-8 | C23:0 |
| 44.6 | 0.03 | Метил цис-15-тетракозеноат | 2733-88-2 | C24:1-15c |
| 45.02 | 0.4 | Метил лігноцерат | 2442-49-1 | C24:0 |

* Відносна площа піку, відбудованого за повним іонним струмом іонів із m/z 30-400, є пропорційною вмісту речовини в зразку, але для різних речовин коефіцієнти пропорційності дещо відрізняються. Це означає, що частки естерів різних жирних кислот відрізняються від наведених часток загальної площі. Спостережувані відносні площі піків корелюють з жирнокислотним профілем, але не збігаються з ним повністю.

Вищенаведене орієнтовне співвідношення сигналів мажорних метилових естерів жирних кислот було порівняно з літературними даними, які описують співвідношення вмісту жирних кислот в олії зі спор гриба виду *Ganoderma lucidum*, та виявлено, що спостережуваний на хроматограмі розподіл інтенсивностей сигналів добре корелює з жирнокислотним профілем як масла гриба так і оливкової олії.

Для перевірки присутності оливкової олії в зразку №1431/3 було зроблено порівняння мінорних жирних кислот оливкової олії з жирними кислотами, ідентифікованими на хроматограмі розчину зразка №1431/3. Відповідно до інформації, наведеної в наукових публікаціях:

- *Brodnjak-Vončina, D., Kodba, Z. C., & Novič, M. (2005). Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 75(1), 31–43. doi:10.1016/j.chemolab.2004.04.011;*
- *Boudour-Benrachou N, Plard J, Pinatel C, Artaud J, Dupuy N. Fatty acid compositions of olive oils from six cultivars from East and SouthWestern Algeria. Adv Food Technol Nutr Sci Open J. 2017; 3(1): 1-5. doi:10.17140/AFTNSOJ-3-138;*
- *Yang, Y., Ferro, M. D., Cavaco, I., & Liang, Y. (2013). Detection and Identification of Extra Virgin Olive Oil Adulteration by GC-MS Combined with Chemometrics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(15), 3693–3702. doi:10.1021/jf4000538;*

оливкова олія містить 0.5-1 % ліноленової (C18:3-3с) кислоти. Зареєстрована хроматограма розчину зразка №1431/3 не містить сигналу, котрий за мас-спектром відповідає метиловому естеру ліноленової кислоти, що вказує на її відсутність в зразку, що, в свою чергу свідчить про відсутність оливкової олії в зразку №1431/3 (див. Додаток, Рис. 13).

Даний результат можна підтвердити в рамках дослідження зразка №1431/3 методом ¹H-ЯМР спектроскопії: на зареєстрованому ¹H-ЯМР спектрі зразка №1431/3 (див. Рис. 7) відсутній сигнал у положенні 1.02 м.ч., котрий відповідає протонам метильної групи ліноленової кислоти.

Таким чином в результаті дослідження зразка №1431/3 методом ГХ-МС було встановлено, що жирнокислотний профіль зразка №1431/3 близький до жирнокислотного профілю, описаного для масла гриба виду *Ganoderma lucidum*. Також було виявлено сліди описаних для масла гриба стеролів – ергостеролу та стелластеролу.

Отже, інкасулят зразка №1431/3 найбільш ймовірно є маслом, екстрагованим саме з грибів.

Дослідження інкапсуляту зразка №1431/3 методом рідинної хроматографії

Відповідно до інформації, наведеної в наукових публікаціях:

Ruan, W., Lim, A. H. H., Huang, L. G., & Popovich, D. G. (2014). *Extraction optimisation and isolation of triterpenoids from Ganoderma lucidum and their effect on human carcinoma cell growth*. *Natural Product Research*, 28(24), 2264–2272. doi:10.1080/14786419.2014.938337;

Lee-Jui-an Lin and Ming-Shi Shiao. *Separation of oxygenated triterpenoids from Ganoderma lucidum by HPLC*. *Journal of Chromatography*, 410 (1987) 195-200

в якості екстрагенту для вилучення тритерпенів з грибів виду *Ganoderma lucidum* використовують 95% етиловий або метиловий спирти. Тому, для перевірки присутності тритерпенів у екстракті зразка №1431/3 та за умови виявлення – їх ідентифікації, зразок спочатку було оброблено метиловим спиртом під дією ультразвуку та із систематичним збовтуванням для кращого вилучення цільових речовин. Одержаний метанольний екстракт було досліджено методом РХ-МС. На зареєстрованій хроматограмі, відбудованій за сигналами негативно заряджених йонів, не було виявлено піків, що свідчить про відсутність тритерпенів у зразку №1431/3, або їх присутність на рівні десятків відсотка, що корелює з даними, одержаними методом ЯМР-спектроскопії. Хроматограму наведено в Додатку, Рис.14.

Метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометричною детекцією (РХ-МС-МС) дозволяє встановити присутність слідових кількостей основних тритерпенів, котрі описані для масла грибів *Reishi*, за значеннями m/z аддукту та дочірніх йонів, котрі утворюються внаслідок дії електричного поля на молекулярний йон.

З метою перевірки присутності слідів основних тритерпенів у зразку №1431/3, метанольний екстракт зразка було досліджено методом РХ-МС-МС. Інформацію про умови хроматографування, налаштування мас-детектора та значення m/z характеристичних переходів аддукт→дочірній йон для ганодерних кислот А, В, С2, Н, Е та люциденової кислоти N було взято з наукових публікацій Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from Ganoderma lucidum: optimization study using the response surface methodology*. *Food & Function*, 9(1), 209–226. doi:10.1039/c7fo01601h та Yang, M., Wang, X., Guan, S., Xia, J., Sun, J., Guo, H., & Guo, D. (2007). *Analysis of triterpenoids in Ganoderma lucidum using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(5), 927–939. doi:10.1016/j.jasms.2007.01.012 .

В результаті дослідження метанольного екстракту зразка №1431/3 методом (РХ-МС-МС) було показано, що даний зразок не містить тритерпенів, котрі описані як характерні для масла грибів виду *Ganoderma lucidum*.

ЕТАП 3. ОЦІНКА ДОСТОВІРНОСТІ ТВЕРДЖЕНЬ ВИРОБНИКА ЩОДО СКЛАДУ ЗРАЗКА № 1431/3

1. Перше твердження виробника – «капсула містить масло, екстраговане зі спор гриба виду *Ganoderma lucidum* методом суперкритичної екстракції CO_2 ».

Було знайдено та опрацьовано наукову публікацію Hsu, R. C., Lin, B. H., & Chen, C. W. (2001). *The Study of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for Ganoderma Lucidum*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(20), 4478–4481. doi:10.1021/ie000203w, в якій дослідники випробовують ефективність екстракції речовин з плодових тіл гриба виду *Ganoderma lucidum* різними шляхами: суперкритична екстракція CO_2 , екстракція розчинниками та екстракція CO_2 в поєднанні з розчинниками при різних температурах та тиску.

Дослідники порівняли склад екстрактів, одержаних з використанням в якості екстрагентів CO_2 та CO_2 в поєднанні з етанолом і з'ясували, що при екстракції з використанням допоміжного екстрагенту етанолу – екстракт містить більшу кількість тритерпенів, натомість екстракт, одержаний з використанням самого лише CO_2 містить слідові кількості тритерпенів. Такий ефект обумовлений тим, що тритерпени грибів виду *Ganoderma lucidum* містять в молекулі кислотний фрагмент і тому мають спорідненість до полярних розчинників, таких як етанол, метанол тощо.

В науковій публікації Deng, Z.-L., Yuan, J.-P., Zhang, Y., Xu, X.-M., Wu, C.-F., Peng, J., & Wang, J.-H. (2013). *Fatty Acid Composition in Ergosteryl Esters and Triglycerides from the Fungus Ganoderma lucidum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(10), 1495–1502. doi:10.1007/s11746-013-2296-y дослідники встановили жирнокислотний профіль тригліцеридів, екстрагованих з плодових тіл гриба виду *Ganoderma lucidum*.

В результаті проведення дослідницьких робіт зі зразком №1431/3 було з'ясовано, що інкапсулят зразка №1431/3 складається з масла, котре за жирнокислотним профілем подібне до описаного для гриба виду *Ganoderma lucidum* (публікацію див. вище). Також в зразку №1431/3 було виявлено присутність стеролів, характеристичних для грибних масел – ергостеролу та стелластеролу.

Отже, вміст капсул зразка №1431/3 дійсно міг бути одержаний методом екстракції суперкритичним CO₂ з гриба *Ganoderma lucidum*. При цьому, не можна встановити чи екстракт одержували саме зі спор, чи з усього плодового тіла гриба, так як відсутні публікації, котрі описують відмінності в складі екстрактів з різних частин тіла гриба.

2. Друге твердження виробника – *«капсула містить 30-40 % тритерпенів Ganoderma lucidum»*.

Згідно з інформацією, наведеною в наукових статтях (див. Етап 1), значення вмісту тритерпенів в маслі гриба в середньому не перевищує 2%. Відповідно, одержати екстракт з 40% тритерпенів можна лише шляхом штучного збагачення екстрагованого масла фракцією тритерпенів гриба.

В результаті дослідження інкапсуляту зразка №1431/3 методом ЯМР-спектроскопії не було виявлено значимих кількостей тритерпенів. В рамках проведення додаткової перевірки хроматографічними методами не було виявлено слідових кількостей тритерпенів, описаних для виду *Ganoderma lucidum*, як і значимих кількостей інших тритерпенів.

Отже твердження виробника про вміст тритерпенів у зразку на рівні 30-40% не відповідає дійсності.

Склад оболонки та значення маси інкапсуляту відповідають заявленим виробником даним.

ВИСНОВКИ

- 1 капсула зразка №1431/3 містить 500 мг масла грибів, найбільш ймовірно саме виду *Ganoderma lucidum*;
- Інкапсулят зразка №1431/3 не містить тритерпенів, описаних для грибів виду *Ganoderma lucidum*.

Завідувач лабораторії



Вольвач М.В.
22.10.2020 р



Рис.1. Фото зразка № 1431/3 (зліва) та фото оригінальної упаковки зразка №1431/3, надане Замовником



Рис.2. Фото упаковки зразка № 1431/3, наведені на сайті виробника <https://www.uszhongke.com/collections/reishi-mushroom/products/p019-html>

В качестве сырья используется 100% споровый порошок рейши. Благодаря применению технологии сверхкритической экстракции CO₂, экстрагированное масло содержит более 32% эффективных тритерпенов Рейши.

Этот продукт одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Китая (CFDA) как здоровая пищевая добавка.

Официальные патентные сертификаты Китая:

№ ZL 2004 1 0014120.3

№ ZL 2006 1 0086075.1

<https://uszhongke.com/sinosci-p0019.html>

Рис.3. Копія тексту, наданого Замовником в якості додаткової інформації

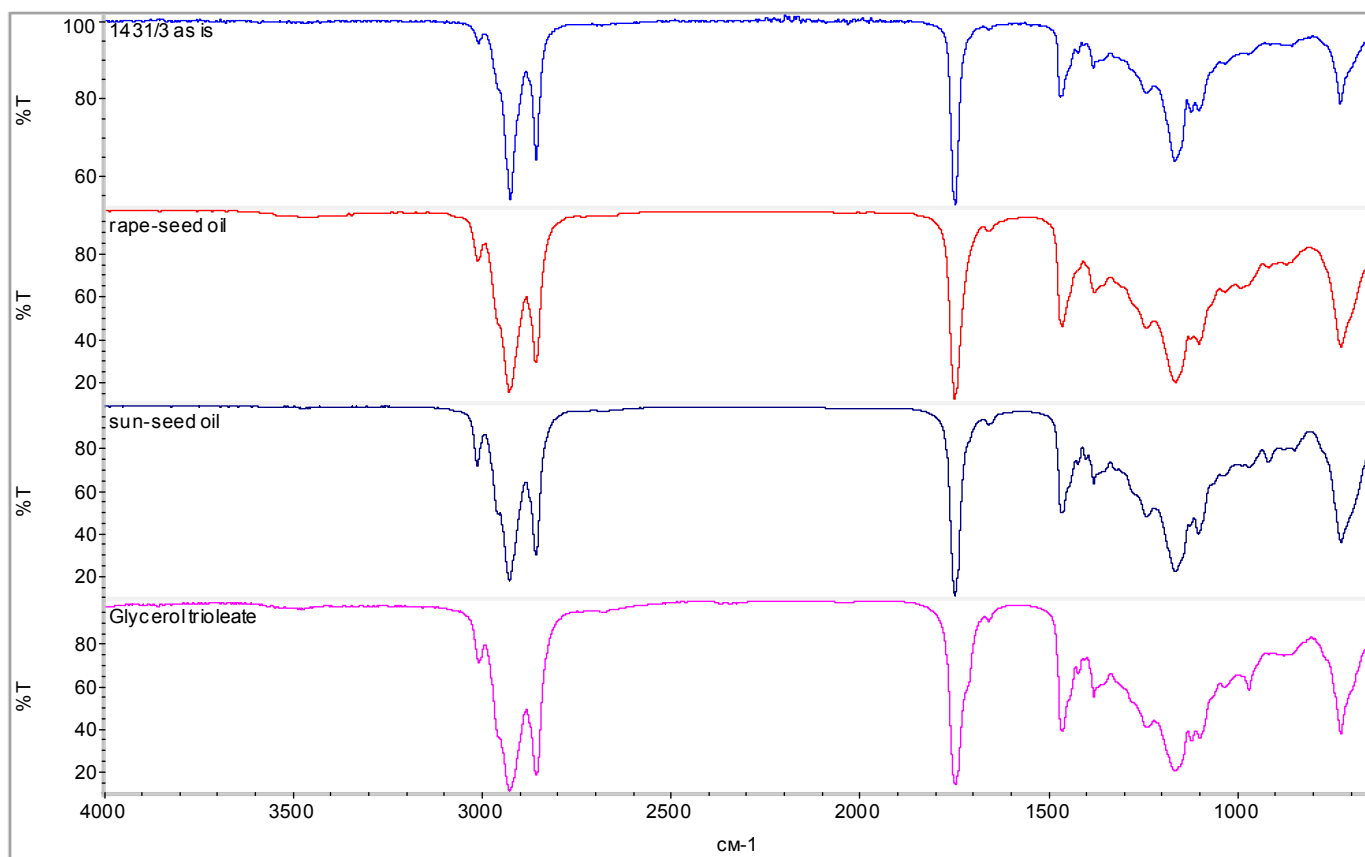


Рис. 4. ІЧ-спектр інкапсуляту зразка № 1431/3 (згори) та ІЧ-спектри рослинних олій для порівняння

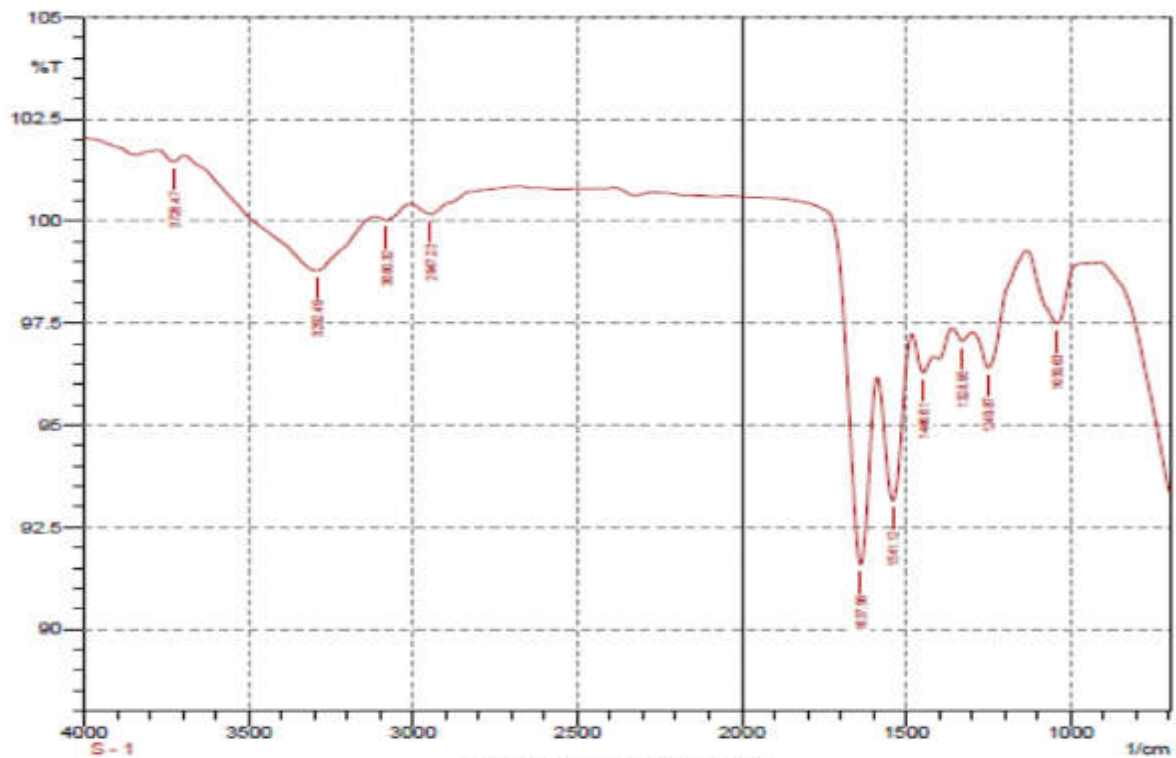
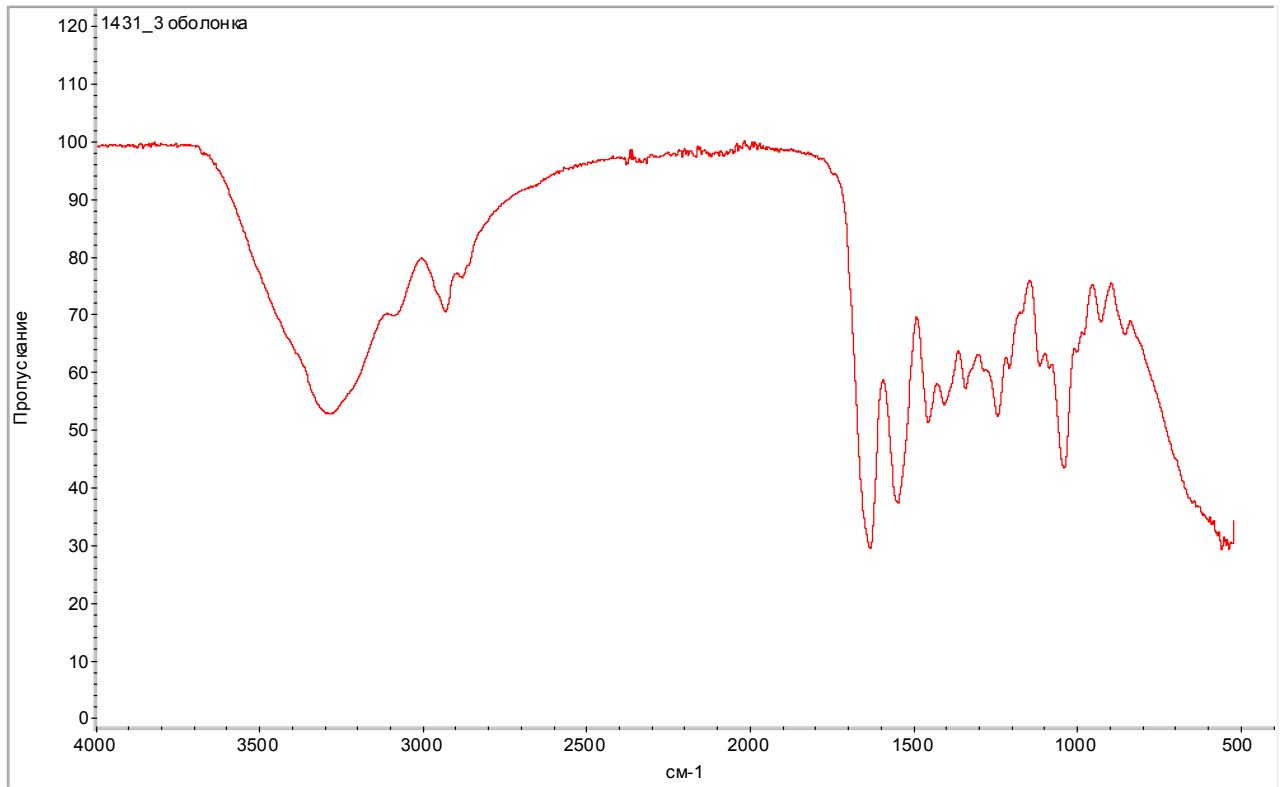


Fig. 7. FTIR spectrum of Pure Gelatin

Рис. 5. ІЧ-спектр оболонки зразка №1431/3 (згори) та ІЧ-спектр желатину для порівняння



Рис.6. Фото оболонки зразка №1431/3, промитої гексаном

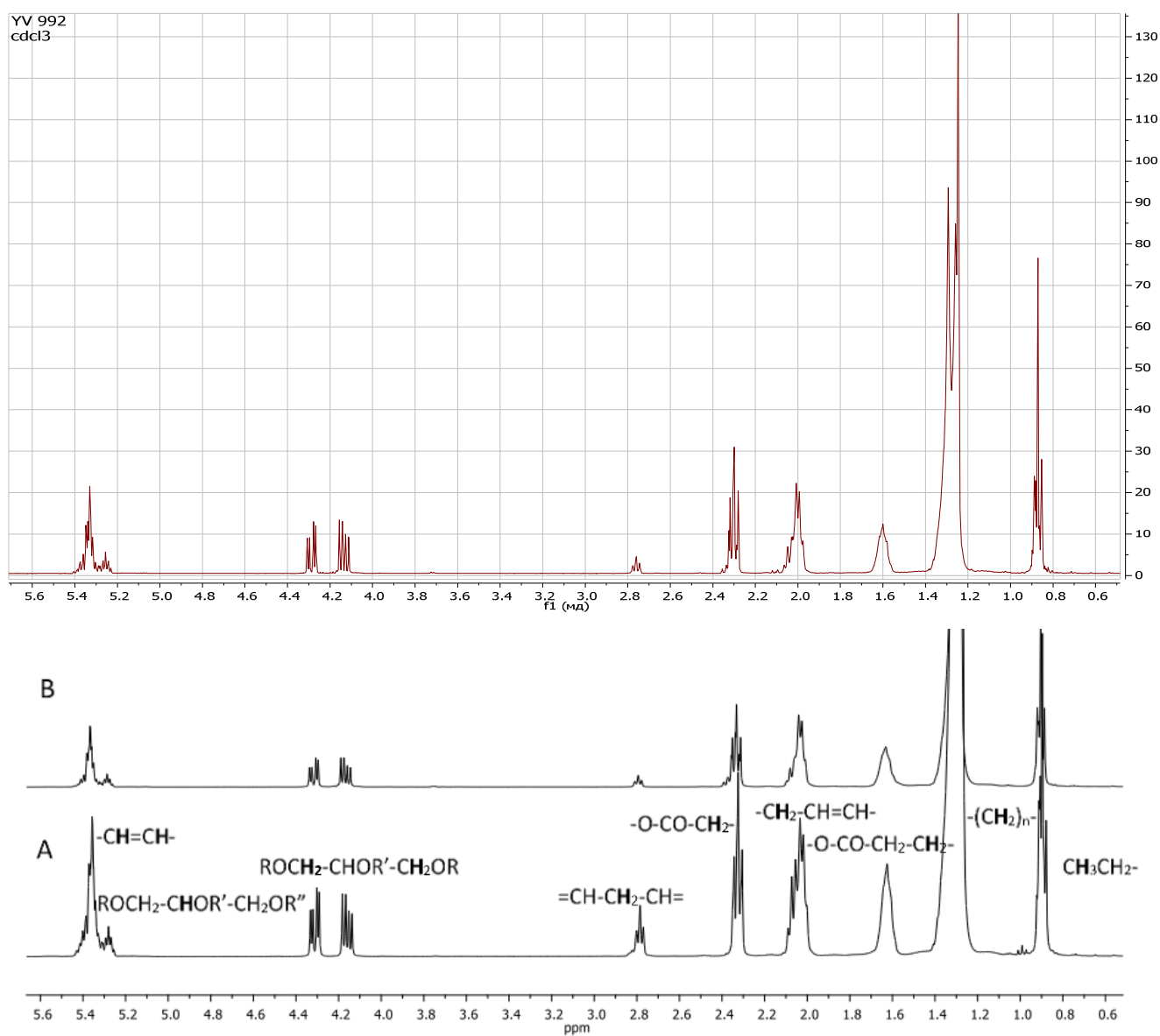
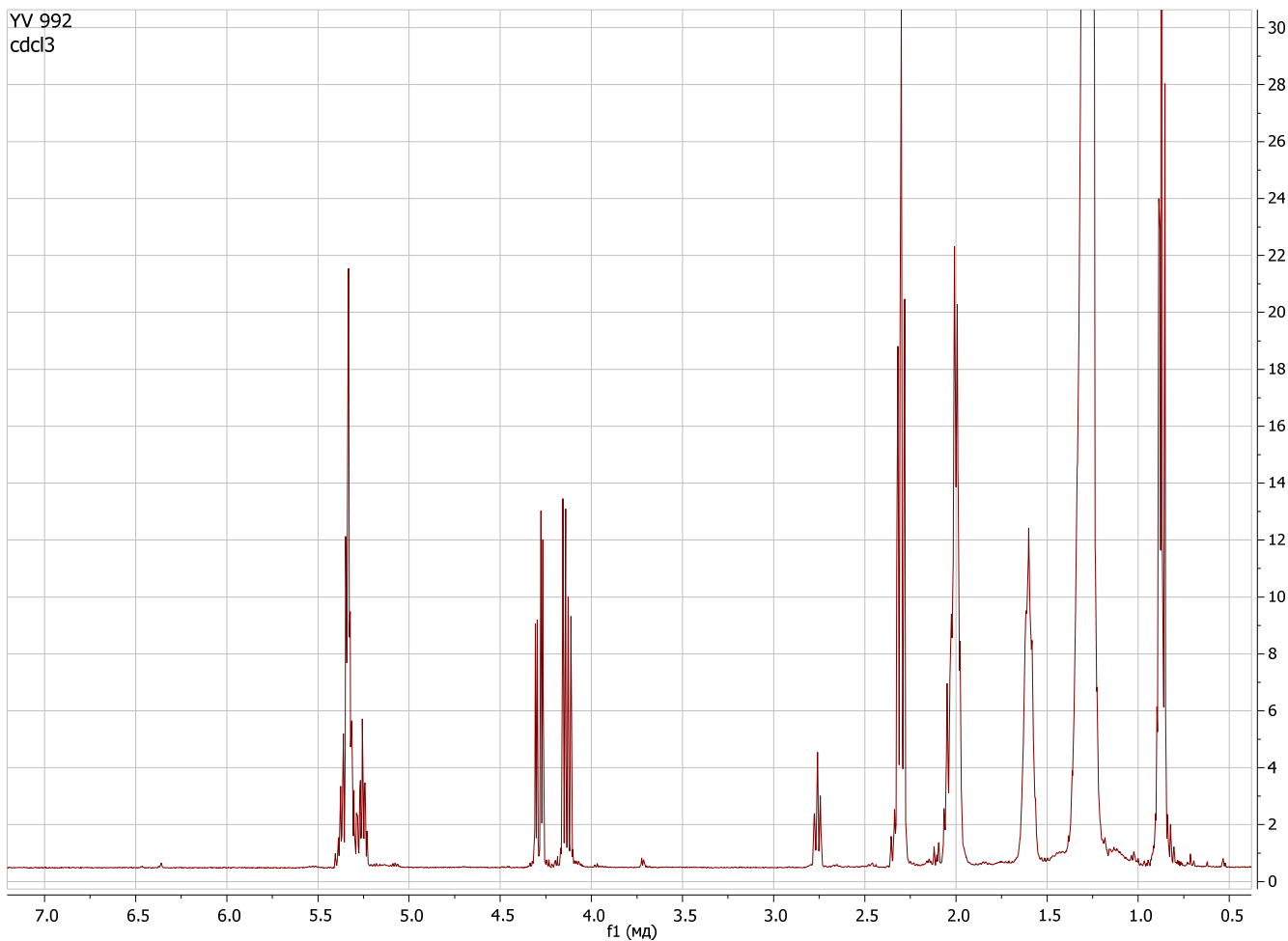
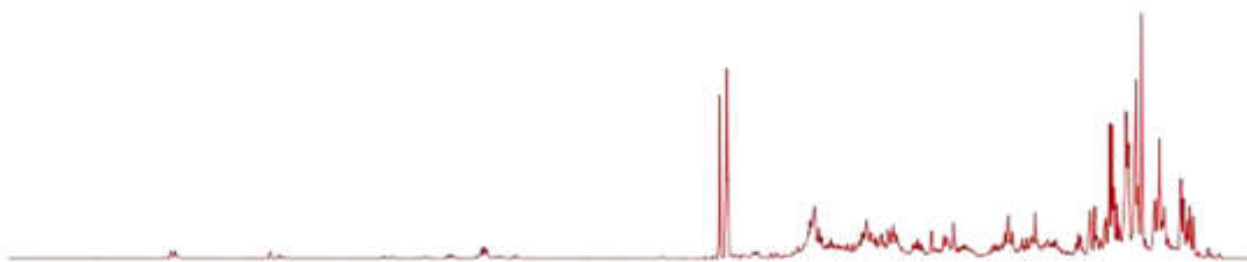


Рис. 7. ^1H -ЯМР спектр зразка №1431/3 (вгорі) та ^1H -ЯМР спектр екстракту спор гриба виду *Ganoderma lucidum* – спектр **В** (наук. публ. [doi:10.3390/app10113907](https://doi.org/10.3390/app10113907))



G. lucidum



G. leucocontextum

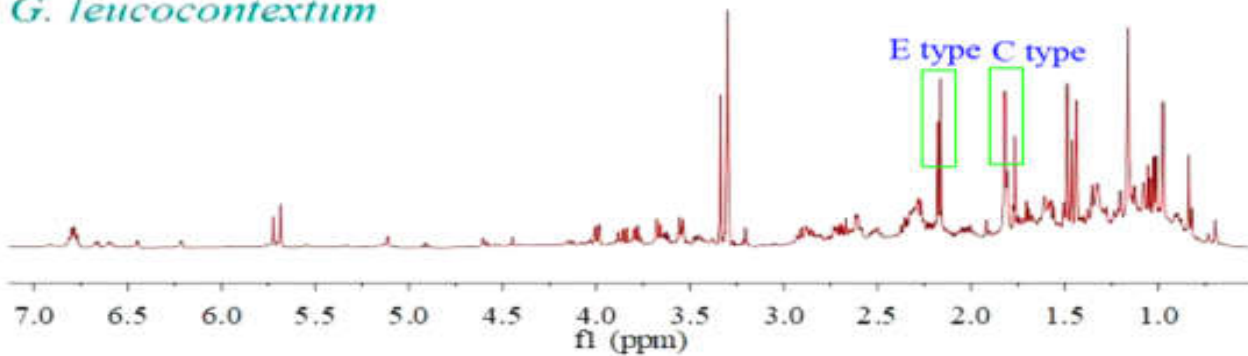


Рис. 8. ^1H -ЯМР спектр зразка №1431/3 (вгорі) та ^1H -ЯМР спектр тритерпенів, екстрагованих з грибів виду *Ganoderma lucidum* для порівняння (наук. публ. [doi:10.1021/acs.jafc.9b07791](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07791))

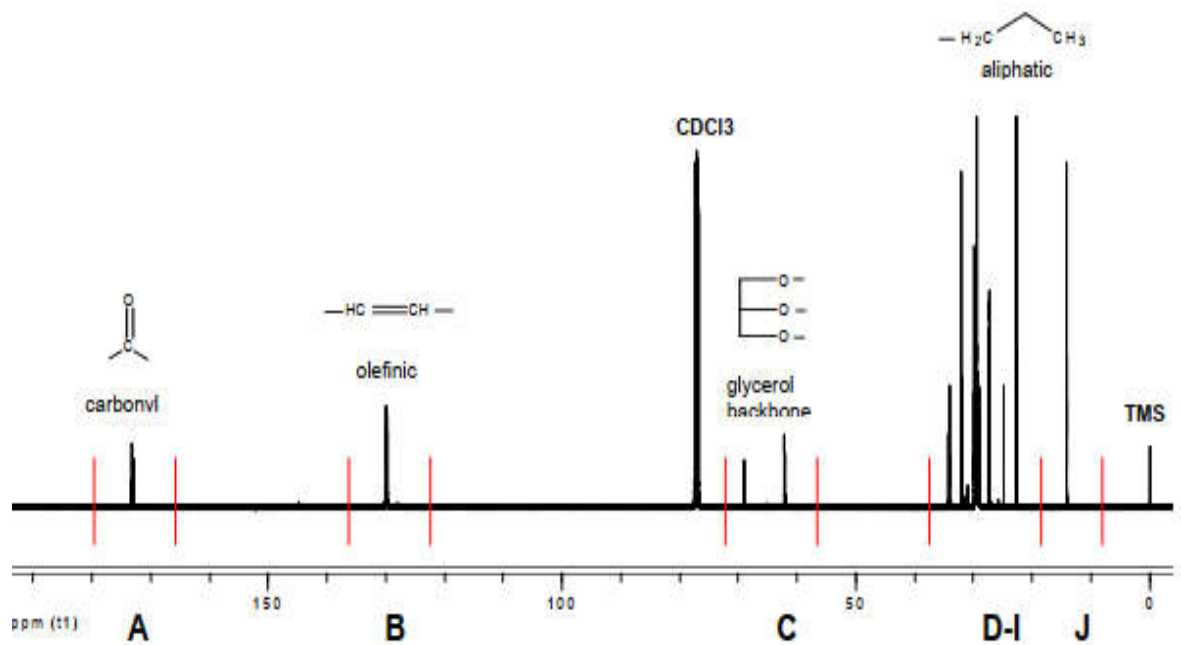
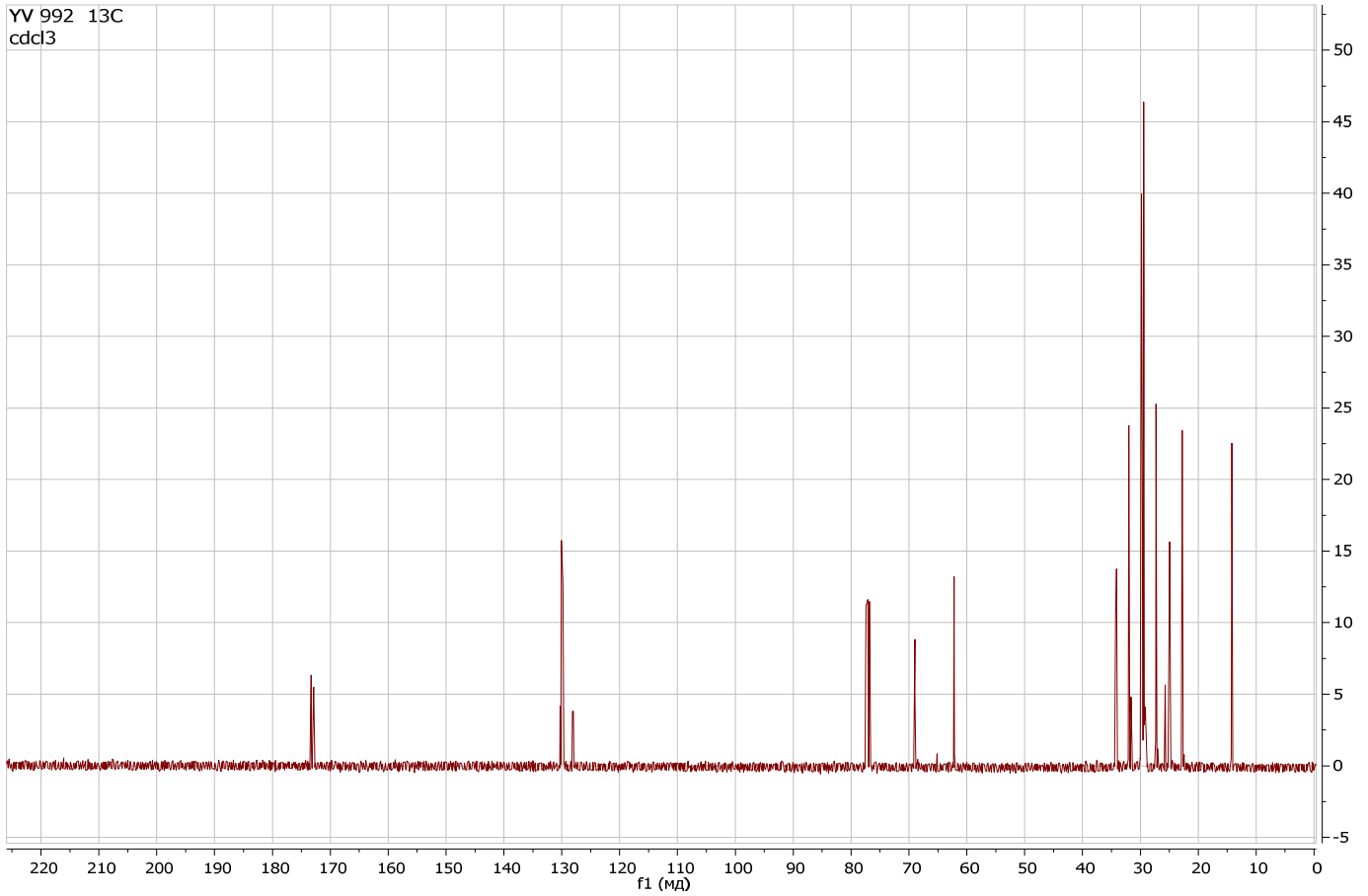


Рис. 9. ^{13}C -ЯМР спектр зразка №1431/3 та ^{13}C -ЯМР спектр рослинної олії для порівняння (наук. публ. «*Analysis of vegetable oils, seeds and beans by TGA and NMR spectroscopy*»)

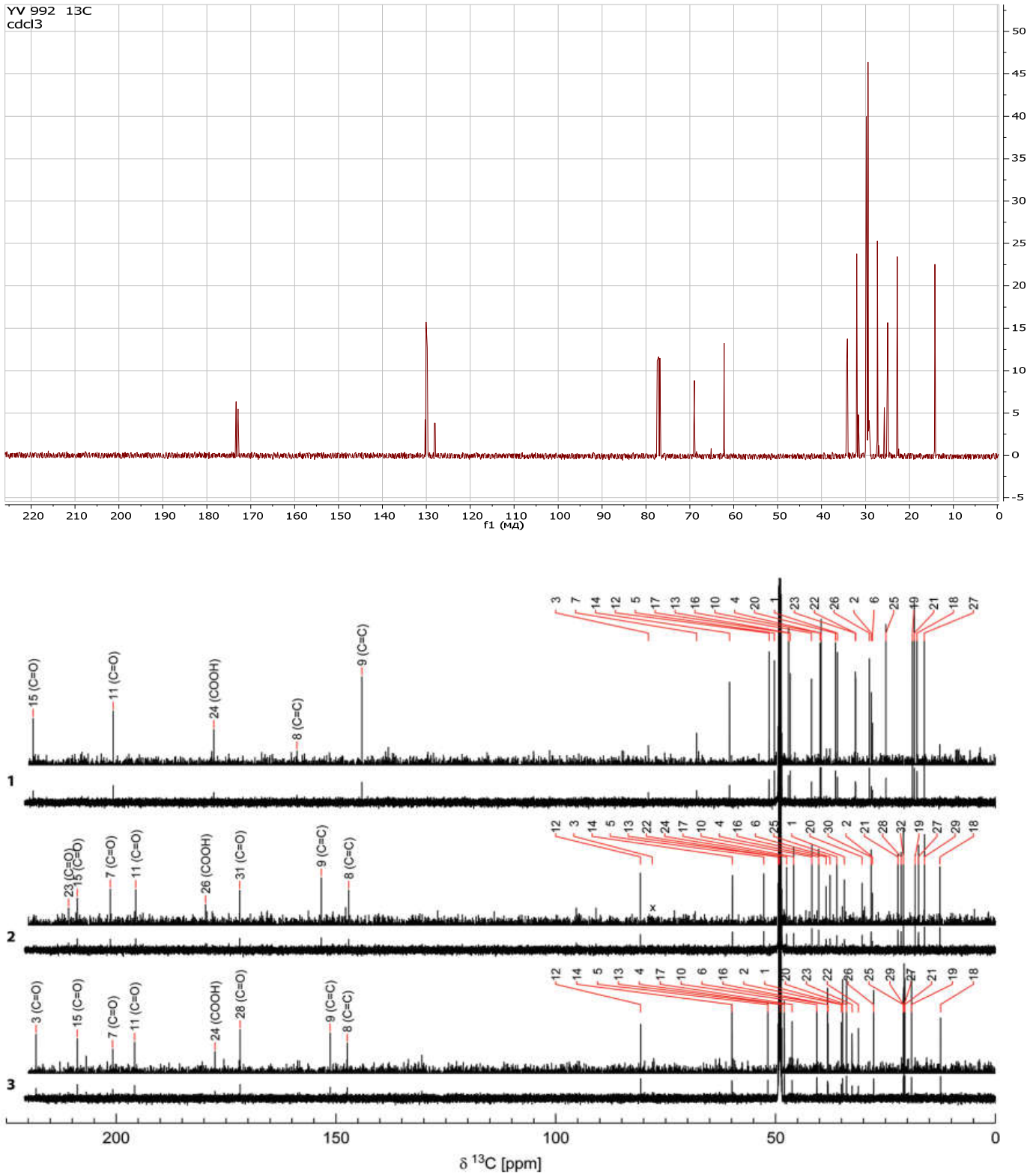


Рис. 10. ^{13}C -ЯМР спектр зразка №1431/3 (згори) та ^{13}C -ЯМР спектр тритерпенів, описаних для грибів виду *Ganoderma lucidum* для порівняння (наук.

публ.[doi:10.1021/np200915c](https://doi.org/10.1021/np200915c))

На ^{13}C -ЯМР спектрі зразка №1431/3 відсутні сигнали карбонів тритерпенів, котрі присутні на спектрах знизу, що вказує про відсутність значимих кількостей цих сполук в досліджуваному зразку

RT: 4.15 - 55.99

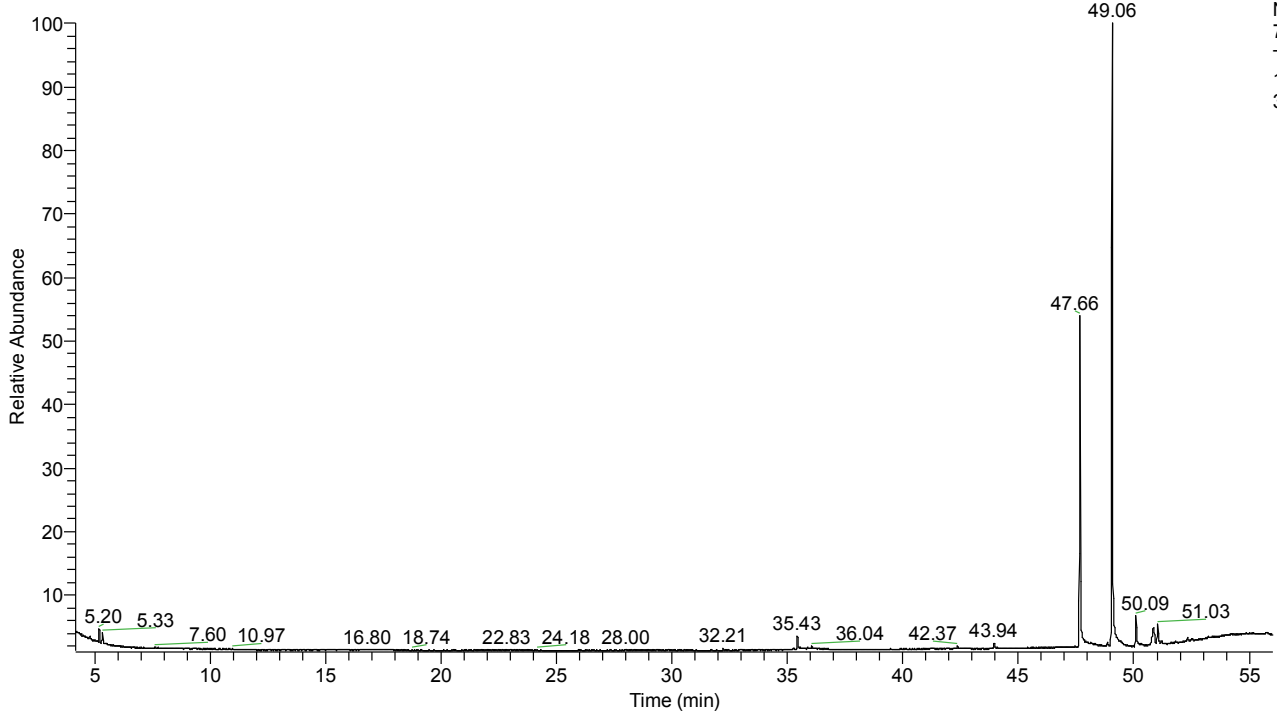


Рис. 11. Газова хроматограма метанольного екстракту зразка №1431/3

RT: 4.92 - 56.00

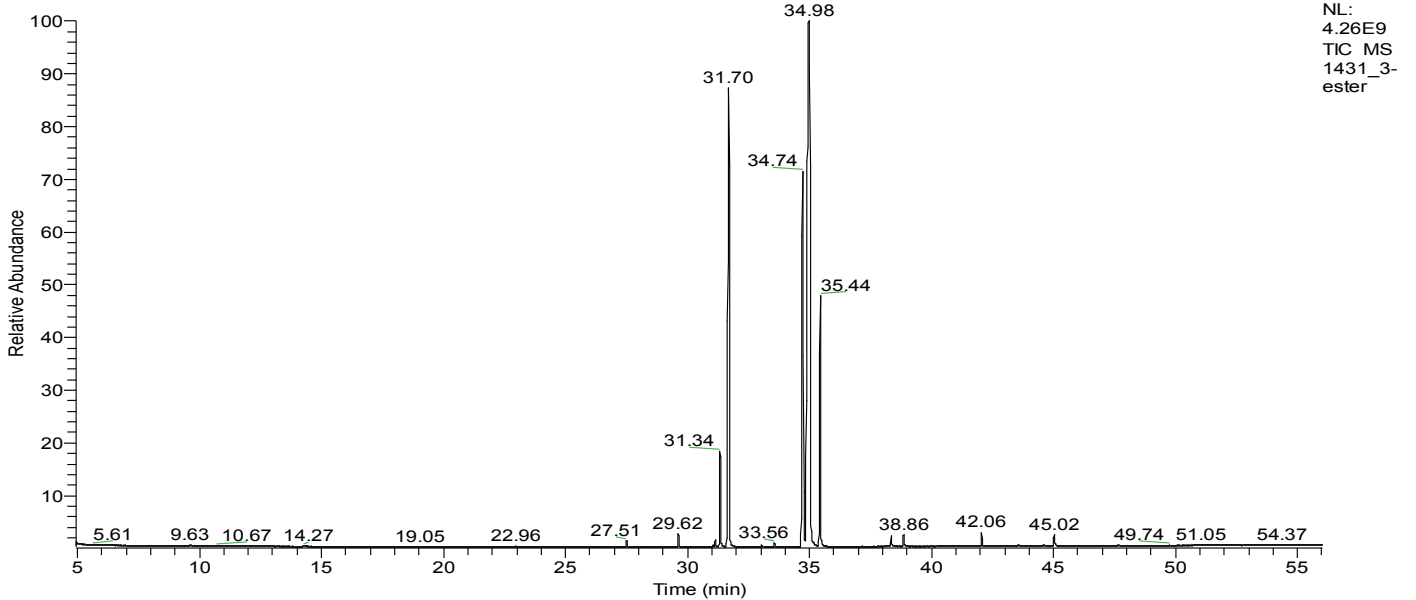


Рис. 12 Газова хроматограма гексанового розчину зразка №1431/3 після переестерифікації

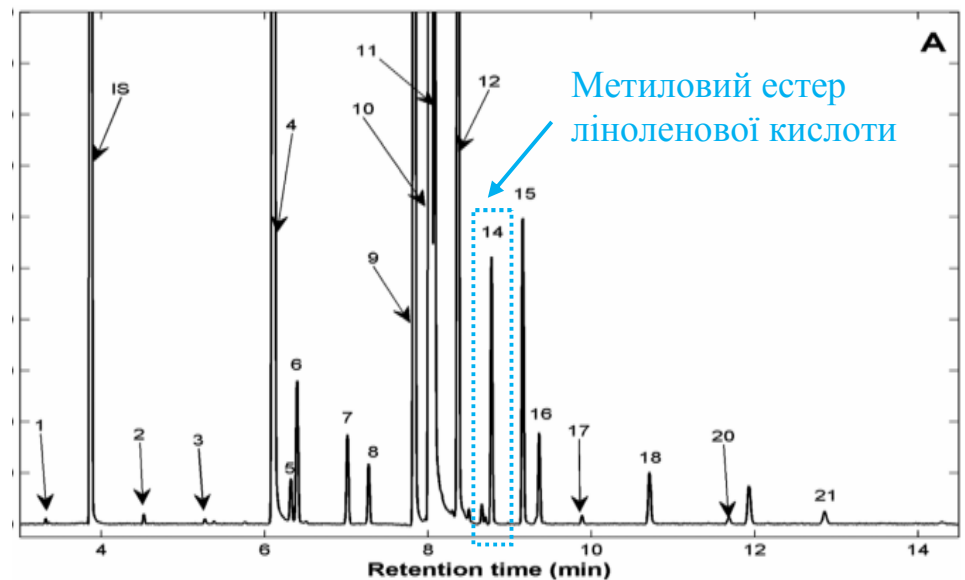
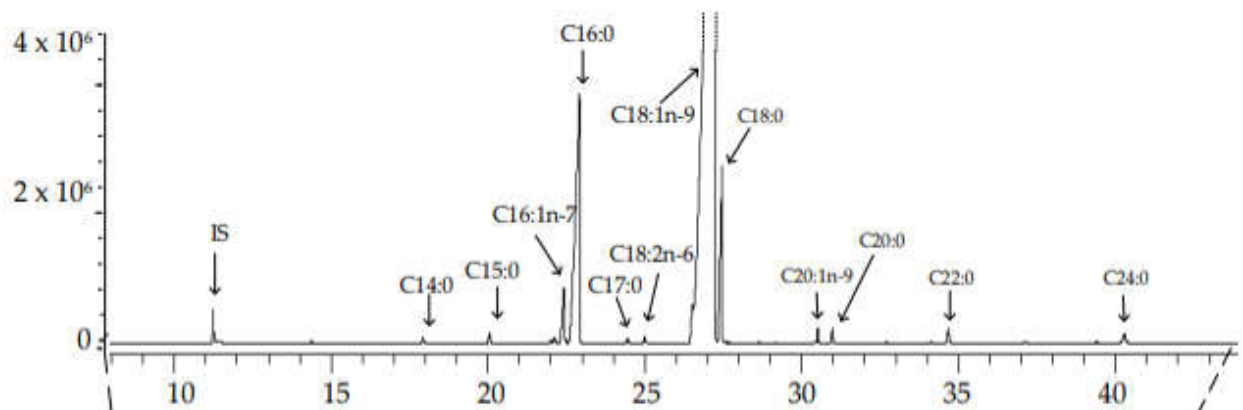
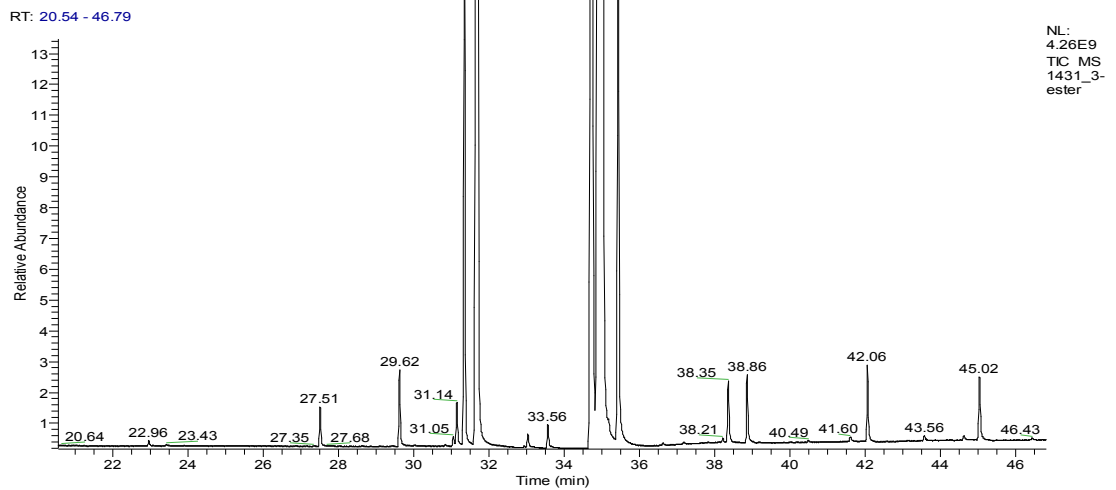


Рис. 13. Збільшений фрагмент газової хроматограми метилових естерів жирних кислот зразка №1431/3 (згори), хроматограма метилових естерів жирних кислот масла зі спор грибів виду *Ganoderma lucidum* (наук. публ. [doi:10.3390/app10113907](https://doi.org/10.3390/app10113907)) – посередині та хроматограма метилових естерів жирних кислот оливкової олії (знизу) з вказанням сигналу метилового естеру ліноленової кислоти (наук. публ. [doi:10.1021/jf4000538](https://doi.org/10.1021/jf4000538))

RT: 0.00 - 42.99

NL:
3.00E6
TIC F: - c ESI
Q1MS
[65.000-
1500.000]
MS
1431-3_3_fs

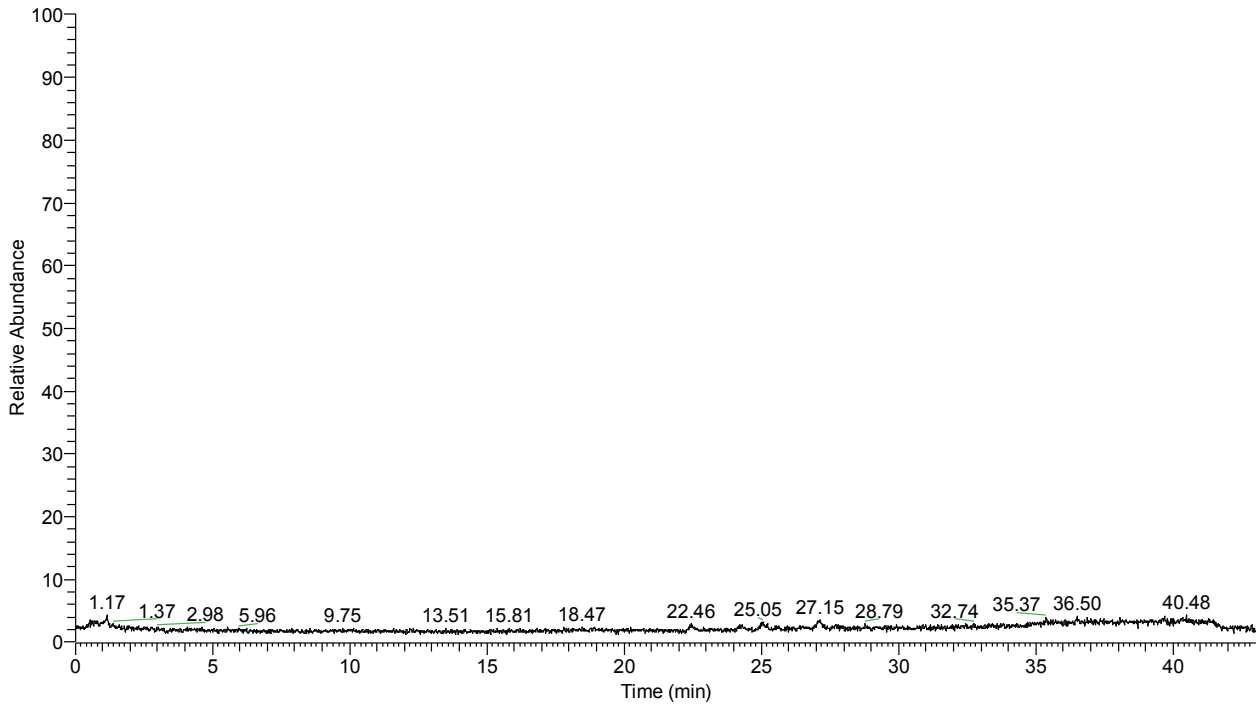


Рис. 14. Рідинна хроматограма метанольного екстракту зразка №1431/3, відбудована за сигналами негативно заряджений йонів