

# Prilog određivanju konstitucije lipidnih tvari u jestivim i otrovnim gljivama zagrebačkog područja

---

**Kaić, Milan**

*Source / Izvornik:* **Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis, 1974, 17, 91 - 156**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:436218>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-21**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



Dr MILAN KAIĆ

**PRIOLOG ODREĐIVANJU KONSTITUCIJE  
LIPIDNIH TVARI U JESTIVIM I OTROVNIM  
GLJIVAMA ZAGREBAČKOG PODRUČJA**

A CONTRIBUTION TO DETERMINING THE CONSTITUTION  
OF LIPID SUBSTANCES IN EDIBLE AND POISONOUS  
MUSHROOMS OF THE ZAGREB REGION

UDK 547.915.5:634.0.172.8:582.287.23.(497.13)

*Sadržaj — Contents*

- I. Opći dio — *General*
  1. Uvod — *Introduction*
  2. Općenito o gljivama — *General considerations on mushrooms*
  3. Objavljeni podaci i rezultati o lipidima gljiva — *Published data and results concerning the lipids of mushrooms*
  4. Lipidi — *Lipids*
  5. Izdvajanje lipida iz biomaterijala — *Isolation of lipids from biomaterial*
    - 5.1 Ekstrakcijski postupak — *Extraction method*
    - 5.2 Izbor sredstva za ekstrakciju lipida — *Choice of agent for the extraction of lipids*
    - 5.3 Uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta — *Removal of non-lipid substances from lipid extract*
  6. Analitički postupci za određivanje konstitucije lipida — *Analytical methods for determining the constitution of lipids*
    - 6.1 Klasični analitički postupci — *Classic analytical methods*
    - 6.2 Obrada acetonom — *Treatment with acetone*
    - 6.3 Protustrujna razdioba — *Countercurrent distribution*
    - 6.4 Kromatografija na stupcu — *Column chromatography*
    - 6.5 Kromatografija na tankom sloju — *Thin-layer chromatography*
  7. Analitički postupci za određivanje masnih kiselina — *Analytical methods for determining fatty acids*
    - 7.1 Kemijski postupci — *Chemical methods*
      - 7.11 Određivanje analitičkih konstanta — *Determination of analytical constants*
      - 7.12 Određivanje slobodnih masnih kiselina — *Determination of free fatty acids*
      - 7.13 Određivanje ukupnih masnih kiselina — *Determination of total fatty acids*
      - 7.14 Odvajanje hlapljivih masnih kiselina od nehlapljivih — *Separation of volatile fatty acids from non-volatile ones*

---

Primljeno 12. IV. 1971.

- 7.15 Rastavljanje nehlapljivih zasićenih masnih kiselina od nezasićenih — *Separation of non-volatile saturated fatty acids from unsaturated fatty acids*
    - 7.151 Taloženje olovnim solima — *Precipitation with lead salts*
    - 7.152 Taloženje litijevim solima — *Precipitation with lithium salts*
    - 7.153 Tvorba urea-kompleksa — *Urea-complex formation*
    - 7.154 Bertramov postupak — *Bertram's method*
    - 7.155 Frakcijska kristalizacija — *Fractional crystallization*
  - 7.16 Određivanje masnih kiselina frakcijskom destilacijom njihovih estera — *Determination of fatty acids through fractional distillation of their esters*
  - 7.17 Određivanje nezasićenih masnih kiselina alkalnom izomerizacijom — *Determination of unsaturated fatty acids through alkali isomerization*
  - 7.2 Kromatografski postupci — *Chromatographic methods*
    - 7.21 Kromatografija na stupcu — *Column chromatography*
    - 7.22 Kromatografija na papiru — *Paper chromatography*
    - 7.23 Kromatografija na tankom sloju — *Thin-layer chromatography*
    - 7.24 Plinska kromatografija — *Gas chromatography*
- II. Eksperimentalni dio — *Experimental*
- 8. Izbor gljiva za istraživanje — *Choice of mushrooms for investigations*
  - 9. Istraživački dio — *Research*
    - 9.1 Branje gljiva i priprava uzoraka za analizu — *Collection of mushrooms and preparation of samples for analysis*
    - 9.2 Određivanje količine vode odnosno suhe tvari — *Water and dry matter content determination*
    - 9.3 Određivanje količina ukupnih lipida — *Determination of total lipids*
      - 9.31 Ekstrakcija ukupnih lipida — *Extraction of total lipids*
      - 9.32 Uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta — *Removal of non-lipid substances from lipid extract*
    - 9.4 Istraživanje izdvojenih lipida — *Investigation of isolated lipids*
      - 9.41 Određivanje količina nepolarnih i polarnih lipida — *Determination of content of non-polar and polar lipids*
      - 9.42 Hidroliza nepolarnih i polarnih lipida — *Hydrolysis of non-polar and polar lipids*
      - 9.43 Izdvajanje masnih kiselina iz hidrolizata — *Isolation of fatty acids from hydrolyzates*
      - 9.44 Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom — *Determination of the composition of fatty acids by means of gas chromatography*
        - 9.441 Priprava metilnih estera masnih kiselina — *Preparation of methyl esters of fatty acids*
        - 9.442 Plinska kromatografija metilnih estera masnih kiselina — *Gas chromatography of methyl esters of fatty acids*
  - 10. Rezultati istraživanja — *Results of the investigations*
- III. Rasprava o rezultatima — *Discussion of results*
- IV. Zaključci — *Conclusions*
- Literatura — *References*
- Summary

## I. OPĆI DIO — GENERAL

### 1. Uvod — Introduction

Neprekidno povećavanje svjetskog pučanstva zahtijeva intenzivnije iskorišćivanje i onih živežnih namirnica koje su se do sada slabo ili nikako upotrebljavale u prehrani. Među njima se nalaze i samonikle jestive gljive koje rastu u velikim količinama u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama i po travnjacima.

Gljive su živežne namirnice bogate bjelančevinama s mnogo esencijalnih aminskih kiselina, mineralnim tvarima, a sadrže i vitamine (osobito A, C i B-kompleksa). Zbog tečnosti te osebujne i ugodne aromatičnosti gljive su veoma cijenjene u kulinarstvu.

U državama niskoga životnog standarda, koje imaju dosta šuma i pogodno podneblje za rast gljiva, organizirano branje gljiva može pomoći prehrani puka.

U industrijski razvijenim državama visokoga životnog standarda, evropskim i prekomorskim (Francuskoj, SR Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Sjedinjenim Američkim Državama i Japanu), velike se količine gljiva (uglavnom pečurke »*Champignon*«) industrijski proizvode i prerađuju.

U doba ratova, kada je normalna opskrba stanovnika živežnim namirnicama poremećena, iskorišćivanje gljiva može biti veoma korisno za prehranu.

Stoga nije čudno da su kemijska istraživanja gljiva započeta prije gotovo sto sedamdeset godina i da su u novije doba sve opsežnija. Ipak još uvijek nema dosta rezultata, pa kemijski mehanizam u gljiva nije tako dobro poznat kao onaj u voća i povrća.

Mali broj istraživačkih radova na domaćim gljivama bio je, uz ostalo, poticaj ovome radu.

Zadatak se rada sveo na kvantitativno određivanje ukupnih, polarnih i nepolarnih lipida i sastava masnih kiselina u jestivim i otrovnim gljivama. Htjelo se, naime, utvrditi:

1. sadrže li jestive i otrovne gljive različite količine ukupnih lipida,
2. razlikuju li se jestive gljive od otrovnih po količinama polarnih i nepolarnih lipida,
3. postoje li u jestivim i otrovnim gljivama bitne kvalitativne i kvantitativne razlike u sastavu masnih kiselina,
4. koje su istraživane jestive gljive bogatije esencijalnim masnim kiselinama, to jest koje su s obzirom na količinu i sastav lipida prehranbeno najvrednije i
5. nalazi li se u nepolarnim lipidima istraživanih gljiva arahidonska kiselina, jedna od esencijalnih masnih kiselina, ili je ona, analogno zoolipidima, nazočna samo u polarnim lipidima.

## 2. Općenito o gljivama — General considerations on mushrooms

Gljive tvore posebnu skupinu nižih biljaka, koje rastu uglavnom na kopnu. Sistematika ih svrstava u stelnjake — *Thallophyta*. Od drugih se *thallophyta* razlikuju po tome što ne sadrže zelenoga biljnog pigmenta-klorofila. Gljive su heterotrofni organizmi, tj. same ne izgrađuju organsku tvar potrebnu za svoj život i razvoj, nego je već gotovu uzimaju od drugih biljaka i životinja, odnosno od njihovih ostataka.

One gljive koje iskorišćuju organsku tvar mrtvih organizama, nazvane su saprofiti, a one koje žive na račun organske tvari živih organizama, paraziti. Osim tih postoje i poluparaziti koji iskorišćuju organsku tvar i živih i mrtvih organizama.

Po obliku su i veličini gljive veoma različite, no njihova je anatomska građa jednolična, po čemu se razlikuju od drugoga nižeg bilja. Gljive su izgrađene od cjevastih, manje ili više razgranatih stanica hifa, koje nisu međusobno srasle, nego su samo isprepletene. Katkada razgranati sistem hifa tvori čitavo tijelo gljiva-micelij koji se razvija na različitim supstratima. Gljive se razmnožavaju sporama mikroskopskih veličina i njihov je oblik uvijek isti za određenu vrstu.

U prirodi gljive imaju značajnu ulogu. One kao heterotrofni organizmi pospješuju razgradnju organske tvari i na taj način sudjeluju u ciklusu oslobađanja i vraćanja anorganskih spojeva tlu.

Broj je gljiva u prirodi veoma velik, 50.000 do 60.000 vrsta. One su na osnovi morfoloških i fizioloških značajka svrstane u pet velikih razreda koji se dijele na redove, podredove, porodice, rodove i vrste (140):

- I. razred: *Myxomycetes* — sluznjake
- II. razred: *Archymycetes* — pragljive
- III. razred: *Phycomycetes* — algašice
- IV. razred: *Ascomycetes* — mješinarke
- V. razred: *Basidiomycetes* — stapčare

U V. razredu *Basidiomycetes* — stapčare — nalaze se sve više gljive, a osnovna im je značajka ta, da im se spore razvijaju na štapičastom ogranku micelija — bazidiji. Taj je razred podijeljen na dva podrazreda (104):

- 1. *Phragmabasidiomycetes*  
Bazidija je višestanična: rđe i snijeti;
- 2. *Holobasidiomycetes*  
Bazidija je jednostanična: prave gljive.

U podredu *Holobasidiomycetes* nalazi se velik broj gljiva, koje se općenito nazivaju »gljive«. Ono što se u svakodnevnom životu naziva gljivom samo je plodnjak, tj. rasplodni gljivin organ, koji se u većini slučajeva sastoji od dva dijela: stručka (stapke) i klobuka (glave). Pravo vegetativno gljivino tijelo, micelij, živi u supstratu (pod zemljom) ili u drvetu) i uglavnom je nevidljivo promatraču.

Prema srodnosti gljiva podrazred *Holobasidiomycetes* podijeljen je na dva reda, tri podreda i više porodica i rodova.

I. red: *Hymenomycetales* — *Plodničarke* (*klobučarke*)

Bazidije tvore plodnicu ili himenij, koja pokriva čitavu gljivu ili samo neke njezine dijelove (listiće, cjevčice).

Podred: *Agaricales* — *Lističarke*

Plodnica (himenij) pokriva s donje strane klobuka radijalno pore-dane listiće. U tom se podredu nalazi najveći broj jestivih vrsta i velik broj otrovnih gljiva.

Podred: *Aphylophorales* — *Nelističarke*

Bazidije u plodnici nisu na listićastim lamelama. U taj su podred svrstane porodice lisičice (*Cantharellaceae*), ježevice (*Hydnaceae*), grive (*Clavariaceae*) i rupičavke (*Polyporaceae*).

Podred: *Boletales* — *Vrganjevke* (*cjevarke*)

Plodnica redovito pokriva s donje strane klobuka okomito stojeće cjevčice, koje su međusobno tijesno zbijene i slabo se drže mesa klobuka, pa se mogu od njega lako odvojiti. U tom se podredu nalaze sve vrste iz roda *Boletus* (vrganja).

II. red: *Gasteromycetales* — *Trbušaste gljive*

Plodnica (himenij) nastaje u unutrašnjosti gljive, a spore ispadnu kada se dozrela gljiva rastvori na vrhu. Tu je svrstano nekoliko rodova puhara (*Scleroderma*) i stršak (*Phallus impudicus*), koje praktički nisu jestive gljive.

Uz domaći i latinski naziv gljive uobičajilo se napisati i kraticu prezimena autora, koji je prvi opisao dotičnu gljivu ili joj je dao ime. U knjizi K. Blagaića »*Gljive naših krajeva*« (13) nalazi se popis tih autora. Evo kraćeg izvotka iz te knjige:

*Pierre Bulliard* (Bull.), francuski prirodoslovac (1740—1793.)

*Elias Magnus Fries* (Fr.), švedski botaničar (1794—1878.)

*Harald Othmar Lenz* (Lenz), njemački učitelj (1799—1870.)

*Lucian Quélet* (Quel.), francuski mikolog (—1899.)

*Jacob Christian Schäffer* (Schäff.), njemački evangelistički propovjednik (1718—1790.)

*J. A. Scopoli* (Scop.), talijanski profesor (1723—1788.)

*Carlo Vittadini* (Vitt.), talijanski mikolog (1622—1703.).

U stručnoj se literaturi osim domaćega i latinskog naziva gljive i kratice prezimena autora veoma često nalazi latinski naziv roda (plemena) i porodice gljive. Na primjer:

kostanjevčica

*Tricholoma conglobatum* Vitt.

*Tricholoma* (rod)

*Agaricaceae* (porodica)

Ako promatramo gljive kao živežne namirnice, onda ih možemo podijeliti na jestive i otrovne. Vidljivih i sigurnih znakova, po kojima bi se odmah moglo sa sigurnošću zaključiti je li neka gljiva otrovna ili nije, do danas nema. Često se puta misli, da su otrovne one gljive, koje na prijelomu mijenjaju boju ili puštaju mliječ. To nije pouzdan dokaz. Isto tako dobar tek gljive ne znači da je ona neotrovna.

Najviše gljiva raste u šumama i na livadama u jesen, osobito ako je jesen topla i vlažna, no ima dosta velik broj gljiva koje rastu već od ranog ljeta (Tab. 1 i 2).

Obično se različite vrste jestivih gljiva u većim količinama pojavljuju svakih nekoliko godina na istom području. Neke vrste gljiva rastu samo na određenim tipovima tala. U bjelogoričnim se šumama nalaze drukčije vrste nego u crnogoričnima. Neke vrste gljiva nisu ni toliko izbir-ljive, pa se mogu naći u različitim tipovima šuma ili izvan njih.

Velikom je broju gljiva potrebno veoma kratko vremensko raz-doblje za razvoj plodnjaka (nadzemnog dijela gljive) pa je i trajnost plodnjaka kratka, no ima gljiva, kojima je za razvoj plodnjaka potrebno i nekoliko godina.

### Prehrambena vrijednost gljiva

Jestive se gljive zbog relativno velike količine bjelančevina po prehrambenoj vrijednosti nalaze između mlijeka i jaja. Iz analitičkih rezultata, koje iznose *Bogojevski* i suradnici (16) vidljivo je, da domaće jestive gljive pečurka (*Agaricus bisporus*), vrganj (*Boletus edulis*), đurđe-vača (*Tricholoma georgii*) i sunčanica (*Macrolepiota procera*) sadrže mnogo esencijalnih amino-kiselina (osobito leucina i izoleucina, lizina i treonina) pa su s biološko-prehrambenog gledišta najvrednije. Osim toga gljive se odlikuju odličnom aromom, pa su u kulinárstvu više cijenjene i tražene nego i najbolje povrće.

Prosječni kemijski sastav (osnovni sastojci) od 34 analizirane do-maće jestive gljive prema *Bogojevskom* i suradnicima (16) izgleda ovako:

voda	90,80 %	(81,80—95,70 %)
bjelančevine	2,89 %	( 0,92— 7,30 %)
mast	0,59 %	( 0,25— 1,40 %)
ugljikohidrati	4,02 %	( 1,01— 9,22 %)
celuloza	0,71 %	( 0,22— 2,10 %)
pepeo	0,83 %	( 0,39— 2,00 %)
kalorije	30 cal	(14,0 —60,0 cal u 100 g svježe gljive)

Po fiziološkom učinku štetnih biljnih tvari na ljudski organizam gljive su podijeljene u tri skupine.

U prvoj se skupini nalaze gljive, koje prouzrokuju u ljudskom or-ganizmu bolove u želucu i crijevima, mučno znojenje, povraćanje i pro-ljev, koji prate napadi nesvjestice. Prvi se znakovi trovanja pokažu pola sata do tri sata nakon jela. Predstavnici te skupine jesu: ludara (*Boletus satanas*), olovasta rudoliska (*Rhodophyllus sinuatus*), tigrasta bjelosporaka (*Tricholoma pardinum*), kovara (*Boletus luridus*), bljuvara (*Russula emetica*), brezovka (*Lactarius torminosus*), grahasta pečurka (*Agaricus meleagris*) i karbolna pečurka (*Agaricus xanthodermus*).

Sve nabrojene gljive prve skupine osim tigraste bjelosporke sadrže manje ili veće količine alkaloida muskarina.

Vegetacijski period nekih domaćih jestivih gljiva  
(13, 51, 104, 143)

Tab. I

Naziv gljive	Mjesec											
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII		
Smrčak <i>Morchella esculenta</i>	+	+	+									
Čunjasti smrčak <i>Morchella conica</i>		+	+									
Pečurka <i>Agaricus campestris</i>			+	+	+	+	+	+				
Vrganj <i>Boletus edulis</i>			+	+	+	+	+	+				
Panjevčica <i>Pholiota mutabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+			
Lisičica <i>Cantharellus cibarius</i>		+	+	+	+	+	+	+	+			
Turčin <i>Leccinum aurantium</i>				+	+	+	+	+				
Blagva <i>Amanita caesarea</i>				+	+	+	+	+				
Grmačica <i>Clitocybe tabescens</i>				+	+	+	+	+				
Velika sunčanica <i>Macrolepiota procera</i>				+	+	+	+	+				
Zlatnožuta griva <i>Clavaria aurea</i>					+	+	+	+				
Rujnica <i>Lactarius deliciosus</i>					+	+	+	+	+			
Zlatača <i>Xerocomus chrysenteron</i>					+	+	+	+	+	+		
Kostanjevčica <i>Tricholoma conglobatum</i>						+	+	+	+			
Vitezovka <i>Tricholoma flavovirens</i>								+	+			
Listopadna vitezovka <i>Tricholoma portentosum</i>								+	+	+		



Vegetacijski period najčešćih domaćih otrovnih gljiva  
(13, 51, 104, 143)

Tab. 2

Naziv gljive	Mjesec										
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
Rani hrčak <i>Gyromitra esculenta</i>	+	+	+								
Crvenkasta cjepača <i>Inocybe patouillardii</i>				+	+	+					
Bijela pupavka <i>Amanita verna</i>			+	+	+	+	+				
Otrovna puhara <i>Scleroderma aurantium</i>			+	+			+	+			
Panterovka <i>Amanita pantherina</i>				+	+	+	+	+			
Ludara <i>Boletus satanas</i>						+	+	+	+		
Čunjasta pupavka <i>Amanita virosa</i>						+	+	+	+		
Žučkasta pupavka <i>Amanita citrina</i>						+	+	+	+		
Bljuvara <i>Russula emetica</i>						+	+	+	+		
Tigrasta bjelosporaka <i>Tricholoma pardinum</i>						+	+	+	+		
Brezovka <i>Lactarius torminosus</i>						+	+	+	+		
Muhara <i>Amanita muscaria</i>						+	+	+	+	+	
Zelena pupavka <i>Amanita phalloides</i>						+	+	+	+	+	
Olovasta rudoliska <i>Rhodophyllus sinuatus</i>						+	+	+	+	+	

Gljive druge skupine oštećuju živčani sustav, a također sadrže alkaloid muskarin. To su muhara (*Amanita muscaria*), panterovka (*Amanita pantherina*), žučkasta pupavka (*Amanita citrina*), crvenkasta cjepača (*Inocybe patouillardii*) i neke vrste iz roda uleknjača (*Clitocybe*).

U trećoj su skupini smrtno otrovne gljive: zelena pupavka (*Amanita phalloides*), bijela pupavka (*Amanita verna*) i konična pupavka (*Amanita virosa*). Te gljive sadrže otrovne tvari faloidin i amanitin, koji razgrađuju stanice jetre, bubrega, srčanog mišićja i živčanog sustava. Prvi se znakovi otrovanja pojave deset do dvadeset sati nakon jela, pa liječnička pomoć rijetko kada stigne na vrijeme (104).

### Rasprostranjenost gljiva u zagrebačkom području

U zagrebačkom području ima oko 200 vrsta jestivih gljiva i petnaestak nejestivih i otrovnih gljiva (13, 146).

Od toga velikog broja najčešće se nalaze i najpoznatije su:

#### a) Jestive gljive

blagva (*Amanita caesarea*)  
biserka (*Amanita rubescens*)  
velika sunčanica (*Macrolepiota procera*)  
turkinja (*Lepiota naucina*)  
đurdevača (*Tricholoma georgii*)  
modrikača (*Tricholoma nudum*)  
kostanjčevica (*Tricholoma conglobatum*)  
puza (*Clitocybe mellea*)  
grmačica (*Clitocybe tabescens*)  
bukovača (*Pleurotus ostreatus*)  
panjevčica (*Pholiota mutabilis*)  
pećurka (*Psalliota campestris*, *Agaricus bisporus*)  
šumarica (*Psalliota silvatica*)  
mliječnica (*Lactarius piperatus*)  
srijež (presnac) (*Lactarius volemus*)  
golubača (*Russula virescens*)  
ljubičastozelena kršnica (*Russula cyanoxantha*)  
lisičica (*Cantharellus cibarius*)  
vrganj (*Boletus edulis*)  
prstenjak (*Boletus elegans*)  
turčin (*Leccinum aurantium*, *Boletus rufus*)  
kestenjasti vrganj (*Boletus badius*)  
crni vrganj (*Boletus aereus*)  
pasji vrganj (*Boletus scaber*)  
pješčarka (*Boletus variegatus*)  
kravara (*Boletus bovinus*)  
zlatača (*Boletus chrysenteron*)  
maglen (*Polyporus pes caprae*)  
žemljača (*Polyporus confluens*)  
žuta griva (capica) (*Clavaria flava*)  
zlatnožuta griva (capica) (*Clavaria aurea*)  
žuta ježevica (*Hydnum repandum*)  
velika gnojištarka (*Coprinus comatus*)

#### b) Nejestive gljive

kovara (*Boletus luridus*)  
zelenjača (*Boletus miniatorporus*)  
kravja balega (*Boletus calopus*)  
tikvasta puhara (*Lycoperdon gemmatum*)

#### c) Otrovne gljive

zelena pupavka (*Amanita phalloides*)  
bijela pupavka (*Amanita verna*)  
žučkasta pupavka (*Amanita citrina*)  
panterovka (*Amanita pantherina*)

muhara (*Amanita muscaria*)  
 krastavka (*Amanita spissa*)  
 olovasta rudoliska (*Entoloma lividum*, *Rhodophyllum sinuatus*)  
 bljuvara (*Russula emetica*)  
 ludara (*Boletus satanas*)  
 otrovna puhara (*Scleroderma aurantium*)  
 brezovka (*Lactarius terminosus*)

### 3. Objavljeni podaci i rezultati o lipidima gljiva — Published data and results concerning the lipids of mushrooms

Prvi su rezultati ekstrakcije lipida (masti) gljiva objavljeni 1804. godine. Izvorni naslov objavljenog rada glasi: »*Bouillon — Lagrange (E.) — Analyse de deux espèces d'Agaric: le Boletus larix et le Boletus igniarius* (20).

Od tada do 1878. godine objavljeno je svega nekoliko radova (23, 24, 48, 83), u kojima su prikazani rezultati određivanja osnovnih sastojaka nekoliko vrsta jestivih gljiva.

Objavlivanjem rada *W. Thörnera* (141), »*Über eine im Agaricus integer vorkommende organische Säure*«, 1879. godine, počinju, u stvari, kemijska istraživanja lipida u gljivama. *Thörner* je u lipidima (masti) smeđe krasnice (*Agaricus integer* = *Russula integra*) izolirao jednu kiselinu, koja pripada redu octene kiseline čija je bruto formula nakon obavljene elementarne analize  $C_{15}H_{30}O_2$ , a to je pentadekan kiseline, član homoložnog niza masnih kiselina.

1883. godine *Th. Bissinger* (12) u eterskom ekstraktu mliječnice (*Lactarius piperatus*) dokazao je nazočnost maslačne i pentadekan kiseline.

Iste je godine objavljena disertacija *K. Margewicza* (88) pod naslovom »*Bestimmung der Nährstoffe im essbaren Pilze*«. Autor je našao, da se lipidi gljiva reda *Hymenomyces* (plodničarke) sastoje uglavnom od glicerida palmitinske, stearinske i oleinske kiseline te male količine slobodnih masnih kiselina. Zanimljiva su zapažanja autora, koji je na temelju analitičkih rezultata zaključio, da se u plodnici (himeniju) nalazi više lipida nego u klobuku i stručku analiziranih gljiva.

Nazočnost lecitina u lipidima lisičice (*Cantharellus cibarius*) i vrganja (*Boletus edulis*) dokazao je *K. Fritsch* (45) 1889. godine.

*E. Opitz* (102) je prvi autor, koji je objavio (1891. god.) rezultate analitičkih istraživanja jedne nejestive i jedne otrovne gljive. On je u eterskom ekstraktu kovare (*Boletus luridus*) i panterovke (*Amanita pantherina*) pronašao palmitinsku, stearinsku i oleinsku kiselinu i fitosterol. Na temelju velike količine slobodnih masnih kiselina — 62,3% odnosno 50% — zaključio je, da se lipidi gljiva spontano razgrađuju.

*W. Heinisch* i *J. Zellner* (58, 155) su u petroleterском ekstraktu muhare (*Amanita muscaria*) pronašli propionsku, palmitinsku i oleinsku kiselinu.

U golemoj su puhari (*Lycoperdon bovista*) *M. Bamberger* i *A. Landsiedl* (6) pronašli dva ergosterola i jednu neidentificiranu tvar iz skupine cerebrozida. Tališta izoliranih ergosterola su bila 158—159 °C i 163,5—164 °C.

Određivanjem kiselinskog i saponifikacijskog broja u petroleter-skom ekstraktu devet vrsta jestivih gljiva *J. Zellner* (155) je na temelju dobivenih rezultata mogao zaključiti, da se masti gljiva razgrađuju u velikoj mjeri (katkada i do 80%). Autor vjeruje, da je to encimatsko zbijanje, iako nije bio u mogućnosti izdvojiti taj encim.

1911. godine su *J. Bougault* i *C. Charaux* (19) u gljivama roda *Lactarius* (krhkolisne gljive) *Lactarius plumbeum*, *Lactarius pyrogalus*, *Lactarius theiogalus* i *Lactarius uvidus* uz stearinsku kiselinu dokazali i ketostearinsku kiselinu  $C_{18}H_{34}O_3$ .

Iste su godine *A. Goris* i *M. Mascré* (49) u šesnaest gljiva podreda *Agaricales* (lističarke) dokazali ergosterol i fungisterol. Ta je dva sterola dokazao *M. T. Ellis* (38) 1918. godine u gljivi *Polyporus nigricanus*.

*R. Rosenthal* (113) je 1922. godine izdvojio fitosterol iz muhare (*Amanita muscaria*). Osim toga on je iz muhare i sumporače (*Nematoloma fasciculare*) izdvojio jedan spoj iz skupine cerebrozida, koji nije sadržavao ugljikohidratnu komponentu, nazvan cerebrin.

U petroleter-skom ekstraktu ludare (*Boletus satanas*) *L. Bard* i *J. Zellner* (7) su 1923. godine pronašli palmitinsku, oleinsku i linolnu kiselinu i lecitin.

1928. godine *E. Hartmann* i *J. Zellner* (57) dokazali su octenu i maslačnu kiselinu, ergosterol i fungisterol u gljivi *Polyporus pinicola*.

U gljivi *Polyporus sulphureus* iz roda *Polyporus* (čvrstocijevke) *J. Zellner* i *E. Zikmunda* (156) pronašli su 1930. godine palmitinsku, stearinsku i oleinsku kiselinu, ergosterol i fungisterol.

1937. godine je *A. Ratcliffe* (110) izdvojio iz vrganja (*Boletus edulis*) ergosterol i još jednu sterolnu komponentu za koju autor pretpostavlja da je spinasterol.

Slijedeći kronološkim redom objavljivanje istraživačkih radova o lipidima gljiva, nakon *Ratcliffeova* rada nastupa vremenski razmak od 22 godine. Istom 1959. godine pojavljuje se rad *J. L. Bonnet* (18), koji je u povijesti istraživanja lipida gljiva važan, jer se u njemu prvi put spominje kromatografsko istraživanje lipida gljiva. *Bonnet* je odredio kvalitativni sastav masnih kiselina u jedanaest jestivih gljiva uzlaznom kromatografijom na papiru. Nepokretna je faza bila papir za filtriranje impregniran 10%-tnom otopinom parafinskog ulja u benzenu, a pokretna faza octena kiselina. Tim su postupkom na razvijenom kromatogramu dokazane laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, 6-ketostearinska i oleinska kiselina.

1962. godine je *D. H. Hughes* (63) odredio kvantitativni sastav masnih kiselina plinskom kromatografijom (GLC) u tri podvrste uzgojene pečurke (*Agaricus campestris*: *White*, *Golden White*, *Cream*). Od ukupnih masnih kiselina u sve tri podvrste najviše ima palmitinske i linolne kiseline. Veoma velik postotak linolne kiseline, s obzirom na to da se linolna kiselina u prirodnim lipidima autooksidira, upućuje na pretpostavku, da aldehid koji nastaje autooksidacijom djeluje kao pospješujući faktor rasta gljiva. Kromatografijom na tankom sloju eterskog ekstrakta analiziranih gljiva identificirani su slobodni sterol, sterol ester, trigliceridi, 1,2- i 1,3-digliceridi, monogliceridi i slobodne masne kiseline.

*R. C. M. Jack* (66) je 1965. godine u kloroform-metanolskom ekstraktu gljiva *Coprinus comatus* (velika gnojištarka) i *Glomella cingulata*

kromatografijom na tankom sloju dokazao sterol estere, slobodni sterol, trigliceride, digliceride i slobodne masne kiseline u frakciji neutralnih lipida, a u fosfolipidnoj frakciji lecitin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil inozitol i difosfatidil glicerol. Osim toga autor je kvantitativno odredio plinskom kromatografijom (GLC) masne kiseline vezane u trigliceridima i u fosfolipidima. I u trigliceridima, i u fosfolipidima nalazi se relativno velika količina palmitinske kiseline. Trigliceridi sadrže više oleinske, a fosfolipidi više linolne kiseline.

M. Jasinska i J. Szymczak (68) su 1966. godine, istražujući lipide kestenjastog vrganja (*Boletus badius*), turčina (*Boletus rufus* = *Leccinum aurantium*) i lisičice (*Cantharellus cibarius*) odredili acetilne brojeve, koji su bili visoki na temelju čega pretpostavljaju da lipidi tih analiziranih gljiva sadrže hiroksikiseline odnosno mono- ili digliceride.

U. Bracco i suradnici (22) 1967. godine analizirali su lipide (kloroform-metanolski ekstrakt) dehidriranog micelija jestivih gljiva pečurke (*Agaricus campestris*) i lisičice (*Cantharellus cibarius*). U suhoj je tvari pečurke bilo 2,55% ukupnih lipida, a u suhoj tvari lisičice 5,37%. Kromatografijom na tankom sloju neosapunjivih tvari pronađeni su steroli, alifatski alkoholi, mono-, di- i triterpenoidi, tokoferoli, karotenoidi, nezasićeni i zasićeni alifatski ugljikovodici.

Od sterolnih komponenata u miceliju pečurke pronađeni su ergosterol i kampesterol, a u miceliju lisičice ergosterol, sitosterol, kampesterol, stigmasterol i brasikasterol.

Plinskom kromatografijom (GLC) metilnih estera masnih kiselina određene su u pečurci miristinska, pentadekan, palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i arahinska kiselina, a u lisičici palmitinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina. Od ukupnih masnih kiselina najviše je bilo linolne kiseline i to u miceliju pečurke 81,40%, a u miceliju lisičice 63,70%.

A. Maggioni i suradnici (86) su 1968. godine određivali sastav uzgojene pečurke (*Agaricus bisporus*) tijekom rasta u zavisnosti od dodanog dušičnog gnojiva (uree i amonijskog sulfata). U oba su pokusa uz ostale sastojke određene i masne kiseline plinskom kromatografijom (GLC). Sastav je tih kiselina bio: kaprinska, laurinska, miristinska, pentadekan, palmitinska, palmitoleinska, margarinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska kiselina i još dvije neidentificirane kiseline. Od ukupnih masnih kiselina najviše je bilo linolne kiseline i to 78% odnosno 70%.

Na temelju pristupačnih literaturnih podataka o kemijskom istraživanju domaćih gljiva, do sada je objavljeno samo pet radova.

K. Balenović i suradnici (3) 1955. godine izdvojili su kvarterne baze muskarinske serije iz otrovnice muhare (*Amanita muscaria*) koja je ubrana u zagrebačkoj okolici.

Iste su godine K. Balenović i suradnici (4) izdvojili crveni pigment rusulorodin iz otrovne gljive bljuvare (*Russula emetica*) i proučavali njegove osobine. Bljuvara je također potjecala iz okolice Zagreba.

1967. godine D. Bogojevski i suradnici (16) objavili su djelo u kojemu opisuju određivanje hranjive i bjelančevinske vrijednosti 34 vrsta domaćih jestivih gljiva. Analizirane su gljive potjecale iz Bosne, Hrvatske (Slavonije i Like), Slovenije i Crne Gore.

Iste su godine *M. Kaić* i suradnici (70) kvantitativno odredili količine željeza, bakra i fosfora u osam jestivih gljiva zagrebačkog i sisačkog područja.

*N. Bregant* i *Z. Turk* su 1970. godine (25) objavili postupak izdvanja crvenog pigmenta rusularodina iz otrovne gljive bljuvare (*Russula emetica*) kromatografijom na stupcu i preparativnom kromatografijom na tankom sloju adsorbensa.

O kemijskom istraživanju lipida domaćih gljiva do danas nema nikakvih podataka.

#### 4. Lipidi — Lipids

Lipidi su sastojci biljnog i životinjskog tkiva, netopljivi u vodi, osim malobrojnih iznimaka, a topljivi u eteru, petroleteru, kloroformu, benzenu i drugim organskim otapalima koja se ne miješaju s vodom (39, 111).

Do danas nema jedne općenito prihvaćene podjele lipida. Tako *Kaufmann* (71) lipide dijeli na:

1. jednostavne lipide (gliceridi, voskovi, sterin-estri i triterpenol ester);
2. estere koji sadrže fosfor i dušik (glicerin fosfatidi, acetal fosfatidi ili plazmalogeni i sfingomielin);
3. složene lipide (saharolipidi i lipoproteidi);
4. prateće tvari (sterini, lipovitamini, lipokromi, ugljikovodici, pro- i antioksidansi te nosioci arome).

*Deuel* i *Mechlenbacher* (122) ih međutim dijele na:

1. jednostavne lipide:
  - a) neutralne masti,
  - b) voskovi (pravi voskovi, holesterol esteri i esteri vitamina A i D).
2. složene lipide:
  - a) fosfolipidi ili fosfatidi (glicerin fosfatidi, sfingomielin i fosfatidna kiselina),
  - b) cerebrozidi (saharolipidi),
  - c) sulfolipidi.
3. lipidne derivate:
  - a) masne kiseline,
  - b) alkoholi (ravnolančasti alkoholi, sterini, vitamin A),
  - c) ugljikovodici (alifatski, karotenoidi i skvalen),
  - d) vitamini D, E i K.

*A. White* i suradnici (152) dijele lipide na:

1. masne kiseline,
2. neutralne masti (trigliceridi),
3. fosfatide:
  - a) derivati glicerol fosfata,
  - b) derivati sfingozina ili srodnih spojeva,

4. glikolipide:
  - a) derivati sfingozina,
  - b) derivati glicerola,
5. alifatske alkohole i voskove:
6. terpene,
7. steroide.

U novije se doba u znanstvenoj literaturi (55, 91, 92, 100, 138) sve više susreće podjela lipida na dvije glavne skupine i to na:

1. polarne lipide i
2. nepolarne lipide.

Polarni su lipidi spojevi čije molekule sadrže jako polarne ili električki nabijene skupine koje mogu biti usmjerene prema vodi ili nekoj drugoj polarnoj molekuli odnosno polarnim skupinama, a u istom vremenu su nepolarni dijelovi njihovih molekula usmjereni od polarne sredine.

Drugim riječima, polarni su lipidi oni koji imaju tendenciju da se jednim dijelom svoje molekule usidre u vodi, odnosno da zauzmu međufazu između nepolarne i polarne (vodene) faze. Fosfolipidi, cerebrozidi i slobodne masne kiseline glavni su predstavnici polarnih lipida.

Polarne odnosno električki nabijene skupine koje se nalaze u molekulama polarnih lipida jesu: primarne i sekundarne fosfatne skupine, karboksilna skupina, sulfatna skupina, primarna aminska skupina slobodna i u  $\alpha$ -položaju prema karboksilnoj skupini i kvarterna amonijska baza. U polarne se skupine ubrajaju još esterske, eterske i vinileterske skupine (vezovi) i nezasićeni ugljikovodični lanci.

U nepolarne skupine spadaju zasićeni ravni i razgranati ugljikovodični lanci i mješoviti ugljikovodični prsteni npr. steroli i sterol esteri.

Nepolarni su lipidi takvi lipidi čiji je nepolarni dio molekule tako nadmoćan (gliceridi) da se ne miješaju s vodom. Kada se npr. trigliceridi mehanički rasprše u vodi, oni se tada nalaze u obliku malih okruglih kapljica čija je dodirna površina u dodiru s vodom minimalna (55).

Danas je, međutim, u kemijskim analitičkim istraživanjima prevladala novija definicija polarnih i nepolarnih lipida koju je 1965. godine objavio *N. Nicolaidis* (100). On kaže: »Nepolarni su lipidi ugljikovodici, voskovi, sterol esteri, trigliceridi, slobodne masne kiseline, digliceridi, monogliceridi i spojevi slične polarosti, koji se sa stupca kremične kiseline eluiraju istim nepolarnim otapalima. Polarni su lipidi spojevi polar-niji od monoglicerida, a obuhvaćaju ceramid i druge sfingolipide i fosfolipide«.

Podjela lipida na polarne i nepolarne lipide veoma je prikladna, jer ne obuhvaća vitamine, pigmente, nosioce arome, prooksidante i antioksidante, tzv. prateće tvari.

U mnogim podacima, osobito u podacima o analitičkim kromatografskim istraživanjima lipida veoma se često pojavljuje naziv »neutralni lipidi« (29, 66, 73, 76, 99, 106, 117, 133, 134, 135, 137, 142, 145, 147). Potrebno je istaći da je pojam »neutralne masti« jasan, jer se pod njim podrazumijevaju gliceridi, odnosno trigliceridi (17, 108, 152), pa naziv »neutralni lipidi« može izazvati pomutnju. Taj su pojam nedavno (1968.

god.) protumačili V. Skipski i suradnici (135). Oni doslovce kažu: »Lipidi koji u svojoj molekuli nemaju fosfora ni saharida, nazivaju se »neutralni lipidi«. Unatoč činjenici da svi lipidi ove skupine nisu u kemijskom smislu neutralni (kao npr. slobodne masne kiseline), taj je naziv prikladan jer se svi lipidi ove skupine razdvajaju nepolarnim otapalima«. (Razdvajanje nepolarnim otapalima odnosi se na kromatografsko razdvajanje). Drugim riječima, naziv »neutralni lipidi« istoznačnica je s nepolarnim lipidima.

Budući da struktura, rasprostranjenost u prirodi i nomenklatura svih polarnih lipida nisu još potpuno istražene i općenito prihvaćene, potrebno je o toj lipidnoj vrsti nešto više reći.

Polarni lipidi obuhvaćaju fosfolipide (fosfatide), glikolipide i sulfolipide. Molekule fosfolipida sadrže fosfor, glikolipida jednu ili više molekula monosaharida, a sulfolipida sumpor.

Iako je ta jednostavna podjela polarnih lipida veoma česta, novija je podjela polarnih lipida, koju preporučuju G. Rouser i suradnici (116) bolja. Oni polarne lipide dijele na dvije glavne skupine: glicerolipide (derivate glicerola) i sfingolipide (derivate sfingozina). Svaka od tih glavnih skupina obuhvaća po dvije podskupine: lipide s fosforom i lipide bez fosfora. Ta podjela shematski izgleda ovako:

### Polarni lipidi

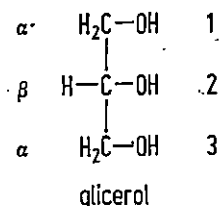
1. glicerolipidi:
  - a) glicerofosfolipidi (lipidi s fosforom),
  - b) glicerolipidi bez fosfora.
2. sfingolipidi:
  - a) sfingofosfolipidi (lipidi s fosforom),
  - b) sfingolipidi bez fosfora.

#### 1. Glicerolipidi

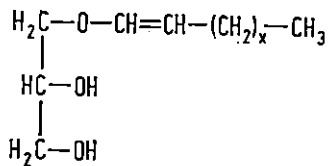
Glicerolipidi sadrže u molekuli jedan ili više glicerolskih ostataka (radikala) s kojima su u  $\alpha'$ ,  $\beta$  (1 i 2) položajima glicerola esterskim vezom vezane dugolančaste masne kiseline.

U glicerofosfolipidima je primarna alkoholna skupina u  $\alpha$ -položaju glicerola esterificirana fosforom kiselinom ili fosforiliranim spojevima: holinom, etanolaminom, serinom i inozitolom. Vezane masne kiseline glicerofosfolipida jesu palmitinska, oleinska, linolna i linolenska, kiselina (17). Iznimke su plazmalogeni u čijim se molekulama u  $\alpha'$ -položaju glicerola umjesto masne kiseline nalazi nezasićeni eter, odnosno vinil-eterski vez i alkoksi spojevi, u kojima se na istom mjestu u molekuli nalazi gliceril eterski vez (116). Ti spojevi nisu nađeni u biljnim glicerofosfolipidima (17).

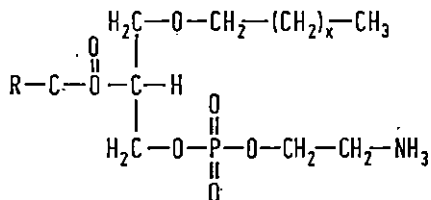
Suglasno sa Sastryem, Katesom (120) i Bonnerom (17) zastupljenost i raspored masnih kiselina u biljnim i životinjskim glicerolipidima je ista. U  $\alpha'$ -položaju glicerola esterski su vezane zasićene masne kiseline, a često i oleinska kiselina. U  $\beta$ -položaju glicerola vezane su nezasićene masne kiseline.







vinilni eter



gliceril eter fosfolipid  
( $\alpha$ -alkoksi-fosfatidil etanolamin)

a) Glicerofosfolipidi: fosfatidna kiselina, fosfatidil glicerol, difosfatidil glicerol (kardiolipin), fosfatidil holin (lecitin), fosfatidil etanolamin (kolamin kefalin), fosfatidil serin (serin kefalin), fosfatidil inozitol, fosfatidil inozitol difosfat, fosfatidil inozitol trifosfat, fosfatidil plazmalogen.

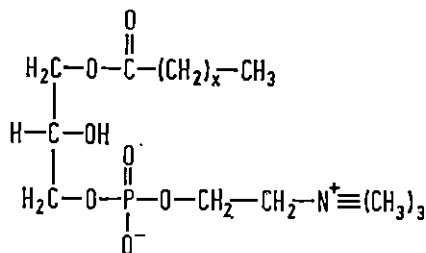
Struktura spomenutih glicerofosfolipida prikazana je na slici 1.

Nazivlje glicerofosfolipida nije još potpuno ujednačeno. Stariji naziv lecitin, kardiolipin, kolamin kefalin i serin kefalin nisu dovoljno precizni prema sadašnjem znanju o konstituciji tih spojeva.

Iz strukture glicerofosfolipida (slika 1) vidljivo je da se svi osim fosfatidil plazmolagena mogu teoretski smatrati derivatima diacil- $\alpha$ -glicerofosforne kiseline koja je danas poznatija pod nazivom fosfatidna kiselina (engl. *phosphatidic acid*). Na temelju toga izvedeni su nazivi za sve glicerofosfolipide upotrebom predmetka »fosfatidil«. To znači da »fosfatidil« označuje glicerofosfolipid. Takvo je nazivlje uglavnom prihvaćeno, jedino je stari naziv lecitin za fosfatidil holin još ostao u upotrebi (116).

Fosfatidna kiselina i fosfatidil gliceroli osnovni su sastojci glicerofosfolipida i smatraju se glavnim intermedijerima u biosintezi glicerofosfolipida (116).

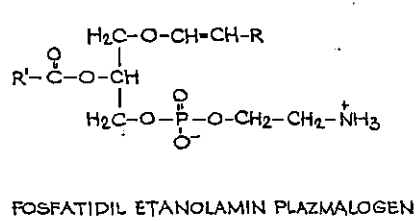
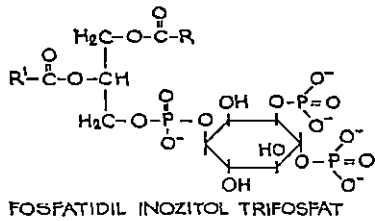
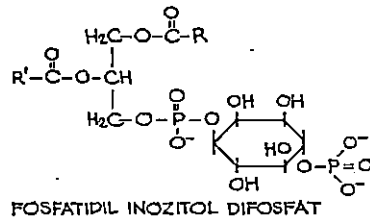
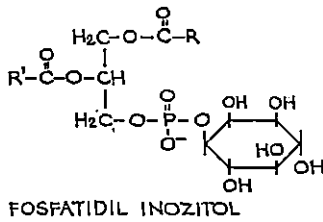
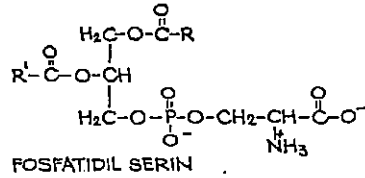
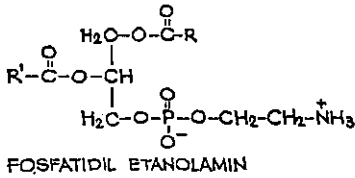
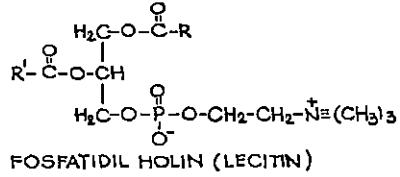
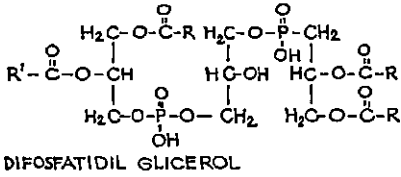
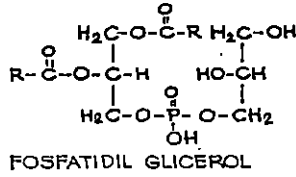
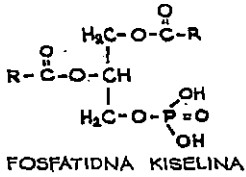
Fosfatidil holin (lecitin), fosfatidil etanolamin i fosfatidil serin mogu se pojaviti u još jednom strukturnom obliku tzv. »lizo« obliku, u čijoj molekuli jedna hidroksilna (alkoholna) skupina glicerola nije esterificirana masnom kiselinom nego je slobodna (136). Na primjer:



lizo fosfatidil holin (lizelecitin)

S obzirom na jaku kvartarnu amonijsku bazu holin i umjereno jaku fosfornu kiselinu obadviije se funkcionalne skupine fosfatidil holina nalaze u ionskom obliku.

## GLICEROFOSFOLIPIDI



SLIKA 1 GLICEROLIPIDI

Fosfatidil etanolamin i fosfatidil serin su kiselij i od fosfatidil holina, jer je njihova primarna aminska skupina slabija baza od kvarterne amonijske baze. U molekuli fosfatidil serina još se nalazi i karboksilna skupina pa je još kiselij i.

Fosfatidil inozitoli se hidrolizom raspadaju na jedan mol glicerola, dva mola masnih kiselina, jedan mol inozitola i jedan, dva ili tri mola fosforne kiseline.

Plazmalogeni, kao što je već spomenuto, u svojoj molekuli mjesto masnih kiselina u  $\alpha$ '-položaju glicerola imaju nezasićeni eter (vinil eterski vez). Prema fosforiliranom spoju u  $\alpha$ -položaju glicerola nazivaju se fosfatidil holin plazmalogen, fosfatidil etanol plazmalogen (slika 1) i fosfatidil serin plazmalogen. Prirodni su plazmalogeni lijevi oblici. Plazmalogeni bez dušične baze nisu nađeni u biljnim lipidima (152).

b) Glicerolipidi bez fosfora: monogalaktozil diglicerid, digalaktozil diglicerid, sulfolipid.

Struktura glicerolipida bez fosfora prikazana je na slici 2.

Glicerolipidi bez fosfora razlikuju se od glicerofosfolipida po tome što se u  $\alpha$ -položaju glicerola ne nalaze fosforilirani spojevi nego ugljikohidratni ostatak, pa se zbog toga veoma često nazivaju »glikolipidima«. Od ugljikohidratnih ostataka najčešći je galaktozin, pa su na slici 2 i prikazani derivati galaktoze. Od masnih su kiselina uglavnom zastupljene palmitinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina (17).

Lipidi koji u molekuli sadrže sumpor, nađeni su i u biljnom i u životinjskom svijetu. U životinjskim se lipidima sa sumporom sumpor nalazi u obliku sulfatnog estera, a u biljnim u obliku sulfonske kiseline (vez —C—S—) (17).

Biljni sulfolipid pripada podskupini polarnih lipida glicerolipida bez fosfora. U njegovoj molekuli je u  $\alpha$ -položaju glicerola vezana  $\alpha$ -D-glukoza (preko glikozidne skupine) na čijem se šestom ugljikovu atomu nalazi sumpor u obliku sulfonske skupine.

U nazivlju glicerolipida bez fosfora nema razmimoilaženja. Osim spomenutih naziva katkada se alternativno primjenjuje i međunarodno ženevsko nazivlje:

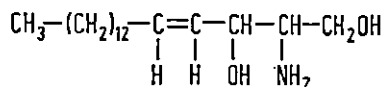
monogalaktozil diglicerid ili 2,3-diacil-1- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glicerol;

digalaktozil diglicerid ili 2,3-diacil-1- $\alpha$ -D-galaktopiranozil-1,6- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glicerol;

sulfolipid ili 6-sulfo-6-deoksi- $\alpha$ -D-glukopiranozil-2,3-diacil-glicerol.

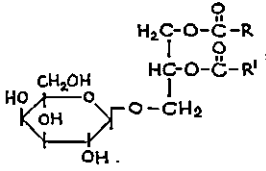
## 2. Sfingolipidi

Sfingolipidi sadrže u svojoj molekuli dugolančane baze, kao što su dvovalentni nezasićeni alkohol sfingozin ili srodan spoj, npr. amid masne kiseline (116, 136).

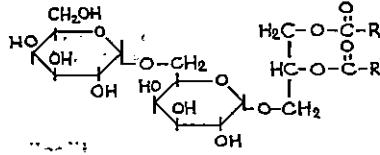


sfingozin

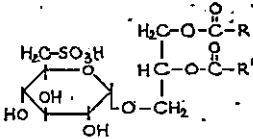
## GLICEROLIPIDI BEZ FOSFORA



MONOGALAKTOZIL DIGLICERID

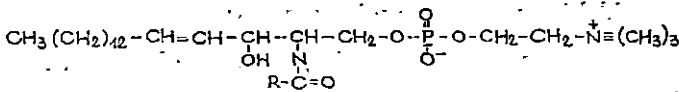


DIGALAKTOZIL DIGLICERID

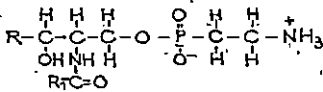


SULFOLIPID

## SFINGOFOSFOLIPIDI

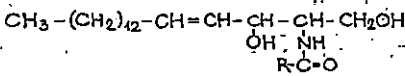


SFINGOMIELIN

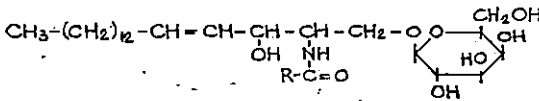


CERAMID AMINO-ETIL-FOSFONAT

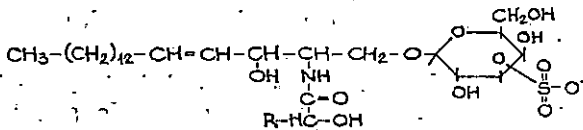
## SFINGOLIPIDI BEZ FOSFORA



CERAMID



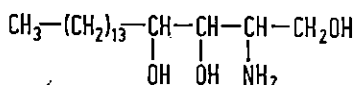
CEREBROZID



SULFATID

SLIKA 2 GLICEROLIPIDI I SFINGOLIPIDI

Drukčije se dušične baze nalaze u biljnim, a drukčije u životinjskim sfingolipidima. Biljke imaju srodne baze sfingozinu, nazvane fitosfingozin (1, 116).



fitosfingozin

Ta je skupina polarnih lipida podijeljena na:

- a) sfingofosfolipide: sfingomielin, ceramid amino etil fosfonat.
- b) Sfingolipide bez fosfora: ceramid, cerebrozidi, sulfatidi, gangliozidi.

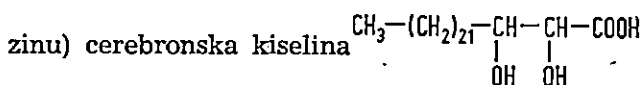
Struktura sfingolipida prikazana je na slici 2.

Najjednostavniji je sfingolipid ceramid pa se može smatrati matičnom tvari sfingolipida. Ostali su sfingolipidi složeniji derivati ceramida. U ceramidu i njegovim derivatima nalazi se ostatak masnih kiselina

$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$  vezan amidskim vezom s aminskom skupinom sfingozina (152).

Drugim riječima ceramid je spoj sfingozina i masne kiseline vezane kiselinsko-amidskim vezom.

Hidrolizom jednog mola cerebrozida oslobađa se jedan mol sfingozina, jedan mol monosaharida (najčešće galaktoze, a katkada i glukoze) i jedan mol masne kiseline. Ako se promatra cerebrozid kao derivat ceramida, vidi se da je na primarnoj alkoholnoj skupini ceramida glikozidno vezana molekula monosaharida. Od masnih kiselina nazočne su zasićene, nezasićene i hidroksi kiseline. Tako se u cerebrozidu kerasinu nalazi lignocerinska kiselina  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$ , u cerebronu (frenozinu) cerebronska kiselina



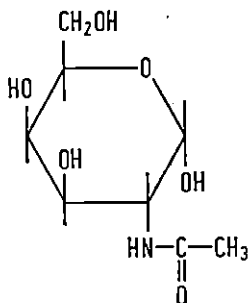
u nervonu nervonska kiselina  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$ , a u oksinervonu oksinervonska kiselina  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$  (101).

Sulfatidi su, zapravo, cerebrozidi koji na monosaharidu imaju sulfatnu skupinu vezanu esterskim vezom (vez  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ ). Za sulfatide je značajno, da se nalaze samo u lipidima životinjskog tkiva.

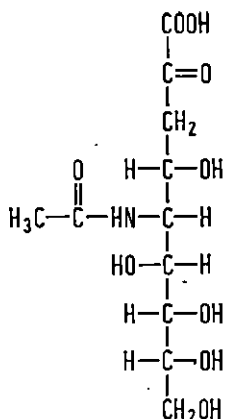
Gangliozidi su najsloženiji lipidni spojevi. Njihove su molekule izgrađene od nekoliko molekula monosaharida, jedne molekule N-acetil galaktozamina i barem jedne molekule sialne kiseline (152).

Od ceramidskih se derivata u literaturi (116) spominju i ceramid disaharidi pod imenom citozidi i globozidi. Njihove molekule sadrže osim ceramida tri ili četiri saharidna ostatka i heksozamin, ali nemaju sialnu kiselinu.

Sfingomielin je sastavljen od nezasićenog dvovalentnog amino alkohola sfingozina, masne kiseline i fosforiliranog holina. I u molekuli



N-acetil galaktozamin



sialna kiselina  
(N-acetil neuraminska kiselina)

sfingomielina i u molekuli ceramida, kiselinski je ostatak  $R-C=O$  amidski vezan na sfingozinsku aaminsku skupinu.

Ceramid amino etil fosfonat je prvi izolirani fosfolipid sa  $C-P$  vezom. Izoliran je iz *Sea anemonae* (116).

Jedan se dio polarnih lipida prirodnih tkiva nalazi povezan s bjelančevinama u složenim spojevima proteolipidima. Proteolipidi nisu topljivi u vodi nego u organskim otapalima (1, 152).

Često se proteolipidi zamjenjuju s lipoproteinima. Lipoproteini su bjelančevine, izgrađene od bjelančevinskog dijela, koji je povezan s nekom lipidnom komponentom, a razlikuju se od proteolipida po tome što su topljivi u vodi (152).

## 5 Izdvajanje lipida iz biomaterijala — Isolation of lipids from biomaterial

Jedna je od najvećih teškoća u istraživanju lipida izdvajanje ukupnih lipida i njihovo rastavljanje na pojedinačne komponente (55).

S obzirom na činjenicu da skupni naziv lipidi obuhvaća velik broj organskih spojeva slične topljivosti, ali različite kemijske građe, uspješna analiza lipida prvenstveno zavisi o potpunoj ekstrakciji lipida i uklanjanju nelipidnih sastojaka, koji su nazočni u svakom ekstraktu.

### 5.1 Ekstrakcijski postupak — Extraction method

Relativno velik dio lipida u biomaterijalu vezan je s bjelančevinama u obliku kompleksnih spojeva proteolipida, pa je potrebno te komplekse razgraditi da se oslobode vezane lipidne komponente za ekstrakciju ukupnih lipida. U tu se svrhu upotrebljuju dehidrirana otapala metanol, etanol i aceton koja su toliko polarna da raskinu vez lipid-bjelančevina (2, 55) i denaturiraju bjelančevine (121).

Budući da većina lipida nije topljiva u polarnim otapalima metanolu i acetonu, potrebno je tim otapalima dodati nepolarnih otapala, kao što su petroleter, dietil eter i kloroform (2, 55).

Ekstrakcija se lipida može obaviti vrućim ili hladnim otapalima. »Hladnom ekstrakcijom«, tj. na sobnoj temperaturi, izbjeći će se oksidacija i razgradnja nekih lipidnih sastojaka. Osim toga, tijekom ekstrakcije na višoj temperaturi povećava se djelovanje lipolitičkih enzima (55). Ekstrakcija na temperaturama, nižim od 20 °C ograničuje topljivost lipida (55).

### 5.2 Izbor sredstva za ekstrakciju lipida — Choice of agent for the extraction of lipids

Petroleter, dietil eter (u daljnjem tekstu eter), kloroform, metanol i etanol najpoznatija su i veoma često upotrebljavana sredstva za ekstrakciju lipida (136). Neki autori preporučuju i n-butanol zasićen vodom (94, 137).

Petroleter ne ekstrahira potpuno sve lipidne sastojke, a ekstrahira i dosta nelipidnih tvari. Kloroform je u tom pogledu bolji. Još je bolja smjesa kloroforma i metanola jer ekstrahira gotovo sve lipidne tvari, a nelipidne tvari neznatno (114).

U. Beiss (9) ne preporučuje eter za ekstrakciju lipida, jer se tijekom ekstrakcije mogu razgraditi polarni lipidi (fosfolipidi i glikolipidi). Osim toga to ekstrakcijsko sredstvo ekstrahira manje nelipidnih tvari nego eter. Zbog toga on preporučuje smjesu kloroforma i etanola.

Prednost n-butanola zasićenog vodom pred petroleterom i etanolom je u tome, što on razgrađuje proteolipidske komplekse. No, n-butanol ima manu, što se zbog visokog vrelišta otapala prilikom otparivanja otapala mogu lako oksidirati i polimerizirati linolna i druge nezasićene masne kiseline (94).

Uzevši sve to u obzir, najbolje je ekstrakcijsko sredstvo za kvantitativnu ekstrakciju ukupnih lipida biomaterijala smjesa kloroforma i metanola u volumenskom omjeru 2 : 1, koju danas upotrebljavaju mnogi znanstveni istraživači (5, 27, 28, 30, 34, 35, 44, 50, 53, 56, 64, 69, 72, 75, 76, 80—82, 90, 96—98, 103, 112, 114, 115, 123, 125, 126, 128, 129, 132, 133, 134, 138, 147).

Otapalo (ekstrakcijsko sredstvo) se uklanja destilacijom pod nižim pritiskom (vakuum destilacija) na temperaturi koja ne smije biti viša od 40 °C. Ekstrakt se može upariti do suha ako se tako dobiveni lipidi odmah dalje analiziraju. A ako se ne analiziraju, onda se lipidi čuvaju u hladioniku otopljeni u kloroformu, benzenu, heksanu ili u smjesi kloroforma i metanola (2 : 1 v/v) u atmosferi inertnog plina (dušika) (121).

### 5.3 Uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta — Removal of non-lipid substances from lipid extract

Odavno je poznato da nema takvoga selektivnog ekstrakcijskog sredstva, koje bi ekstrahiralo samo lipide i da svaki lipidni ekstrakt, bilo kako pripremljen sadrži manje ili veće količine nelipidnih tvari, koje su

topljive u vodi. To su slobodne aminske kiseline, bjelančevine, ugljikohidrati, urea i mnoge anorganske tvari. U nekim se slučajima steroli i sterolni esteri smatraju nelipidnim primjesama (55).

Osim što se ti nelipidni sastojci otapaju u organskim otapalima koja se upotrebljavaju za ekstrakciju lipida, njihova nazočnost i količina u lipidnom ekstraktu zavise o topljivosti (miješanju) jednih spojeva u drugima. Fosfolipidi biomaterijala pokazuju veću sposobnost otapanja nelipidnih tvari nego druge lipidne vrste. Tako na primjer, ako se u polarnoj (fosfolipidnoj) frakciji nalazi fosfatidil inozitol, ta polarna lipidna frakcija može sadržavati i do 8% slobodnih ugljikohidrata, dok ih nepolarna frakcija sadrži samo u tragovima (54, 121).

Zbog toga je prije daljnjih analitičkih istraživanja lipida potrebno odstraniti te nelipidne tvari iz lipidnog ekstrakta.

G. B. Ansell (2) spominje nekoliko načina za uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta: dijaliza vodene lipidne emulzije, propuštanje lipidnog ekstrakta preko stupca celuloze, Folchov postupak pranja vodenom otopinom soli, a u novije se vrijeme primjenjuje propuštanje lipidnog ekstrakta preko stupca »Sephadex« (118, 129, 131, 151).

Dijalizom se uklanjaju dušični i fosfori spojevi. Kromatografijom na stupcu praškaste celuloze odstranjuju se slobodne aminske kiseline, ali na tom stupcu ostaju adsorbirani fosfatidil inozitoli (2, 55).

Iako neki istraživači uklanjaju nelipidne tvari iz lipidnog ekstrakta pranjem ekstrakta vodom (64, 89, 132, 133) danas se najčešće primjenjuje Folchov postupak (56, 75, 81, 82, 96, 103, 105, 148) i misli se da je najpouzdaniji za ukljanjanje svih prije spomenutih nelipidnih tvari (55).

J. Folch i suradnici (43) objavili su 1951. godine postupak za uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta. Taj se postupak sastoji u tome da se kloroform-metanolni (2 : 1, v/v) ekstrakt lipida pomiješa s vodom i ostavi nekoliko sati na miru. Polagana difuzija metanola dopušta mehaničko miješanje i pomaže uklanjanje nelipidnih primjesa. Budući da se takvim postupkom gubi oko 1% lipida, Folch je sa svojim suradnicima (44) šest godina kasnije objavio novi postupak za uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta. U tom se postupku umjesto vodom kloroform-metanolski lipidni ekstrakt (ili lipidi naknadno otopljeni u smjesi kloroforma i metanola u volumenskom omjeru 2 : 1) promućkaju razrijeđenim vodenim otopinama mineralnih soli natrija, kalija, kalcija ili magnezija (0,58% NaCl, 0,74% KCl, 0,04% CaCl<sub>2</sub> i 0,034% MgCl<sub>2</sub>). Lipidnom se ekstraktu doda volumen otopine soli koji je 20% od volumena ekstrakta, tj. toliko da volumenski omjer kloroform : metanol : otopina soli bude 8 : 4 : 3. Nakon razdvajanja u početku nastale emulzije, u gornjoj se metanolsko-vodenoj fazi nalaze nelipidne primjese, a u donjoj kloroformnoj fazi lipidi. Gubitak lipida, tj. njihov prijelaz u metanolsko-vodenu fazu sprečavaju kationi otopljenih anorganskih soli, koji smanjuju disocijaciju kiselih lipida (glicerol fosfolipida), pa lipidi ostaju u donjoj kloroformnoj fazi, a soli kvantitativno u gornjoj metanolno-vodenoj fazi.



## 6. Analitički postupci za određivanje konstitucije lipida — *Analytical methods for determining the constitution of lipids*

Do danas nema jedinstvenoga analitičkog postupka za kvantitativno određivanje individualnih sastojaka prirodnih lipida.

### 6.1 Klasični analitički postupci — *Classic analytical methods*

1. Određivanje analitičkih konstanata (brojeva) (40, 77),
2. Određivanje slobodnih masnih kiselina i neutralne masti (77),
3. Određivanje ukupnih masnih kiselina (77),
4. Određivanje neosapunjivih tvari (77): a) glicerola, b) sterola, c) ugljikovodika,
5. Određivanje lecitina (fosfolipida) (77) na temelju kvantitativnog određivanja fosfora.

Analitičke konstante ili karakteristični kemijski brojevi karakteristični su za pojedine skupine masnih kiselina, pa su na temelju toga i podijeljeni u pet skupina:

1. brojevi, koji se odnose na sve masne kiseline (kiselinski broj, broj osapunjenja, esterski broj);
2. brojevi, koji se odnose na niže masne kiseline ( $C_4$ — $C_{10}$ ) (*Reichert-Meisselov* broj, broj *Polenske*, broj A, broj B, ukupni broj nižih masnih kiselina, broj maslačne kiseline i broj ostatka);
3. brojevi za nezasićene masne kiseline (jodni broj, rodanski broj, dienski broj, broj hidriranja i termo broj);
4. brojevi za oksimasne kiseline (acetilni broj i hidroksilni broj);
5. broj za keto kiseline (karbonilni broj).

Ti brojevi su analitičke konstante, ali daju samo grubu sliku o nazočnosti određenih masnih kiselina.

Prirodni su lipidi heterogene smjese pa se primjenom samo klasičnih analitičkih postupaka ne mogu dobiti zadovoljavajući rezultati kvantitativnih omjera pojedinih lipidnih sastojaka.

Noviji se analitički postupci zasnivaju na razdvajanju lipidnih smjesa na polarne i nepolarne lipidne frakcije, a nakon toga se svaka frakcija odvojeno analizira određujući pojedinačne komponente.

Razdvajanje lipidnih smjesa obavlja se obradom acetonom (72, 78, 85, 90, 95, 96, 147, 150), protustrujnom razdiobom (46, 47, 55, 147) i kromatografskim postupcima.

### 6.2 Obrada acetonom — *Treatment with acetone*

S obzirom na činjenicu da su fosfolipidi slabo topljivi u acetonu, a nepolarni (neutralni) lipidi dobro, obradom lipidnog ekstrakta viškom acetona na niskim temperaturama ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) moguće je iz lipidne smjese odvojiti istaložene fosfolipide. Odvajanje, međutim, ni na tako niskim temperaturama nije potpuno jer jedan manji dio fosfolipida ostaje otopljen u acetonu. Dodatkom anorganskih soli, kao što je magnezijski klorid

pospješuje se kvantitativno taloženje fosfolipida (95), ali kvantitativni rezultati nisu točni jer u talogu fosfolipida zaostaje i magnezijски klorid. Budući da su glicerolipidi bez fosfora, glikolipidi topljivi u acetonu, obradom acetonom odvoje se iz lipidne smjese samo fosfolipidi, a ne svi polarni lipidi.

### 6.3 Protustrujna razdioba — Countercurrent distribution

Princip je protustrujne razdiobe mnogokratna ekstrakcija. Volumeni jedne faze otapala napredujući u jednom smjeru dolaze u ravnotežu s drugom fazom otapala koja napreduje u obratnom smjeru. Zavisno o koeficijentu razdiobe i volumenu otapala, komponente rastopljene u jednoj fazi mogu se razdijeliti (prijeći) u jednu ili drugu fazu nemiješajućih otapala. Ta tehnika zahtijeva relativno velike količine materijala (lipidne smjese) i veliki broj prijenosa.

### 6.4 Kromatografija na stupcu — Column chromatography

Kromatografijom na stupcu adsorbensa, a osobito na stupcu silika-gela, mogu se lipidne smjese djelotvorno rastaviti na polarnu i nepolarnu lipidnu frakciju. Nanošenjem otopine lipidne smjese u kloroformu ili eteru na stupac silika-gela i pranjem stupca istim otapalom, eluiraju se nepolarni lipidi, a nakon toga se jače adsorbirani polarni lipidi eluiraju polarnim otapalom metanolom.

Velik broj autora metanolni eluat naziva fosfolipidnom frakcijom (27, 106, 109, 124, 149), dok *Stevan-Huston* (137) i *Sun-Horocks* (138) primjenjuju točan naziv polarni lipidi, jer se metanolom eluiraju svi polarni lipidi (»fosfolipidi« i »glikolipidi«).

*Shaw* (128, 129) i *Rouser* sa suradnicima (117) razdvajaju lipidne smjese na tri frakcije kromatografijom na stupcu silika-gela. Prva frakcija su nepolarni lipidi (kloroformni eluat), druga frakcija su glikolipidi (acetonski eluat), a treća su fosfolipidi (metanolni eluat).

Prosječno se nanosi 10 mg lipidne smjese na jedan gram silika-gela. Vanjski je promjer stupca (unutarnji promjer staklene cijevi, tj. kolone) najčešće 1 do 2,0 cm. Za 100 mg lipidne smjese potrebno je približno 70 ml eluenta. Brzina protoka eluata 1—2 ml u minuti.

Katkada se kromatografija na stupcu primjenjuje za razdvajanje lipidnih smjesa u više frakcija (15, 32, 76, 153). To se postiže postepenim mijenjanjem polarnosti eluenta. Kao primjer neka posluži postupak *D. R. Boday* i suradnika (15):

Frakcija 1. heksan	eluirea ugljikovodike
Frakcija 2. 15% benzena u heksanu	eluirea sterol-estere
Frakcija 3. 5% etera u heksanu	eluirea trigliceride i slobodne masne kiseline
Frakcija 4. kloroform	eluirea mono-, digliceride i slobodne sterole
Frakcija 5. metanol	eluirea fosfolipide

Nakon kromatografskog razdvajanja lipidne smjese na stupcu silika-gela svaka se lipidna frakcija može dalje analizirati tako, da se nakon hidrolitičke razgradnje odrede masne kiseline ili se svaka frakcija rastavlja na pojedinačne komponente kromatografijom na tankom sloju adsorbenta.

### 6.5 Kromatografija na tankom sloju — *Thin-layer chromatography*

Kromatografija na tankom sloju adsorbenta je novija analitička kromatografska tehnika. Prvi istraživači koji su uveli u analizu razdvajanje na tankom sloju adsorbenta (aluminijskog oksida), bili su *Izmailov* i *Shraiber*. Oni su 1938. godine objavili svoja istraživanja pod naslovom »*Primjena analize kromatografije kapi u farmaciji*: (65), ali je kromatografija na tankom sloju općenito prihvaćena i našla pravu primjenu istom 1958. godine i otada se na veliko primjenjuje u analitičkim istraživanjima (14, 87, 136).

U kromatografiji na tankom sloju adsorbenta najčešće se upotrebljavaju adsorbenti silika-gel, aluminijev oksid, dijatomejska zemlja i praškasta celuloza.

U istraživanjima lipida kromatografija na tankom sloju adsorbenta našla je svoju potpunu primjenu pa je u velikom broju slučajeva potpuna konstitucijska analiza neke lipidne smjese skoro nemoguća bez te analitičke tehnike.

Prednosti kromatografije na tankom sloju adsorbenta pred kromatografijom na stupcu i na papiru jesu:

1. bolje rastavljanje analizirane smjese na pojedinačne sastojke;
2. brzo razvijanje kromatograma;
3. potrebne količine uzorka za analizu su veoma male (najčešće 0,1 mg analizirane smjese za jednu mrlju na kromatogramu).

### 7. Analitički postupci za određivanje masnih kiselina — *Analytical methods for determining fatty acids*

Analitički se postupci za kvalitativno i kvantitativno određivanje masnih kiselina mogu danas s punim pravom podijeliti na kemijske (u širem smislu) i kromatografske postupke.

#### 7.1 Kemijski postupci — *Chemical methods*

Kemijski postupci za određivanje masnih kiselina obuhvaćaju:

7.11 *Određivanje analitičkih konstanta — Determination of analytical constants* (6.1)

7.12 *Određivanje slobodnih masnih kiselina — Determination of free fatty acids*

Mučkanjem eterske otopine lipida 0,5 N vodenom otopinom kalijskog hidroksida odvoje se sapuni slobodnih masnih kiselina, a iz njih se masne kiseline oslobode sumpornom kiselinom. Oslobođene se masne kiseline ekstrahiraju eterom te nakon otparivanja otapala i sušenja izvažu (94).

### 7.13 *Određivanje ukupnih masnih kiselina — Determination of total fatty acids*

Lipidi se saponificiraju alkoholnom otopinom lužine (KOH), a iz nastalih se sapuna ukupne masne kiseline oslobode solnom ili sumpornom kiselinom. Tako oslobodene masne kiseline ekstrahiraju se eterom ili petroleterom, pa nakon otparivanja otapala osuše i izvažu.

### 7.14 *Odvajanje hlapljivih masnih kiselina od nehlapljivih — Separation of volatile fatty acids from non-volatile ones*

Ako istraživani lipidi sadrže hlapljive masne kiseline ( $C_4$ — $C_{10}$ ), kao na primjer mliječni lipidi, potrebno je hlapljive masne kiseline odvojiti od nehlapljivih i onda odrediti njihove količine. Hlapljive se masne kiseline odvajaju od nehlapljivih destilacijom hlapljivih masnih kiselina strujom vodene pare (40, 61).

### 7.15 *Rastavljanje nehlapljivih zasićenih masnih kiselina od nezasićenih — Separation of non-volatile saturated fatty acids from unsaturated fatty acids*

Smjesa nehlapljivih, tj. viših masnih kiselina (više od  $C_{10}$ ) rastavlja se na zasićene i nezasićene masne kiseline jednim od slijedećih postupaka:

#### 7.151 *Taloženje olovnim solima — Precipitation with lead salts* (26, 40, 60, 152)

Obradom alkoholne otopine masnih kiselina alkoholnom otopinom olovnog acetata iskristaliziraju olovne soli zasićenih masnih kiselina koje se uklone filtriranjem, a nezasićene se dobiju otparivanjem otapala iz filtrata. Taj se postupak može primijeniti samo onda ako smjesa masnih kiselina sadrži pretežno palmitinsku kiselinu i ako ne sadrži veće količine linolne i linolenske kiseline. U tom slučaju postoji opasnost oksidacijskih promjena polinezasićenih kiselina tijekom oslobađanja masnih kiselina iz njihovih olovnih soli.

#### 7.152 *Taloženje litijevim solima — Precipitation with lithium salts* (26, 60)

Litijske soli polinezasićenih kiselina dugih lanaca topljive su u 95% -tnom acetonu. Taj se postupak primjenjuje ako su u smjesi masnih kiselina nazočne polinezasićene masne kiseline s više od osamnaest ugljikovih atoma u lancu kao u ribljim uljima.

#### 7.153 *Tvorba urea-kompleksa — Urea complex formation* (26, 60)

Urea tvori sa svim ravnolančanim masnim kiselinama komplekse, adukte ili klatrate, zavisno od vrste masnih kiselina. Obradom smjese masnih kiselina metanolnom ili vodenom otopinom uree najprije iskristaliziraju urea-kompleksi zasićenih masnih kiselina, zatim urea-kompleksi

oleinske i na kraju urea-kompleksi polinezasićenih masnih kiselina. Oslobođanje je masnih kiselina iz urea-kompleksa veoma jednostavno, jer se raspadaju samim grijanjem u višku vode.

#### 7.154 *Bertramov postupak — Bertram's method* (11, 77)

Oksidacijom nezasićenih masnih kiselina (najčešće s  $\text{KMnO}_4$ ) nastaju dihidroksi kiseline, koje su netopljive u petroleteru, pa se tako mogu odvojiti od zasićenih iz smjese masnih kiselina.

#### 7.155 *Frakcijska kristalizacija — Fractional crystallization* (26, 40, 55, 61)

Postupak frakcijske kristalizacije masnih kiselina na niskim temperaturama ( $-50^\circ\text{C}$  i niže) veoma je jednostavan i praktičan postupak, a često se primjenjuje za rastavljanje zasićenih od nezasićenih masnih kiselina. Zasićene su masne kiseline slabije topljive od nezasićenih u nekim organskim otapalima (acetonu, petroleteru), pa se hlađenjem istalože.

Obradom smjese masnih kiselina acetonom rastavljaju se linolna, linolenska i polinezasićene masne kiseline od oleinske i zasićenih, a obradom eterom rastavlja se oleinska od zasićenih masnih kiselina.

#### 7.16 *Određivanje masnih kiselina frakcijskom destilacijom njihovih estera* *Determination of fatty acids through fractional distillation of their esters* (40)

Nakon rastavljanja smjese masnih kiselina na zasićene i nezasićene masne kiseline jednim od spomenutih postupaka: (7.151 — 7.155) u svakoj se frakciji masne kiseline esterificiraju metanolom uz 1% sumporne kiseline, koja djeluje katalitski. Dobiveni se metilni esteri frakcijski destiliraju pod sniženim pritiskom.

U izdvojenim se frakcijama metilnih estera odredi jedni broj i ekvivalent saponifikacije i na osnovi toga odredi se sastav dotične frakcije.

#### 7.17 *Određivanje nezasićenih masnih kiselina alkalnom izomerizacijom* *Determination of unsaturated fatty acids through alkali isomerization* (41, 55)

Zasićeni su alifatski spojevi bezbojni, osim u dalekom UV-području. Nazočnost je dvostrukog veza uzrokom selektivnoj apsorpciji u odgovarajućem valnom području. Budući da konjugirani sistemi, za razliku od nekonjugiranih, daju osjetljive apsorpcijske maksimume u lako pristupačnom ultravioletnom području, koji su dovoljno specifični da bi se mogli primijeniti za određivanje polinezasićenih masnih kiselina, potrebno je smjesu masnih kiselina prevesti u konjugirane sisteme i nakon toga obaviti spektrofotometrijsko mjerenje. Izomerizacija nezasićenih masnih kiselina obavlja se grijanjem smjese masnih kiselina alkalnim reagensom (obično glicerolnom ili glikolnom otopinom kalijskog hidroksida), po čemu je čitav postupak i dobio stručni naziv.

Taj se postupak upotrebljuje za određivanje polinezasićenih masnih kiselina od dien do pentaen cis-kiselina. Nazočnost trans-kiselina, pigmentata i konjugiranih masnih kiselina u istraživanom uzorku onemogućuju primjenu tog postupka.

Pojedine masne kiseline, koje se izluče iz smjese nekim od spomenutih postupaka, identificiraju se određivanjem kiselinskog broja, jedinog broja, infracrvenog i ultraljubičastog spektra, tališta, pripravom nekih karakterizacijskih derivata, a katkada i elementarnom analizom.

Zbog jednostavnijeg prikaza analitičkih postupaka za određivanje masnih kiselina, u »kemijskim postupcima« obuhvaćene su destilacija vodenom parom i frakcijska kristalizacija, koje se često kombiniraju s drugim kemijskim postupcima u analizi masnih kiselina, pa bi se mogle svrstati u »kemijske postupke u širem smislu«.

Razdvajanje i određivanje pojedinih masnih kiselina iz njihove smjese kemijskim postupcima vrlo je težak i gotovo neostvarljiv posao.

U tu se svrhu danas najčešće upotrebljuju kromatografski postupci, koji su mnogo djelotvorniji od kemijskih postupaka.

## 7.2 Kromatografski postupci — *Chromatographic methods*

U analitičkim istraživanjima masnih kiselina primjenjuju se svi kromatografski postupci. To su:

- 7.21 kromatografija na stupcu (koloni),
- 7.22 kromatografija na papiru,
- 7.23 kromatografija na tankom sloju adsorbensa,
- 7.24 plinska kromatografija.

Svi se kromatografski postupci osnivaju na micanju pokretne (mobilne) faze (plinovite ili tekuće), koja je u ravnoteži s nepokretnom (stacionarnom) fazom i na razdiobi sastojaka smjese koja se analizira između tih dviju faza.

Kromatografski postupak u kojem je nepokretna faza kruta, a sile djelovanja između nje i analizirane smjese adsorpcijske, naziva se adsorpcijska kromatografija.

Kromatografski postupak, u kojem je nepokretna faza tekućina ili tekućina vezana na krutom nosaču (adsorbentu), naziva se razdjelna kromatografija.

U adsorpcijskoj kromatografiji pokretna je faza nepolarno otapalo, a u razdjelnoj polarno otapalo.

Kada je u razdjelnoj kromatografiji nepokretna faza slabo polarna (hidrofobirani adsorbent), a pokretna je faza hidrofilno otapalo, onda je to razdjelna kromatografija obratnih faza.

### 7.21 Kromatografija na stupcu — *Column chromatography*

Adsorpcijskom kromatografijom na stupcu uglavnom se rastavljaju esteri masnih kiselina (mono-, di- i trigliceridi), a masne kiseline u slobodnom stanju rastavljaju se razdjelnom kromatografijom i razdjelnom kromatografijom obratnih faza na stupcu (koloni) (26).

### Razdjelna kromatografija na stupcu

Taj se postupak zasniva na razdiobi masnih kiselina između dva otapala (faze) koja se međusobno ne miješaju.

To se obavlja puštanjem pokretne (mobilne) faze da teče kroz nepokretnu (stacionarnu) fazu koja je vezana na adsorbent. Nepokretna faza je otapalo u kojemu su komponente analizirane smjese bolje topljive, a eluiraju se velikim volumenima pokretne faze u kojoj su slabije topljive. U eluatu se masne kiseline kvantitativno određuju titracijom lužinom (61).

### Razdjelna kromatografija obratnih faza na stupcu

Razdjelnom se kromatografijom obratnih faza dobivaju bolji rezultati nego razdjelnom kromatografijom. Jedan od boljih takvih postupaka je postupak *Martina* i *Howarda* za razdvajanje dugolančanih zasićenih masnih kiselina ( $C_{12}$ — $C_{24}$ ) (55, 61).

Nepokretna je faza u tom postupku hidrofobirani hyflosuper-cel parama diklor-dimetil silana, a pokretna faza je smjesa vode, metanola i oktana ili smjesa vode, acetona i parafina.

Razdvajanje je masnih kiselina kromatografskim postupcima na stupcu (koloni) ograničeno. Pokazalo se, da je svaki dvostruki vez u nezasićenoj kiselini uzrok eluiranju te kiseline zajedno sa zasićenom kiselinom, koja ima dva ugljikova atoma manje. Tako se oleinska kiselina eluira zajedno s palmitinskom, a linolna s miristinskom kiselinom (55, 61).

### 7.22 Kromatografija na papiru — Paper chromatography

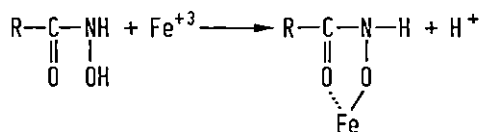
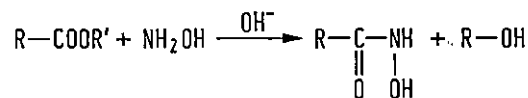
Kromatografija na papiru uglavnom je razdjelna kromatografija obratnih faza. Nepokretna je faza papir za filtriranje, hidrofobiran petrolejskim ugljikovodicima visokog vrelišta, silikonom, parafinskim ili mineralnim uljem. Pokretna je faza polarno otapalo ili smjesa polarnih otapala.

Na papiru za filtriranje koji je impregniran silikonom, a pokretna je faza 70%-tna octena kiselina, dobro se razdvajaju dugolančane zasićene od nezasićenih masnih kiselina (55).

Kad je papir obrađen mineralnim uljem, a pokretna je faza vodena otopina octene kiseline, mogu se rastaviti stearinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina, ali mnogi parovi zasićenih i nezasićenih masnih kiselina ostaju nerastavljeni.

Uočavanje razdvojenih masnih kiselina na kromatogramu obavlja se obradom suhih kromatograma vodenom otopinom olovnog acetata pa sumporovodikom, vodenom otopinom bakrenog acetata pa kalijevim ferocijanidom i parama joda (za nezasićene masne kiseline).

Kromatografija na papiru primjenjuje se i za određivanje estera masnih kiselina, jer oni kvantitativno reagiraju s alkalnom otopinom hidroksilamina. Nastala hidroksilaminska kiselina tvori s feri ionima ( $FeCl_3$ ) plavi helatni kompleks (26).



plavi kompleks

### 7.23 Kromatografija na tankom sloju — *Thin-layer chromatography*

Kromatografijom na tankom sloju adsorbenta uglavnom se određuju metilni esteri masnih kiselina, i to razdjelnim kromatografskim postupkom obratnih faza.

Na silikoniziranom silika-gelu pokretna faza nitrometan-acetonitril-octena kiselina (75/10/10) razdvaja metilne estere masnih kiselina uključivši većinu kritičnih parova.

Pokretna faza eter-petroleter (1 : 9) rastavlja na silika-gelu impregniranom srebrnim nitratom metilne estere masnih kiselina na zasićene, mono-, di- i polinezasićene estere.

Za uočavanje razdvojenih estera najčešće se upotrebljuje univerzalni reagens 2,7-diklor fluorescein. Suhi se razvijeni kromatogrami prskaju etanolnom otopinom reagensa, a mrlje razdvojenih estera otkrivaju se u ultraljubičastom svjetlu (26).

Kromatografskim postupcima na stupcu, papiru i tankom sloju adsorbenta razdvajaju se pojedine vrste masnih kiselina, identificiraju i izdvajaju pojedine komponente. Međutim, tim postupcima se ne mogu odrediti sve masne kiseline prirodnih lipida.

### 7.24 Plinska kromatografija — *Gas chromatography* (34, 42, 62)

Plinska je kromatografija do sada najbolji analitički postupak za kvantitativno određivanje masnih kiselina prirodnih lipida. Tim se postupkom smjesa masnih kiselina, odnosno njihovih estera, jasno i potpuno rastavlja na pojedinačne sastojke, što nije moguće niti jednim drugim kemijskim ili fizikalnim postupkom.

Plinska kromatografija je kromatografski postupak, u kojemu je pokretna (mobilna) faza plin.

Rastavljanje komponenata plinskih smjesa postupkom plinske kromatografije obavlja se u kromatografskim kolonama na dva načina:

a) diferencijalnom adsorpcijom na krutom adsorbentu (plinska adsorpcijska kromatografija; *Gas-Solid-Chromatography* GSC);

b) diferencijalnim otapanjem ili razdjeljivanjem u odgovarajućoj tekućini (plinska tekućinsko-razdjelna kromatografija; *Gas-Liquid-Partition-Chromatography* GLC).



Iako je tekućinsko-razdjelna plinska kromatografija noviji postupak od adsorpcijske plinske kromatografije, našla je veću primjenu u istraživanjima zbog sustavnog rada velikog broja istraživača, osobito posljednjih dvadeset godina.

I u adsorpcijskoj i u razdjelnoj plinskoj kromatografiji mogu se primijeniti sva tri poznata kromatografska postupka razdvajanja: frontalna analiza, istiskivanje i eluiranje (ispiranje).

U frontalnoj se analizi smjesa kontinuirano propušta kroz kromatografsku kolonu. Jače adsorbirani ili apsorbirani sastojci ostaju u koloni dulje, a oni koji se slabo adsorbiraju, putuju brže pa izlaze iz kolone razdvojeni. Postupno izlaze iz kolone i ostali sastojci, ali nepotpuno međusobno razdvojeni, a na kraju izlazi smjesa izvornog sastava.

Postupak istiskivanjem zasniva se na istiskivanju selektivno sorbiranih sastojaka smjese plinom veće sorpcijske moći od one sastojaka uzorka.

Oba postupka — frontalna analiza i istiskivanje — ne dolaze u obzir kao analitički postupci. Oni se uspješno primjenjuju u preparativne svrhe za koncentriranje jednog sastojka iz smjese i za uklanjanje malih količina nečistoća.

Eluiranje ili ispiranje najviše se primjenjuje u plinskoj kromatografiji jer se kolona neprekidno obnavlja inertnim plinom nositeljem. Svi se sastojci mogu potpuno razdvojiti, a pomiješani su samo s inertnim plinom, što olakšava kvantitativno određivanje, a i vrijeme analize je kratko.

U postupku eluiranja određena količina istraživane smjese unosi se strujom inertnog plina nositelja u kromatografsku kolonu. Prolazeći kolonom, smjesa se razdjeljuje između nepokretne (stacionarne) faze i pokretne (mobilne) faze struje plina nositelja. Ako je razlika u sorpciji pojedinih sastojaka dosta velika, onda je i brzina putovanja toliko različita da nastaju razdvojeni slojevi ili vrpce u koloni. Plin nositelj ispire iz kolone pojedine frakcije, koje odijeljene slojevima čistog plina nositelja prolaze kroz uređaj za mjerenje koncentracije (detektor).

### *Obrada kromatografskih podataka*

Za kvalitativnu analizu značajan je podatak vrijeme zadržavanja ili volumen zadržavanja (umnožak vremena zadržavanja i protoka plina). Pod istim radnim uvjetima određuje se vrijeme zadržavanje supstance za baždarenje, pa se prema podacima iz literature odredi nepoznati sastojak.

Kvalitativna se analiza može obaviti tako da se nepoznata rastavljena frakcija analizira kojim drugim fizikalnim ili kemijskim postupkom.

Za kvantitativno određivanje sastojaka analizirane smjese upotrebljuju se visina brijega i površina brijega. Budući da linearna zavisnost visine brijega o koncentraciji sastojaka vrijedi samo za količine uzorka koje su manje od 10  $\mu\text{g}$ , češće se za kvantitativnu interpretaciju kromatografskih podataka koristi površina brijega.

Površina se brijega može izmjeriti planimetriranjem, množenjem visine brijega sa širinom brijega na polovici njegove visine, konstruiranjem trokuta što ga tvore tangente povučene u točkama infleksije brijega, vaganjem izrezanih bregova i automatskim integratorom.

Izračunavanje koncentracije pojedinih sastojaka analizirane smjese mjerenjem površina bregova obavlja se na dva načina.

Jedan je način upotreba baždarne krivulje koja prikazuje omjer koncentracije određivanog sastojka prema površini brijega.

Po drugom načinu površina brijega jedne komponente podijeli se zbrojem površina svih bregova, i koncentracija se komponente izrazi u težinskim postotcima.

### *Određivanje masnih kiselina plinskom kromatografijom*

Primjena plinske kromatografije u kvantitativnoj analizi masnih kiselina počela je 1954. godine. Prvi analitički postupak razradili su *A. T. James* i *A. J. P. Martin* (67). Tim je postupkom razdvojena smjesa masnih kiselina (do  $C_{11}$ ) na koloni stearinske kiseline, koja je bila obrađena silikonskim uljem. Eluirane kiseline su kvantitativno određene titrimetrijski.

Iste su godine *F. R. Cropper* i *A. Heywood* (33) objavili postupak za razdvajanje metilnih estera masnih kiselina od  $C_{12}$  do  $C_{22}$  na silikoniziranom celitu. Razdvojeni metilni esteri masnih kiselina određeni su pomoću diferencijalnog detektora na toplinsku vodljivost.

Danas je općenito prihvaćena plinsko-tekućinska razdjelna kromatografija (GLC) metilnih estera masnih kiselina za kvantitativno određivanje pojedinih masnih kiselina u njihovim prirodnim smjesama (8, 21, 22, 31, 37, 52, 59, 63, 66, 67, 74, 107, 130, 139).

1957. godine *R. K. Berthuis* i *J. G. Keppler* (8) objavili su plinsko-kromatografski postupak za razdvajanje metilnih estera viših zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Tim se postupkom razdvajaju metilni esteri masnih kiselina ( $C_{12}$  do  $C_{20}$ ) na silikoniziranom celitu, na temperaturi 257 °C.

U tekućinskoj razdjelnoj plinskoj kromatografiji za dobro razdvajanje najvažnija je razdjelna tekućina (stacionarna faza). U novije doba (1965—1970.) najčešće se za rastavljanje metilnih estera zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (od  $C_4$  dalje) upotrebljuje etilenglikolni ester jantarne kiseline (etilenglikol sukcinat) na krutom nosaču kromosorbu, različitih granulacija (21, 52, 74, 107, 139).

Velik je napredak u plinsko-tekućinskoj razdjelnoj kromatografiji metilnih estera masnih kiselina učinjen primjenom plameno-ionizacijskog detektora za mjerenje plinovitih tvari na izlasku iz kromatografske kolone. Taj je detektor prvi put opisao *J. E. Lovelock* (84) 1958. godine.

Plameno-ionizacijski detektor je oko 100 puta osjetljiviji od detektora na toplinsku vodljivost. Njegova relativna neosjetljivost na temperaturu i promjene brzine prolaza plina nositelja učinili su plinsku kromatografiju gotovo idealnim postupkom za kvantitativno određivanje masnih kiselina. Gotovo svi današnji uređaji plinske kromatografije imaju plameno-ionizacijski detektor.

## II. EKSPERIMENTALNI DIO — EXPERIMENTAL

### 8. Izbor gljiva za istraživanja — Choice of mushrooms for investigations

Za istraživanja su izabrane slijedeće gljive užeg i šireg zagrebačkog područja:

A. Jestive gljive	Nalazište
blagva ( <i>Amanita caesarea</i> ) Quel.	Velika Gorica (Zagreb)
pečurka ( <i>Agaricus bisporus</i> ) Lange	Horvati (Zagreb)
velika sunčanica ( <i>Macrolepiota procera</i> ) Sing.	Zlatar (Hrvatsko Zagorje)
kostanjevčica ( <i>Tricholoma conglobatum</i> ) Vitt.	Stubica (Hrvatsko Zagorje)
grmačica ( <i>Clytocybe tabescens</i> ) Scop.	Kraljevec (Zagreb)
zlatnožuta griva ( <i>Clavaria aurea</i> ) Fr.	Markuševac (Zagreb)
vrganj ( <i>Boletus edulis</i> ) Bull.	Kraljevec (Zagreb)
turčin ( <i>Leccinum aurantium</i> ) Bull.	Zlatar (Hrvatsko Zagorje)
B. Otrovne gljive	Nalazište
zelena pupavka ( <i>Amanita phalloides</i> ) Fr.	Duga Resa
žučkasta pupavka ( <i>Amanita citrina</i> ) Gray	Medvednica (Zagreb)
panterovka ( <i>Amanita pantherina</i> ) Quel.	Duga Resa
muhara ( <i>Amanita muscaria</i> ) Hooke	Velika Gorica (Zagreb)
brezovka ( <i>Lactarius torminosus</i> ) Fr. ex Schäff.	Duga Resa
ludara ( <i>Boletus satanas</i> ) Lenz.	Duga Resa

Izabrane gljive za istraživanja brane su u jesen 1968. i 1969. godine.

Od jestivih gljiva izabrane su najpoznatije domaće gljive koje gotovo svake godine rastu u zagrebačkoj okolini, a neke se od njih kao grmačica (*Clytocybe tabescens*), kostanjevčica (*Tricholoma conglobatum*), vrganj (*Boletus edulis*) i blagva (*Amanita caesarea*) prodaju u velikim količinama na zagrebačkim tržnicama.

Grmačica (*Clytocybe tabescens*) je u Zagrebu vrlo cijenjena jestiva gljiva i mnogo je troše. To je zapravo prava zagrebačka gljiva, jer po dosadašnjem znanju nalazi se uglavnom u zagrebačkoj okolini, a nađena je još i u Gorskom Kotaru. Zanimljivo je da tu jestivu gljivu ne spominje nama pristupačna, inozemna stručna literatura, a ni domaća osim knjiga K. Blagaića (13) i M. Urbanija (143).

Budući da na zagrebačkom tržištu nema samonikle jestive gljive pečurke (*Agaricus campestris*), u istraživačke svrhe uzeta je industrijski uzgojena (kultivirana) pečurka (*Agaricus bisporus*) koja se, kad god je ima na tržištu, nalazi na jelovniku zagrebačkih ugostiteljskih poduzeća kao kulinarski specijalitet. Tu je gljivu do prije nekoliko godina industrijski proizvodio »Vrtnarski kombinat Žitnjak« u Zagrebu, a danas je proizvodi privatni proizvođač Đuro Petrović iz Horvata kraj Zagreba. Od njega je i nabavljena.

Prilikom izbora gljiva za istraživanja uzete su u obzir i morfološke značajke gljiva. Sve izabrane gljive, i jestive i otrovne, pripadaju podrazredu *Holobasidiomycetes* i redu *Hymenomycales* (plodničarke), u kojemu se nalaze gotovo sve prave gljive.

Što se tiče otrovnih gljiva, za istraživanja su izabrane najpoznatije, a i one, koje se zbog neupućenosti puka najlakše zamijene s nekom jestivom gljivom. Pri tome se imalo na umu, da izabrane otrovne gljive budu članovi istog roda ili porodice kao i izabrane jestive gljive. Tako je, na primjer, smrtna otrovnica (*Amanita phalloides*) član roda *Amanita* i porodice *Agaricaceae* kao i jestiva blagva (*Amanita caesarea*), a obadvije na osnovi morfoloških značajka pripadaju podredu *Agaricales* (lističarke). U tom se podredu nalaze gotovo sve jestive i otrovne gljive.

Jednako je mjerilo primijenjeno i u izboru gljiva podreda *Boletales* (vrganjevke).

Podjela je izabranih gljiva za istraživanja na osnovi botaničke sistematike prikazana u tabeli 3.

Tab. 3

Razred:	<i>Basidiomycetes</i> — Stapčare
Podrazred:	<i>Holobasidiomycetes</i> — Prave gljive
Red I.	<i>Hymenomycales</i> — Plodničarke
Podred 1:	<i>Agaricales</i> — Lističarke
Porodica:	<i>Agaricaceae</i>
rod:	<i>Amanita</i>
vrsta:	blagva ( <i>Amanita caesarea</i> ) Quel. zelena pupavka ( <i>Amanita phalloides</i> ) Fr. žučkasta pupavka ( <i>Amanita citrina</i> ) Gray panterovka ( <i>Amanita pantherina</i> ) Quel. muhara ( <i>Amanita muscaria</i> ) Hooke
rod:	<i>Agaricus</i>
vrsta:	pečurka ( <i>Agaricus bisporus</i> ) Lange
rod:	<i>Lepiota</i>
vrsta:	velika sunčanica ( <i>Macrolepiota procera</i> ) Sing.
rod:	<i>Tricholoma</i>
vrsta:	kostanjevića ( <i>Tricholoma conglobatum</i> ) Vitt. grmačica ( <i>Clytocibe tabescens</i> ) Scop.
Porodica:	<i>Rusulaceae</i>
rod:	<i>Lactarius</i>
vrsta:	brezovka ( <i>Lactarius torminosus</i> ) Fr. ex Schöff.
Podred 2:	<i>Aphylliphorales</i> — Nelističarke
Porodica:	<i>Clavariaceae</i>
rod:	<i>Clavaria</i>
vrsta:	zlatnožuta griva ( <i>Clavaria aurea</i> ) Fr.
Podred 3:	<i>Boletales</i> — Vrganjevke
Porodica:	<i>Boletaceae</i>
rod:	<i>Boletus</i>
vrsta:	vrganj ( <i>Boletus edulis</i> ) Bull. turčin ( <i>Leccinum aurantium</i> ) Bull. ludara ( <i>Boletus satanas</i> ) Lenz.

## 9. Istraživački dio — Research

Istraživački se dio sastojao od:

- 9.1 *branja gljiva i priprave uzoraka za analizu,*
- 9.2 *određivanja količina vode odnosno suhe tvari,*
- 9.3 *određivanja količina ukupnih lipida:*
  - 9.31 *ekstrakcije ukupnih lipida,*
  - 9.32 *uklanjanja nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta,*
- 9.4 *istraživanja izdvojenih lipida:*
  - 9.41 *određivanja količina nepolarnih i polarnih lipida,*
  - 9.42 *hidrolize nepolarnih i polarnih lipida,*
  - 9.43 *izdvajanja masnih kiselina iz hidrolizata,*
  - 9.44 *određivanja sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom,*
    - 9.441 *priprave metilnih estera masnih kiselina,*
    - 9.442 *plinske kromatografije metilnih estera masnih kiselina.*

### 9.1 *Branje gljiva i priprava uzoraka za analizu — Collection of mushrooms and preparation of samples for analysis*

Zdrave i neoštećene gljive odmah su nakon branja na nalazištu očišćene od čestica tla, pijeska, iglica, ostataka lišća i drugih nečistoća. Istog je dana u svježim gljivama određena količina vode odnosno suhe tvari. Ubrane su gljive izrezane nožem od nerđajućeg čelika na tanke ploške oko 3 mm debljine, razastrte i dva dana sušene na zraku u zračnoj i suhoj prostoriji. Zračno sušeni naresci gljiva sušeni su zatim tri sata u vakuum-sušioniku na 50 °C pod sniženim pritiskom (40 mm Hg).

Tako osušeni uzorci gljiva ohlađeni su u eksikatoru sa silika-gelom, samljeveni u električnom mlinu čekićaru, prosijani kroz standardna sita 0,8 do 0,08\* i spremljeni u smeđe staklene boce s brušenim staklenim čepovima, u kojima su čuvani u laboratoriju do početka analize.

### 9.2 *Određivanje količine vode odnosno suhe tvari — Water and dry matter content determination*

Količine vode i ostalih hlapljivih tvari odnosno suhe tvari određivane su sušenjem uzoraka grijanjem sve dotle, dok se težina uzoraka nije više mijenjala (144).

### 9.3 *Određivanje količina ukupnih lipida — Determination of total lipids*

Određivanje količina ukupnih lipida u uzorcima gljiva sastojalo se od ekstrakcije ukupnih lipida i od uklanjanja nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta.

\* Prüfsieb 0,8—0,08; TGL 4188, VEB Metallweberei, Neustadt — Orla.

### 9.31 Ekstrakcija ukupnih lipida — *Extraction of total lipids*

Ukupni su lipidi ekstrahirani smjesom kloroforma i metanola u volumenskom omjeru 2 : 1 (44, 81, 82, 96).

Na 10 g uzorka gljiva dodano je 170 ml kloroform-metanolne smjese (17 ml po gramu dehidriranog uzorka), ostavljeno preko noći i nastavljena ekstrakcija na električnoj mućkalici tri sata. Nakon filtriranja kroz kvalitativni papir za filtriranje ponovljena je ekstrakcija sa 100 ml kloroform-metanolne smjese, na električnoj mućkalici, i ponovno obavljeno filtriranje. Spojeni su filtrati sušeni bezvodnim natrijskim sulfatom. Iz osušenoga lipidnog ekstrakta natrijski je sulfat uklonjen filtriranjem.

### 9.32 Uklanjanje nelipidnih tvari iz lipidnog ekstrakta — *Removal of non-lipid substances from lipid extract*

Nelipidne su tvari uklanjane iz lipidnog ekstrakta obradom kloroform-metanolnoga lipidnog ekstrakta 0,1 M vodenom otopinom kalij-skog klorida (44, 56, 81, 96, 103, 105, 148). Nakon raslojavanja nastale emulzije nelipidne tvari prijeđu u gornji vodeno-metanolni sloj, a lipidi ostanu u donjem kloroformnom sloju. Prijelaz kiselih polarnih lipida u vodenometanolni sloj sprečavaju kalijjski ioni.

Iz kloroformnoga je sloja otpareno otapalo u rotirajućem vakuum isparivaču na 40 °C. Suhi su lipidi otopljeni u malom volumenu smjese kloroforma, metanola i vode u volumenskom omjeru 16 : 18 : 1 i otapalo je ponovno otpareno. To se ponovilo još dva puta, da se ostaci proteolipida potpuno razgrade. Nakon zadnjeg uparivanja, suhi je lipidni ostatak otopljen u smjesi kloroforma i metanola 1 : 1 (v/v) te filtriran kroz kvantitativni papir za filtriranje (bijelu vrpcu), da se uklone istaložene bjelančevine iz razgrađenih proteolipida.

### 9.4 Istraživanja izdvojenih lipida — *Investigation of isolated lipids*

Istraživanja izdvojenih lipida obuhvatila su:

- određivanje količina nepolarnih i polarnih lipida,
- hidrolizu nepolarnih i polarnih lipida,
- izdvajanje masnih kiselina iz hidrolizata i
- određivanje masnih kiselina plinskom kromatografijom.

### 9.41 Određivanje količina nepolarnih i polarnih lipida — *Determination of content of non-polar and polar lipids*

Ukupni su lipidi rastavljeni na nepolarne i polarne lipide kromatografijom na stupcu silika gela (»Riedel« — Hannover). Oko 300 mg ukupnih lipida otopljeno u što je moguće manje kloroforma nanijeto je na stupac adsorbenta (Ø 15 mm × 350 mm). Nepolarni su lipidi eluirani s 200 ml kloroforma, a polarni s 300 ml metanola. Otapala su iz eluata

uklonjena otparivanjem u rotirajućem vakuum isparivaču, te su nakon sušenja u vakuum sušioniku na 40 °C pod sniženim pritiskom (40 mm Hg) i vaganja dobivene količine nepolarnih i polarnih lipida.

#### 9.42 *Hidroliza nepolarnih i polarnih lipida — Hydrolysis of non-polar and polar lipids*

Hidroliza (saponifikacija) nepolarnih i polarnih lipida obavljena je kuhanjem tih lipida u vodenometanolnoj otopini kalijskog hidroksida uz dodatak nekoliko zrnaca plovučca pod povratnim hladilom dva i po sata. Na jedan gram lipida dodano je 10 ml vodenometanolne otopine kalijskog hidroksida (30 g KOH + 40 ml H<sub>2</sub>O + 30 ml CH<sub>3</sub>OH)\*.

#### 9.43 *Izdvajanje masnih kiselina iz hidrolizata — Isolation of fatty acids from hydrolizate*

Neosapunjive su tvari uklonjene iz hidrolizata ekstrakcijom petrol-eterom. Iz zaostalih alkalijskih sapuna masne su kiseline oslobođene solnom kiselinom, a zatim ekstrahirane petroleterom i eterom.

Petroletersko-eterski ekstrakt masnih kiselina je pran vodom do neutralne reakcije (crveni kongo indikatorski papir) i osušen bezvodnim natrijskim sulfatom, koji je uklonjen filtriranjem.

Nakon otparivanja otapala smjesa masnih kiselina je sušena jedan sat u vakuum sušioniku na 37 °C pod sniženim pritiskom (40 mm Hg) te je nakon hlađenja u eksikatoru izvagana.

#### 9.44 *Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom — Determination of the composition of fatty acids by means of gas chromatography*

Kvantitativni omjer (relativni postoci) masnih kiselina u nepolarnim i polarnim lipidima istraživanih gljiva određen je plinsko-tekućinskom razdjelnom kromatografijom (GLC) metilnih estera masnih kiselina.

Postupak se sastojao od priprave metilnih estera masnih kiselina i plinsko-kromatografske analize tih estera.

#### 9.441 *Priprava metilnih estera masnih kiselina — Preparation of methyl esters of fatty acids*

Metilni su esteri masnih kiselina pripravljeni *Metcalfe-Schmitzovim* postupkom (93), koji se zasniva na reakciji masnih kiselina i metanolne otopine bornog fluorida BF<sub>3</sub>.

U izvaganu smjesu masnih kiselina dodano je 5 ml 12,5%-tne metanolne otopine bornog fluorida (10 ml reagensa na 500 mg masnih kise-

\* Postupak Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

lina), nekoliko zrnaca plovuĉca te je zagrijavano na parnoj kupelji pod povratnim hladilom toliko vremena, da reakcijska smjesa vrije toĉno dvije minute a zatim je odmah tikvica i njezin sadržaj ohlaĉena mlazom tekuće vode.

Nastali su metilni esteri masnih kiselina dvaput ekstrahirani petrol-eterom u lijevku za odjeljivanje. Petroleterski ekstrakti su prani vodom do neutralne reakcije (indikatorski kongo papir ne mijenja boju) i osušeni bezvodnim natrijskim sulfatom koji je uklonjen filtriranjem. Otapalo je iz filtrata uklonjeno otparivanjem u rotirajućem vakuum isparivaĉu na 37 °C.

Suhim je metilnim esterima masnih kiselina nakon uklanjanja petrol-etera dodano nekoliko kapi etera pa su kapilarnom pipetom prenijeti u male konične epruvete, iz kojih je eter uklonjen strujom dušika u vodenoj kupelji od 37 °C. Tragovi su etera uklonjeni sušenjem metilnih estera jedan sat u vakuum sušioniku na 37 °C pod sniženim pritiskom (40 mm Hg). Tako osušeni metilni esteri su u tim malim koničnim epru-vetama, zaĉepljenima gumenim ĉepovima ĉuvani u hladioniku do poĉetka plinsko-kromatografske analize.

#### 9.442 *Plinska kromatografija metilnih estera masnih kiselina — Gas chromatography of methyl esters of fatty acids*

Metilni su esteri masnih kiselina odreĉeni plinsko-tekućinskom raz-  
djelnom kromatografijom na plinskom kromatografu »Perkin-Elmer Va-  
por Refractometer« Model 154 D s plameno-ionizacijskim detektorom.  
Pri tome je primijenjen postupak Zavoda za patofiziologiju Veterinar-  
skog fakulteta u Zagrebu.

Āeliĉna kromatografska kolona duŹine 2 m i unutarnjeg promjera 1/8 inĉa (3,17 mm) napunjena je nepokretnom (stacionarnom) fazom eti-  
lenglikolnim esterom jantarne kiseline, koja je nanijeta na kruti nosaĉ  
Chromosorb GAW-DMCS 80 do 100 mesha u omjeru 20 : 80. Kolona  
se kondicionirala preko noći na 180 °C. Pokretna (mobilna) je faza bio  
plin dušik.

Radni uvjeti kromatografskog odreĉivanja metilnih estera masnih  
kiselina bili su:

- a) temperatura injekcijskog bloka (ureĉaja za unošenje uzoraka)  
bila je 280 °C,
- b) temperatura kromatografske kolone bila je 180 °C,
- c) brzina strujanja dušika, plina nositelja, bila je 30 ml u minuti,
- d) brzina strujanja vodika, koji izgara u struji zraka u mlaznici  
plameno-ionizacijskog detektora bila je 10 ml u minuti.

Uzorcji metilnih estera masnih kiselina unijeti su »Hamilton micro-  
syringe« brizgalicom (štrcaljkom) u injekcijski blok plinskog kroma-  
tografa.

Identifikacija pojedinih metilnih estera masnih kiselina obavljena je  
usporeĉivanjem dobivenih kromatograma s kromatogramima standardnih  
uzoraka metilnih estera masnih kiselina poznatog sastava.



Kvantitativni omjer pojedinih metilnih estera masnih kiselina određen je planimetrijskim mjerenjem površina bregova na kromatogramima i kontroliranjem vrijednostima, koje su dobivene integratorom.

Relativni postoci masnih kiselina dobiveni su množenjem kvocijenta pojedinačnih površina i ukupne površine bregova sa 100.

#### 10. Rezultati istraživanja — Results of the investigations

Rezultati su istraživanja prikazani u pet tabela (Tab. 4—8).

##### Količine vode i suhe tvari u 100 g istraživanih gljiva

Tab. 4

Jestive gljive	U svježim gljivama		U sušenim gljivama	
	voda g	suha tvar g	voda g	suha tvar g
Blagva <i>Amanita caesarea</i>	91,67	8,33	7,25	92,75
Pečurka <i>Agaricus bisporus</i>	89,78	10,22	6,72	93,28
Velika sunčanica <i>Macrolepiota procera</i>	89,79	10,21	9,37	90,63
Kostanjevčica <i>Tricholoma cnoglobatum</i>	89,66	10,34	8,87	91,13
Grmačica <i>Clitocybe tabescens</i>	90,16	9,84	8,46	91,54
Zlatnožuta griva <i>Clavaria aurea</i>	90,56	9,44	8,14	91,86
Vrganj <i>Boletus edulis</i>	88,32	11,68	9,16	90,84
Turčin <i>Leccinum aurantium</i>	91,38	8,62	9,54	90,46
<b>Otrovne gljive</b>				
Zelena pupavka <i>Amanita phalloides</i>	93,10	6,90	8,91	91,09
Žučkasta pupavka <i>Amanita citrina</i>	90,01	9,99	8,86	91,14
Panterovka <i>Amanita pantherina</i>	91,85	8,15	9,75	90,25
Muhara <i>Amanita muscaria</i>	91,07	8,93	9,12	90,88
Brezovka <i>Lactarius torminosus</i>	91,97	8,03	9,56	90,44
Ludara <i>Boletus satanas</i>	90,40	9,60	10,73	89,27

Tab. 5

## UKUPNI, NEPOLARNI I POLARNI LIPIDI U SUHOJ TVARI GLJIVA

JESTIVE GLJIVE	Ukupni %	Nepolarni od ukupnih %	Polarni od ukupnih %	Postotak nepolarnih	Postotak polarnih	Omjer nepolarnih prema polarnim
				u suhoj	tvari	
Blagva <i>Amanita caesarea</i>	8,64	75,80	22,77	6,55	1,97	3,32 : 1
Pečurka <i>Agaricus bisporus</i>	2,89	57,56	40,52	1,66	1,17	1,42 : 1
Velika sunčanica <i>Macrolepiota procera</i>	5,42	61,82	36,10	3,35	1,94	1,78 : 1
Kostanjevčica <i>Tricholoma conglabatum</i>	4,21	49,10	49,12	2,07	2,07	1,00 : 1
Grmačica <i>Clitocybe tabescens</i>	4,48	64,92	34,07	2,91	1,53	1,91 : 1
Zlatnožuta griva <i>Clavaria aurea</i>	5,28	58,34	41,07	3,08	2,17	1,42 : 1
Vrganj <i>Boletus edulis</i>	4,52	54,10	44,92	2,45	2,03	1,20 : 1
Turčin <i>Leccinum aurantium</i>	6,17	70,91	28,20	4,37	1,74	2,51 : 1
<b>OTROVNE GLJIVE</b>						
Zelena pupavka <i>Amanita phalloides</i>	13,46	79,22	20,12	10,66	2,71	3,92 : 1
Žućkasta pupavka <i>Amanita citrina</i>	15,74	79,21	20,10	12,47	3,16	3,94 : 1
Panterovka <i>Amanita pantherina</i>	13,79	83,02	15,96	11,45	2,20	5,24 : 1
Muhara <i>Amanita muscaria</i>	10,41	71,15	28,76	7,41	2,99	2,47 : 1
Brezovka <i>Lactarius torminosus</i>	8,90	76,50	22,34	6,81	1,99	3,42 : 1
Ludara <i>Boletus satanas</i>	6,64	68,02	31,12	4,52	2,06	2,19 : 1

Osim tabela nalaze se i dva kromatograma masnih kiselina (Sl. 3 i 4). To su kromatogrami mekih estera masnih kiselina u nepolarnim i polarnim lipidima samonikle jestive gljive blagve (*Amanita caesarea*). Planimetrijskim mjerenjem površina bregova na kromatogramima određeni su kvantitativni omjeri (relativni postoci) masnih kiselina u nepolarnim i polarnim lipidima (tabela 6, 7). Relativni postoci masnih kiselina u ukupnim lipidima dobiveni su računskim putem (Tab. 8).

## POSTOCI MASNIH KISELINA NEPOLARNIH LIPIDA U GLJIVAMA

Tab. 6

JESTIVE GLJIVE	zasićene masne kiseline ukupno							Nezasiće- ne masne kiseline ukupno								Omjer zasićenih prema ne- zasićenim masnim kiselinama			
		12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0		44:1	16:1	17:1	18:1	18:2	18:3	20:3		20:4	>C20	
Blagva																			
Amanita caesarea	23,46	0,16	0,80	0,20	17,95		4,35	76,56		0,69		55,46	20,41						1: 3,26
Pečurka																			
Agaricus bisporus	24,31	trag	6,74	1,37	10,71		5,49	75,42		0,87		5,94	67,41	1,20					1: 3,10
Velika sunčanica																			
Macrolepiota procera	29,54	0,30	1,35	0,59	24,81		2,49	70,43		4,28	0,66	15,66	49,83						1: 2,38
Kostanjevčica																			
Tricholmma conglobatum	21,64	trag	9,85	trag	10,82		0,97	78,04		0,44		13,94	63,66						1: 3,61
Grmačica																			
Clitocybe tabescens	21,97	1,23	0,94	0,94	17,29		1,57	78,01		5,67		32,25	40,09						1: 3,55
Zlatnožuta griva																			
Clavaria aurea	21,28	0,30	0,70	0,74	16,12		3,42	78,32		0,41		48,10	29,81						1: 3,68
Vrganj																			
Boletus edulis	16,66	trag	0,98	0,50	12,89		2,29	83,22		1,19		24,64	57,39						1: 4,99
Turčin																			
Leccinum aurantium	22,95		0,49	3,18	18,25		1,03	77,04		3,03	0,37	27,55	46,09						1: 3,36
<b>OTROVNE GLJIVE</b>																			
Zelena pupavka																			
Amanita phalloides	28,00		0,32	0,82	23,96		2,90	71,98		1,28		54,06	16,64						1: 2,57
Žučkasta pupavka																			
Amanita citrina	26,57		trag	trag	23,81		2,76	72,72		0,88		53,24	18,60						1: 2,74
Panterovka																			
Amanita pantherina	21,00		trag	trag	12,10		8,90	78,67		0,22		57,84	20,61						1: 3,75
Muhara																			
Amanita muscaria	15,99		0,29	0,45	10,09		5,16	83,98		0,30		70,41	13,27						1: 5,25
Brezovka																			
Lactarius torminosus	39,28	trag	0,39	0,35	53,5		33,16	60,57		0,51		37,95	22,11						1: 1,54
Ludara																			
Boletus satanas	23,78	trag	0,42	1,41	20,94		1,41	76,17		2,47	0,26	25,91	47,52						1: 3,20

POSTOCI MASNIH KISELINA POLARNIH LIPIDA U GLJIVAMA

Tab. 7

JESTIVE GLJIVE	Zasićene masne kiseline ukupno							Nezasiće- ne masne kiseline ukupno								Omjer zasićenih prema ne- zasićenim masnim kiselinama		
		12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0		14:1	16:1	17:1	18:1	18:2	18:3	20:3		20:4	>C20
Blagva <i>Amanita caesarea</i>	18,71	0,50	1,62	0,33	14,02		2,24	81,26		2,04	2,52	39,96	32,82		1,17	2,77		1:4,34
Pečurka <i>Agaricus bisporus</i>	30,99		15,24	1,55	10,21		3,99	68,81		1,14	0,57	3,67	57,74	0,44		2,78	2,47	1:2,22
Velika sunčanica <i>Macrolepiota procera</i>	31,26		2,45	0,49	26,85		1,47	68,72		10,23	6,55	13,18	35,49			3,27		1:2,2
Kostanjevčica <i>Tricholoma conglobatum</i>	24,27		6,55	0,43	15,87		1,42	75,70		0,42	0,74	3,91	67,23			3,40		1:3,12
Grmačica <i>Clitocybe tabescens</i>	19,91	1,50	1,20	0,90	15,26		1,05	80,06		3,15	4,06	33,83	34,51			4,51		1:4,02
Zlatnožuta griva <i>Clavaria aurea</i>	31,94		0,79	1,27	26,57	1,02	2,29	68,06		2,03	1,95	23,41	40,67					1:2,13
Vrganj <i>Boletus edulis</i>	18,57	0,47	1,07	0,59	15,49		0,95	81,37		0,95		12,53	62,05			5,84		1:4,38
Turčin <i>Leccinum aurantium</i>	22,11		0,80	2,83	16,78		1,70	77,85		3,34	2,25	24,31	42,08			5,87		1:3,52
OTROVNE GLJIVE																		
Zelena pupavka <i>Amanita phalloides</i>	30,56		4,46	0,68	22,98		2,44	69,40		3,82	10,99	4,88	32,76	12,83		4,12		1:2,27
Zučkasta pupavka <i>Amanita citrina</i>	35,93		5,44	1,09	24,50		4,90	64,04		1,36	9,80	2,04	32,67	12,39		5,78		1:1,81
Panterovka <i>Amanita pantherina</i>	20,64		5,16	0,41	9,03		6,04	79,34		2,48	1,44	43,98	19,36	2,32		9,76		1:3,84
Muhara <i>Amanita muscaria</i>	18,20		0,53	0,71	12,50		4,46	81,77		0,93	0,53	53,75	26,56					1:4,48
Brezovka <i>Lactarius torminosus</i>	31,86		2,18	0,50	27,78		1,40	68,11		9,33	4,76	14,81	35,48			3,73		1:2,14
Ludara <i>Boletus satanas</i>	19,69		0,89	1,79	14,78	0,53	1,70	80,25		4,78	1,52	28,42	43,74			1,79		1:4,07

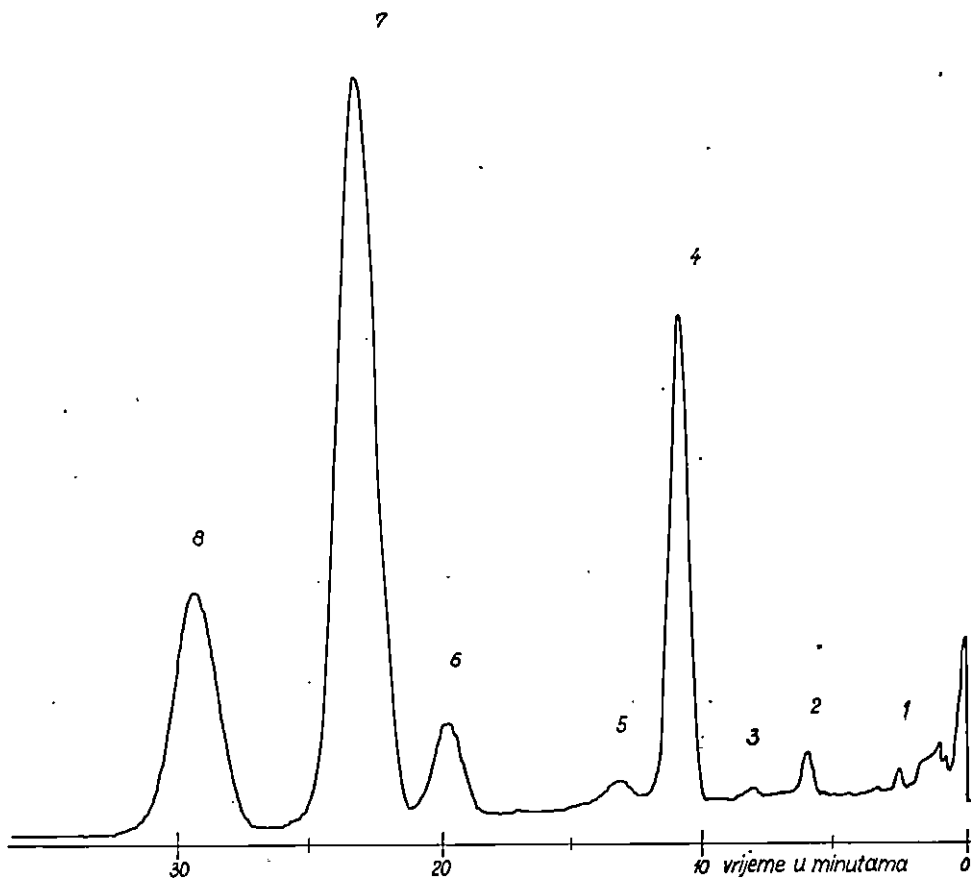
## POSTOCI MASNIH KISELINA U UKUPNIM LIPIDIMA GLJIVA

Tab.8

JESTIVE GLJIVE	zasićene masne kiseline ukupno							nezasiće- ne masne kiseline ukupno								Omjer zasićenih prema ne- zasićenim masnim kiselinama		
		12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0		14:1	16:1	17:1	18:1	18:2	18:3	20:3		20:4	>C20
Blagva																		
Amanita caesarea	22,05	0,23	0,98	0,23	16,80		3,81	76,53	0,98	0,57	51,14	22,94		0,27	0,63			1:3,47
Pečurka																		
Agaricus bisporus	26,56		10,06	1,42	10,30		4,78	71,30	0,96	0,23	4,91	62,20	0,87		1,13	1,00		1:2,68
Velika sunčanica																		
Macrolepiota procera	29,54	0,19	1,71	0,54	25,03		2,07	68,34	6,34	2,77	14,44	43,61			1,18			1:2,31
Kostanjevčica																		
Tricholoma conglobatum	22,56	trag	8,06	0,21	13,11		1,18	75,50	0,43	0,36	8,76	64,28			1,67			1:3,35
Grmačica																		
Clitocybe tabescens	21,05	1,31	1,02	0,92	16,42		1,38	77,93	4,75	1,38	32,47	37,79			1,54			1:3,70
Zlatnožuta griva																		
Clavaria aurea	25,53	0,18	0,73	0,95	20,31	0,42	2,94	73,63	1,07	0,80	37,67	34,09						1:2,88
Vrganj																		
Boletus edulis	17,36	0,21	1,01	0,54	13,93		1,67	81,57	1,07		18,96	58,92			2,62			1:4,69
Turčin																		
Leccinum aurantium	22,51		0,58	3,05	17,67		1,21	76,59	3,09	0,89	2640	4455			1,66			1:3,40
<b>OTROVNE GLJIVE</b>																		
Zelena pupavka																		
Amanita phalloides	28,33		1,15	0,79	23,60		2,79	70,98	0,77	3,22	0,98	49,42	15,76		0,83			1:2,50
Zučkasta pupavka																		
Amanita citrina	28,24		1,09	0,22	23,75		3,18	70,47	0,27	2,67	0,41	48,74	17,22		1,16			1:2,50
Panterovka																		
Amanita pantherina	20,73		0,82	0,07	11,49		8,35	77,99	0,58	0,23	55,04	20,21	0,37		1,56			1:3,76
Muhara																		
Amanita muscaria	16,60		0,35	0,52	10,78		4,95	83,25	0,47	0,15	65,55	17,08						1:5,01
Brezovka																		
Lactarius torminosus	37,16	trag	0,78	0,38	10,32		25,68	61,54	2,47	1,06	32,34	24,84			0,83			1:1,66
Ludara																		
Boletus satanas	22,30	trag	0,56	1,52	18,57	0,16	1,49	76,77	3,17	0,65	26,46	45,93			0,56			1:3,44

Slika 3

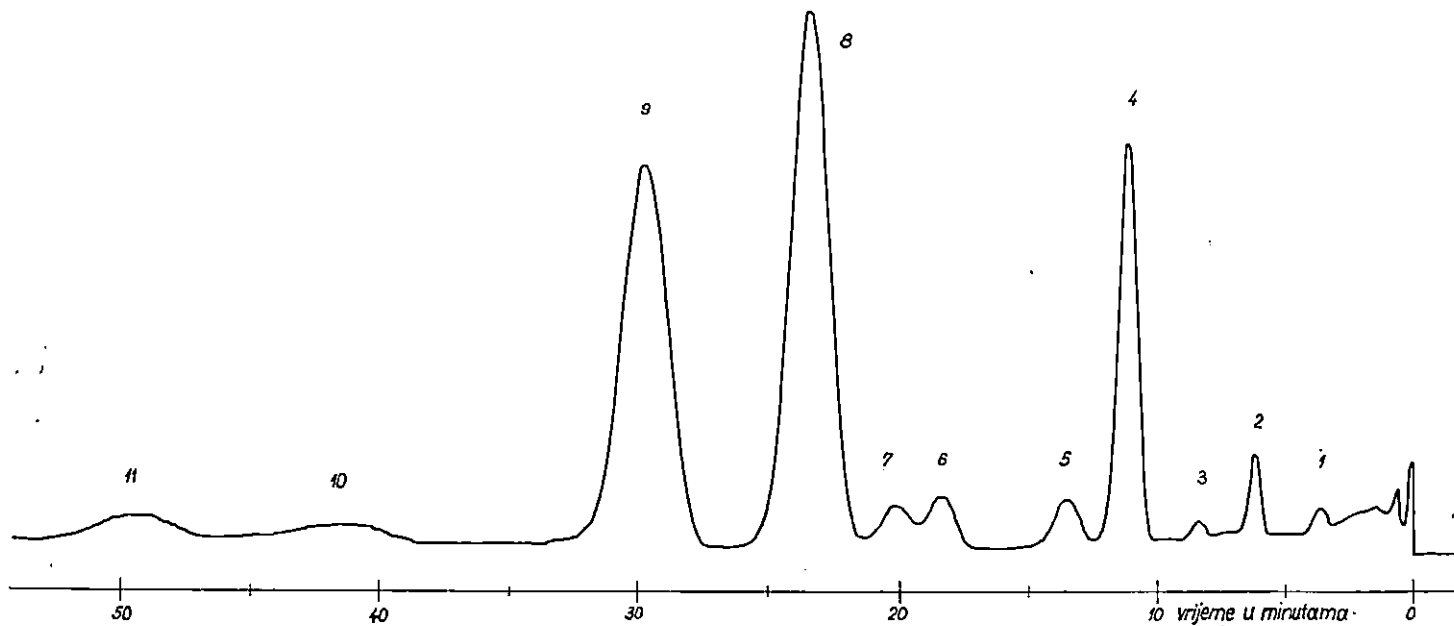
KROMATOGRAM METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA NEPOLARNIH  
LIPIDA BLAGVE (*Amanita caesarea*)



- 1.Laurinska 2.miristinska 3.pentadekan 4.palmitinska  
5.palmitoleinska 6.stearinska 7.oleinska 8.linolna kiselina

Slika 4

KROMATOGRAM METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA POLARNIH LIPIDA BLAGVE (Amanita caesarea)



1.Laurinska 2.miristinska 3.pentadekan 4.palmitinska 5.palmitoleinska 6.heptadecen  
7.stearinska 8.oleinska 9.linolna 10.eikosatrien 11.arahidonska kiselina

### III. RASPRAVA O REZULTATIMA — DISCUSSION OF RESULTS

#### 1. Voda i suha tvar

Iz dobivenih istraživačkih rezultata (tabela 4) vidi se da od svih istraživanih jestivih gljiva najviše vode sadrži svježa blagva (*Amanita caesarea*), tj. 91,67%, a najmanje svježi vrganj (*Boletus edulis*) 88,32%. To znači da u 100 g svježeg vrganja ima najviše suhe tvari, tj. 11,68 g, a najmanje u svježoj blagvi i to 8,33 g.

Prosječna količina vode u istraživanim jestivim gljivama bila je 90,16%, a suhe tvari 9,84%.

U istraživanim otrovnim gljivama najviše vode sadrži svježa zelena pupavka (*Amanita phalloides*), tj. 93,10%, a najmanje svježa žućkasta pupavka (*Amanita citrina*) 90,01%. To znači, da u 100 g svježe žućkaste pupavke ima najviše suhe tvari, tj. 9,99 g, a najmanje u svježoj zelenoj pupavci i to 6,90 g.

Prosječna količina vode u istraživanim otrovnim gljivama bila je 91,40%, a suhe tvari 8,60%.

Prosječna količina vode u svim istraživanim i jestivim i otrovnim gljivama bila je 90,69%, a suhe tvari 9,31%.

U sušenim gljivama bilo je prosječno 8,44% vode u jestivim i 9,49% u otrovnim gljivama.

#### 2. Ukupni lipidi

U 100 suhe tvari istraživanih jestivih gljiva ima prosječno 5,20 g ukupnih lipida. Najviše ih sadrži blagva (*Amanita caesarea*), tj. 8,64 g, a najmanje pečurka (*Agaricus bisporus*) i to samo 2,89 g ukupnih lipida u 100 g suhe tvari (Tab. 5).

U 100 g suhe tvari istraživanih otrovnih gljiva ima prosječno 11,49 g ukupnih lipida. Najviše ih je nađeno u suhoj tvari žućkaste pupavke (*Amanita citrina*) i to 15,74 g, a najmanje u suhoj tvari ludare (*Boletus satanas*) i to 6,64 g ukupnih lipida u 100 g suhe tvari (Tab. 5).

Jestiva gljiva pečurka (*Agaricus bisporus*) jedina je industrijski uzgojena gljiva od svih istraživanih gljiva. Suha tvar pečurke sadrži najmanje ukupnih lipida od svih istraživanih jestivih i otrovnih gljiva, tj. samo 2,89 g ukupnih lipida u 100 g suhe tvari. S obzirom na to da i samonikle pečurke prema literaturnim podacima (22, 48) sadrže lipida u količinama istog reda veličine kao i uzgojena pečurka, ne može se zaključiti, da uzgojene gljive iste vrste odnosno roda sadrže manje lipida od samoniklih gljiva.

#### 3. Nepolarni i polarni lipidi

Ukupni lipidi istraživanih jestivih gljiva sadrže nepolarnih lipida od 49,10% do 75,80%, prosječno 61,57%, a polarnih od 22,77% do 49,12%, prosječno 37,09% (Tab. 5). Omjer je između nepolarnih i polarnih lipida u istraživanim jestivim gljivama od 1:1 do 3,32:1.



Najviše se nepolarnih lipida nalazi u suhoj tvari blagve (*Amanita caesarea*, tj. 6,55%, a najmanje u suhoj tvari konstanjevčice (*Tricholoma conglobatum*) 2,07%. U konstanjevčici se nalazi jednaka količina nepolarnih i polarnih lipida i njihov je međusobni omjer 1 : 1.

Ukupni lipidi istraživanih otrovnih gljiva sadrže nepolarnih lipida od 68,02% do 83,02%, prosječno 76,18%, a polarnih od 15,96% do 31,12%, prosječno 23,06%. Omjer je između nepolarnih i polarnih lipida u istraživanim otrovnim gljivama od 2,19 : 1 do 5,24 : 1.

Najviše se nepolarnih lipida nalazi u suhoj tvari žučkaste pupavke (*Amanita citrina*), tj. 12,47%, a najmanje u suhoj tvari ludare (*Boletus satanas*) 4,52%.

Iz prikazanih rezultata u tabeli 5 vidljivo je, da istraživane otrovne gljive sadrže znatno više nepolarnih lipida od istraživanih jestivih gljiva.

#### 4. Masne kiseline nepolarnih lipida (Tab. 6)

##### A. Jestive gljive

U nepolarnim lipidima jestivih gljiva ima više nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina. Omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je od 1 : 2,38 do 1 : 4,99. Najviše se nezasićenih masnih kiselina nalazi u nepolarnim lipidima virganja (*Boletus edulis*) i to 83,22%, a najmanje u nepolarnim lipidima velike sunčanice (*Macrolepiota procera*), tj. 70,43% od ukupnih masnih kiselina.

Od zasićenih masnih kiselina nazočne su laurinska (12 : 0), miristin-ska (14 : 0), pentadekan (15 : 0), palmitinska (16 : 0) i stearinska kiselina (18 : 0).

Najviše ima palmitinske kiseline i to od 10,71% (pečurka — *Agaricus bisporus*) do 24,81% (velika sunčanica — *Macrolepiota procera*), pa stearinske od 0,97% (konstanjevčica — *Tricholoma conglobatum*) do 5,49% (pečurka). Nepolarni lipidi pečurke sadrže i dosta miristin-ske kiseline, 6,74% od ukupnih masnih kiselina.

U nepolarnim lipidima svih istraživanih jestivih gljiva od nezasićenih masnih kiselina nađene su palmitoleinska (16 : 1), oleinska (18 : 1), i linolna kiselina (18 : 2), a samo u nepolarnim lipidima velike sunčanice i turčina (*Leccinum aurantium*) heptadecen kiselina (17 : 1), dok se lino-lenska kiselina (18 : 3) nalazi samo u nepolarnim lipidima pečurke (1,20%).

Od nezasićenih masnih kiselina ima mnogo oleinske i linolne kiseline. Zanimljivo je da nepolarni lipidi pečurke (*Agaricus bisporus*) sadrže najmanje oleinske kiseline, samo 5,94%, a najviše linolne kiseline i to 67,41%, od ukupnih masnih kiselina.

##### B. Otrovnne gljive

U nepolarnim lipidima otrovnih gljiva također ima više nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina. Omjer je između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina od 1 : 1,54 do 1 : 5,25. Najviše se nezasićenih masnih kiselina nalazi u nepolarnim lipidima muhare (*Amanita muscaria*), i to 83,98%, a najmanje u nepolarnim lipidima brezovke (*Lactarius torminosus*), i to 60,57% od ukupnih masnih kiselina (Tab. 6).

U nepolarnim lipidima istraživanih otrovnih gljiva nađene su iste zasićene masne kiseline kao i u nepolarnim lipidima istraživanih jestivih gljiva.

Najviše ima palmitinske kiseline (16:0) od 5,38% (brezovka — *Lactarius torminosus*) do 23,96% (zelena pupavka — *Amanita phalloides*). Od toga uočljivo odstupa brezovka (*Lactarius torminosus*), u čijim nepolarnim lipidima ima najviše stearinske kiseline, i to čak 33,16% od svih masnih kiselina.

Palmitoleinska (16:1), oleinska (18:1) i linolna kiselina (18:2) glavni su predstavnici nezasićenih masnih kiselina, koje su nađene u nepolarnim lipidima istraživanih otrovnih gljiva. Jedino nepolarni lipidi ludare (*Boletus satanas*) sadrže heptadecen kiselinu (17:1) i to samo 0,26% od ukupnih masnih kiselina.

U nepolarnim lipidima pravih otrovnica zelene pupavke (*Amanita phalloides*), žučkaste pupavke (*Amanita citrina*), panterovke (*Amanita pantherina*) i muhare (*Amanita muscaria*) nalazi se mnogo više oleinske nego linolne kiseline. Najviše je nezasićenih masnih kiselina nađeno u nepolarnim lipidima muhare, i to 83,98% od ukupnih masnih kiselina, a od toga je samo oleinske kiseline 70,41%.

Nepolarni lipidi i jestivih, i otrovnih gljiva sadrže više nezasićenih masnih kiselina nego zasićenih.

Nepolarni lipidi otrovnih gljiva sadrže mnogo više oleinske kiseline nego linolne, a nepolarni lipidi jestivih gljiva više linolne nego oleinske kiseline. Iznimka su nepolarni lipidi jestive gljive blagve (*Amanita caesarea*), u kojima je nađeno više oleinske nego linolne kao i u otrovnicama, a također i nepolarni lipidi otrovne gljive ludare (*Boletus satanas*), koji sadrže više linolne kiseline nego oleinske kao i nepolarni lipidi jestivih gljiva.

## 5. Masne kiseline polarnih lipida

### A. Jestive gljive

U polarnim lipidima istraživanih jestivih gljiva ima više nezasićenih masnih kiselina nego zasićenih. Omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je od 1:2,13 do 1:4,38. Najviše se nezasićenih masnih kiselina nalazi u polarnim lipidima vrganja (*Boletus edulis*), i to 81,37%, a najmanje u polarnim lipidima zlatnožute grive (*Clavaria aurea*), odnosno 68,06% od ukupnih masnih kiselina (Tab. 7).

U polarnim lipidima svih istraživanih jestivih gljiva od zasićenih masnih kiselina nazočne su miristinska (14:0), pentadekan (15:0), palmitska (16:0) i stearinska kiselina (18:0). Laurinska je kiselina (12:0) nađena u polarnim lipidima blagve (*Boletus caesarea*), grmačice (*Clitocybe tabescens*) i vrganja (*Boletus edulis*), a margarinska kiselina (17:0) samo u polarnim lipidima zlatnožute grive (*Clavaria aurea*).

Najviše je nađeno palmitinske kiseline, i to od 10,21% (pečurka — *Agaricus bisporus*) do 26,85% (velika sunčanica — *Macrolepiota procera*). Ostale su zasićene masne kiseline zastupljene u mnogo manjim količinama.

Polarni se lipidi pečurke (*Agaricus bisporus*) razlikuju od polarnih lipida drugih istraživanih jestivih gljiva po tome, što sadrže veoma mnogo miristinske kiseline, i to 15,24% i relativno mnogo stearinske kiseline, 3,99% od ukupnih masnih kiselina.

U polarnim lipidima svih istraživanih jestivih gljiva nađene su slijedeće nezasićene masne kiseline: palmitoleinska (16 : 1), heptadecen (17 : 1), osim u vrganju (*Boletus edulis*), oleinska (18 : 1), linolna (18 : 2) i arahidonska kiselina (20 : 4), osim u zlatnožutoj grivi *Clavaria aurea*. Jedino polarni lipidi pečurke (*Agaricus bisporus*) sadrže linolensku kiselinu (18 : 3), i to 0,44% i 2,47% neidentificirane masne kiseline s više od 20 ugljikovih atoma u molekuli. Eikosatrien kiselina (20 : 3) nađena je samo u polarnim lipidima blagve (*Amanita caesarea*).

Od nezasićenih masnih kiselina u polarnim lipidima jestivih gljiva najviše ima linolne kiseline, od 32,82% (blagva — *Amanita caesarea*) do 67,23% (kostanjevčica — *Tricholoma conglobatum*). Polarni lipidi pečurke (*Agaricus bisporus*) i kostanjevčice (*Tricholoma conglobatum*) sadrže prema polarnim lipidima drugih jestivih gljiva neobično malo oleinske kiseline.

Palmitoleinska kiselina je nađena u polarnim lipidima jestivih gljiva u malim količinama. Iznimka su polarni lipidi velike sunčanice (*Macrolepiota procera*), koji sadrže 10,23% palmitoleinske kiseline.

## B. Otrovnne gljive

I u polarnim lipidima istraživanih otrovnih gljiva ima više nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina. Omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je od 1 : 1,81 do 1 : 4,48. Najviše se nezasićenih masnih kiselina nalazi u polarnim lipidima muhare (*Amanita muscaria*), i to 81,77%, a najmanje u polarnim lipidima žučkaste pupavke (*Amanita citrina*), 64,04% od ukupnih masnih kiselina (Tab. 7).

U polarnim lipidima otrovnih gljiva nađene su iste zasićene masne kiseline kao i u polarnim lipidima jestivih gljiva. Jedino nije nađena laurinska kiselina. Najviše se nalazi palmitinske kiseline, do 24,50%, uz iznimku panterovke (*Amanita pantherina*), čiji polarni lipidi sadrže samo 9,03% palmitinske kiseline.

U polarnim lipidima svih istraživanih otrovnih gljiva nađene su slijedeće nezasićene masne kiseline: palmitoleinska, heptadecen, oleinska, linolna i arahidonska kiselina (osim u muhari — *Amanita muscaria*). Polarni lipidi zelene i žučkaste pupavke (*Amanita phalloides* i *Amanita citrina*) sadrže i miristoleinsku kiselinu (14 : 1), a panterovke još i lino-lensku kiselinu.

U polarnim lipidima otrovnih gljiva, kao i u nepolarnim lipidima, nađeno je mnogo više oleinske nego linolne kiseline. Iznimka su polarni lipidi ludare (*Boletus satanas*), koji sadrže više linolne nego oleinske kiseline.

## 6. Masne kiseline u ukupnim lipidima gljiva

Množenjem relativnih postotaka masnih kiselina nepolarnih i polarnih lipida postocima nepolarnih i polarnih lipida u ukupnim lipidima i zbrajanjem dobivenih vrijednosti izračunati su relativni postoci masnih kiselina u ukupnim lipidima (Tab. 8).

### A. Jestive gljive

U ukupnim lipidima istraživanih jestivih gljiva ima više nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina. Najviše ih ima u ukupnim lipidima vrganja (*Boletus edulis*) i to 81,57%, a najmanje u ukupnim lipidima velike sunčanice (*Macrolepiota procera*), 68,34%. Omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je od 1 : 2,31 do 1 : 4,69.

Od zasićenih su masnih kiselina nađene laurinska, miristinska, pentadekan, palmitinska i stearinska kiselina. Jedino u pečurci (*Agaricus bisporus*) i turčinu (*Leccinum aurantium*) nema laurinske kiseline. Margarina je kiselina nađena samo u zlatnožutoj grivi (*Clavaria aurea*).

U ukupnim lipidima istraživanih jestivih gljiva ima najviše palmitske kiseline, i to od 10,30% u pečurci (*Agaricus bisporus*) do 25,03% u velikoj sunčanici (*Macrolepiota procera*), pa stearinske kiseline od 1,18% u kostanjevčici (*Tricholoma conglobatum*) do 4,78% u pečurci. Pečurka su i kostanjevčica bogate i miristinskom kiselinom (10,06% odnosno 8,06% od ukupnih masnih kiselina).

Palmitoleinska, heptadecen, oleinska, linolna i arahidonska kiselina glavni su predstavnici nezasićenih masnih kiselina u ukupnim lipidima jestivih gljiva. Jedino vrganj (*Boletus edulis*) ne sadrži heptadecen kiselinu, a zlatnožuta griva (*Clavaria aurea*) arahidonsku kiselinu. Eikosatrien kiselina nađena je u blagvi (*Amanita caesarea*), a linolenska i jedna neidentificirana kiselina koja ima više od dvadeset ugljikovih atoma u molekuli nađene su u pečurci (*Agaricus bisporus*).

Od nezasićenih masnih kiselina najviše ima linolne kiseline, a zatim oleinske kiseline. Najviše je linolne kiseline nađeno u ukupnim lipidima kostanjevčice (*Tricholoma conglobatum*), i to 64,28%, a oleinske u lipidima blagve (*Amanita caesarea*) 51,14%. Lipidi pečurke (*Agaricus bisporus*) i kostanjevčice sadrže iznimno malo oleinske kiseline (4,91% odnosno 8,76%). Zanimljivo je, da je u ukupnim lipidima tih dviju jestivih gljiva nađeno razmjerno mnogo miristinske kiseline, i to 10,06% odnosno 8,06% od ukupnih masnih kiselina.

Od esencijalnih masnih kiselina linolne, linolenske i arahidonske kiseline, jedino pečurka (*Agaricus bisporus*) sadrži sve tri. Ostale istraživane jestive gljive sadrže linolnu i arahidonsku kiselinu. Iznimka je zlatnožuta griva (*Clavaria aurea*), koja ne sadrži arahidonsku nego samo linolnu kiselinu.

Kostanjevčica (*Tricholoma conglobatum*), pečurka (*Agaricus bisporus*) i vrganj (*Boletus edulis*) razlikuju se od ostalih istraživanih jestivih gljiva po tome, što njihovi ukupni lipidi sadrže velike količine esencijalnih masnih kiselina (linolna + linolenska + arahidonska kiselina), i to kostanjevčice 65,95%, pečurke 64,20%, a vrganja 61,54% od ukupnih

masnih kiselina. Preračunavanjem relativnih postotaka esencijalnih masnih kiselina u lipidima istraživanih jestivih gljiva na suhu tvar gljiva, dobiveni su rezultati koji pokazuju da najviše esencijalnih masnih kiselina sadrži turčin (*Leccinum aurantium*) i to 2,85%, pa vrganj (*Boletus edulis*) i kostanjevica (*Tricholoma conglobatum*) 2,78% od ukupnih masnih kiselina.

#### B. Otrovne gljive

I u ukupnim lipidima istraživanih otrovnih gljiva ima više nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina. Najviše nezasićenih masnih kiselina sadrže ukupni lipidi muhare (*Amanita muscaria*), i to 83,25%, a najmanje ukupni lipidi brezovke (*Lactarius torminosus*) 61,54% od ukupnih masnih kiselina. Omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je od 1:1,66 do 1:5,01.

U otrovnim su gljivama nađene iste zasićene masne kiseline kao i u istraživanim jestivim gljivama, jedino nema laurinske kiseline. Samo su u brezovci (*Lactarius torminosus*) i ludari (*Boletus satanas*) nađeni tragovi laurinske kiseline. Margarinska je kiselina nađena samo u ludari.

Od zasićenih masnih kiselina u ukupnim lipidima istraživanih otrovnih gljiva najviše ima palmitinske kiseline, i to od 10,32% u brezovci (*Lactarius torminosus*) do 23,75% u žučkasto pupavci (*Amanita citrina*) i stearinske kiseline od 1,49% u ludari (*Boletus satanas*) do 8,35% u panterovci (*Amanita pantherina*). Iznimka je brezovka lipidi koje sadrže neobično mnogo stearinske kiseline, tj. 25,68% od ukupnih masnih kiselina.

Palmitoleinska, heptadecen, oleinska, linolna i arahidonska kiselina jesu nezasićene masne kiseline koje su nađene u istraživanim otrovnim gljivama. Jedina je iznimka muhara (*Amanita muscaria*) koja ne sadrži arahidonsku kiselinu. Osim spomenutih nezasićenih masnih kiselina u zelenoj pupavci (*Amanita phalloides*) i u žučkasto pupavci (*Amanita citrina*) nađene su vrlo male količine miristoleinske kiseline (0,77% odnosno 0,27%). Samo panterovka (*Amanita pantherina*) sadrži linolensku kiselinu, i to 0,37% od ukupnih masnih kiselina u ukupnim lipidima.

Od nezasićenih masnih kiselina najviše ima oleinske i linolne kiseline. U ukupnim je lipidima muhare (*Amanita muscaria*) nađeno najviše oleinske kiseline, i to 65,55%, a najmanje u lipidima ludare (*Boletus satanas*), 26,46%. Ukupni lipidi ludare sadrže najviše linolne kiseline, i to 45,93%, a zelene pupavke (*Amanita phalloides*) najmanje, 15,76% od ukupnih masnih kiselina. Ukupni lipidi muhare (*Amanita muscaria*) sadrže najviše nezasićenih masnih kiselina, od kojih oleinske kiseline ima 65,55% od ukupnih masnih kiselina.

#### IV. ZAKLJUČCI — CONCLUSIONS

Sistematski su istraživane jestive i otrovne gljive užega i šireg zagrebačkog područja. Od toga je bilo osam jestivih i šest otrovnih gljiva. Sve su istraživane gljive osim jedne jestive (pečurka — *Agaricus bisporus*) samonikle gljive zagrebačkog područja.

Istraživane su slijedeće gljive:

- I. *Samonikle jestive gljive*:  
blagva (*Amanita caesarea* Quel.),  
velika sunčanica (*Macrolepiota procera* Sing.),  
kostanjevčica (*Tricholoma conglobatum* Vitt.),  
grmačica (*Clitocybe tabescens* Scop.),  
zlatnožuta griva (*Clavaria aurea* Fr.),  
vrganj (*Boletus edulis* Bull.),  
turčin (*Leccinum aurantium* Bull.).
- II. *Industrijski uzgojene jestive gljive*:  
pečurka (*Agaricus bisporus* Lange).
- III. *Samonikle otrovne gljive*:  
zeleno pupavka (*Amanita phalloides* Fr.),  
žučkasta pupavka (*Amanita citrina* Gray),  
panterovka (*Amanita pantherina* Quel),  
muhara (*Amanita muscaria* Hooke),  
brezovka (*Lactarius torminosus* Fr. ex Schöff.),  
ludara (*Boletus satanas* Lenz.).

U svježim su gljivama određivane količine vode odnosno suhe tvari, a u sušenim gljivama količine vode i ukupnih lipida.

U izdvojenim su ukupnim lipidima određivane količine nepolarnih i polarnih lipida i u njima sastav viših masnih kiselina (relativni postoci) plinsko-tekućinskom razdjelnom kromatografijom (GLC).

Na osnovi dobivenih rezultata određivanja količina vode, suhe tvari i ukupnih lipida (Tab. 4 i 5) može se zaključiti:

1. U svježim istraživanim jestivim gljivama bilo je prosječno 90,16% vode i 9,84% suhe tvari.

Najviše je suhe tvari bilo u svježem vrganju (*Boletus edulis*) 11,68%, a najmanje u svježoj blagvi (*Amanita caesarea*), i to 8,33%.

2. U svježim istraživanim otrovnim gljivama bilo je prosječno 91,40% vode i 8,60% suhe tvari. Najviše je suhe tvari bilo u svježoj žučkastoj pupavci (*Amanita citrina*) 9,90%, a najmanje u svježoj zelenoj pupavci (*Amanita phalloides*), i to 6,90%.

3. U suhoj tvari istraživanih jestivih gljiva nađeno je manje ukupnih lipida nego u suhoj tvari istraživanih otrovnih gljiva.

Prosječna količina ukupnih lipida u jestivim gljivama bila je 5,20 g, a u otrovnim gljivama 11,49 g u 100 g suhe tvari.

4. Istraživane gljive roda *Amanita* sadrže veće količine ukupnih lipida nego istraživane gljive drugih rodova.

U rodu *Amanita* nalaze se jedine tri smrtno otrovne gljive. Osim tih nalaze se četiri otrovne gljive, koje oštećuju živčani sustav i dvije jestive gljive. Od tih su gljiva istraživane jedna jestiva i četiri otrovne.

U 100 g suhe tvari istraživanih gljiva roda *Amanita* nađene su slijedeće količine ukupnih lipida:

u jestivoj blagvi ( <i>Amanita caesarea</i> )	8,64 g
u smrtno otrovnoj zelenoj pupavci ( <i>Amanita phalloides</i> )	13,46 g
u otrovnoj žučkastoj pupavci ( <i>Amanita citrina</i> )	15,74 g
u otrovnoj panterovci ( <i>Amanita pantherina</i> )	13,79 g
u otrovnoj muhari ( <i>Amanita muscaria</i> )	10,41 g

Ti podaci potkrepljuju zaključak, da otrovne gljive sadrže veće količine ukupnih lipida od jestivih gljiva.

Na temelju eksperimentalnih rezultata istraživanja izdvojenih ukupnih lipida može se zaključiti slijedeće:

1. Sve istraživane otrovne gljive sadrže mnogo veće količine nepolarnih lipida nego polarnih (Tab. 5).

I istraživane jestive gljive sadrže veće količine nepolarnih lipida ali ne sve, kao što je slučaj kod otrovnih gljiva (Tab. 5).

Omjeri između polarnih (PL) i nepolarnih lipida (NL) u istraživanim gljivama (Tab. 5) jesu:

Jestive gljive:	PL/NL	Otrovne gljive:	PL/NL
blagva		panterovka	
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3,32	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 5,24
turčin		žučkasta pupavka	
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 2,51	<i>Amanita citrina</i>	1 : 3,94
grmačica		zelena pupavka	
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 1,91	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 3,92
velika sunčanica		brezovka	
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 1,78	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 3,42
pečurka		muhara	
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 1,42	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 2,47
zlatnožuta griva		ludara	
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 1,42	<i>Boletus satanas</i>	1 : 2,19
vrganj			
<i>Boletus edulis</i>	1 : 1,20		
kostanjevčica			
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 1		

Iz prikazanih omjera između polarnih i nepolarnih lipida vidljive su razlike u količinama polarnih i nepolarnih lipida u istraživanim jestivim i otrovnim gljivama.

Jestiva gljiva kostanjevčica (*Tricholoma conglobatum*) sadrži jednake količine i polarnih i nepolarnih lipida. Ostale jestive gljive sadrže malo veće količine nepolarnih nego polarnih lipida, a jedino lagva (*Amanita caesarea*) i turčin (*Leccinum aurantium*) mnogo više nepolarnih nego polarnih lipida. Iz toga slijedi zaključak, da nazočnost veće količine nepolarnih lipida od polarnih nije značajka jestivih gljiva.

Na osnovi omjera između polarnih i nepolarnih lipida u istraživanim otrovnim gljivama može se zaključiti, da je značajka otrovnih gljiva ta, da sadrže mnogo veće količine nepolarnih nego polarnih lipida.

Međutim, ne može se tvrditi da se povećanjem otrovnosti gljive jednoliko povećava količina nepolarnih lipida. To je vidljivo iz prikazanog omjera između polarnih i nepolarnih lipida. Najotrovnija gljiva, smrtna otrovnica zelena pupavka (*Amanita phalloides*) ne sadrži najveću količinu nepolarnih lipida, pa se prema omjeru između polarnih i nepolarnih lipida nalazi na trećem mjestu.

2. U lipidima istraživanih jestivih i otrovnih gljiva nađene su slijedeće masne kiseline:

*Žasićene masne kiseline:*

12 : 0 — laurinska kiselina, 14 : 0 — miristinska kiselina, 15 : 0 — pentadekan kiselina, 16 : 0 — palmitinska kiselina, 17 : 0 — margarinska kiselina, 18 : 0 — stearinska kiselina.

*Nezasićene masne kiseline:*

14 : 1 — miristoleinska kiselina, 16 : 1 — palmitoleinska kiselina, 17 : 1 — heptadecen kiselina, 18 : 1 — oleinska kiselina, 18 : 2 — linolna kiselina, 18 : 3 — linolenska kiselina, 20 : 3 — eikosatrien kiselina, 20 : 4 — arahidonska kiselina,  $\text{C}_{20}$  — neidentificirana kiselina s više od 20, C-atoma u molekuli.

3. U lipidima svih istraživanih, i jestivih, i otrovnih gljiva nađene su zasićene masne kiseline miristinska, pentadekan, palmitinska i stearinska kiselina, i nezasićene palmitoleinska, oleinska i linolna kiselina (Tab. 6, 7 i 8).

4. U kvalitativnom sastavu masnih kiselina istraživanih jestivih i otrovnih gljiva nema većih razlika.

5. I u nepolarnim i u polarnim lipidima i jestivih i otrovnih gljiva nalaze se veće količine nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina (Tab. 6 i 7).

Omjeri između zasićenih (ZMK) i nezasićenih masnih kiselina (NMK) u nepolarnim lipidima istraživanih gljiva (Tab. 6) jesu:

<i>Jestive gljive:</i>	ZMK/NMK	<i>Otrovne gljive:</i>	ZMK/NMK
vrganj		muhara	
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4,99	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 5,25
zlatnožuta griva		panterovka	
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 3,68	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3,75
kostanjevčica		ludara	
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3,61	<i>Boletus satanas</i>	1 : 3,20
grmačica		žučkasta pupavka	
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 3,55	<i>Amanita citrina</i>	1 : 2,74
turčin		zeleno pupavka	
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 3,36	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2,57
blagva		brezovka	
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3,26	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 1,54
pečurka		Srednja vrijednost	1 : 3,17
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 3,10		
velika sunčanica			
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2,38		
Srednja vrijednost	1 : 3,62		

Od jestivih istraživanih gljiva najviše nezasićenih masnih kiselina sadrže nepolarni lipidi vrganja (*Boletus edulis*), a od otrovnih gljiva nepolarni lipidi muhare (*Amanita muscaria*).

Omjeri između zasićenih (ZMK) i nezasićenih masnih kiselina (NMK) u polarnim lipidima istraživanih gljiva (Tab. 7) jesu:



<i>Jestive gljive:</i>	ZMK/NMK	<i>Otrovne gljive:</i>	ZMK/NMK
vrganj		muvara	
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4,38	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 4,48
blagva		ludara	
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 4,34	<i>Boletus satanas</i>	1 : 4,07
grmačica		panterovka	
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 4,02	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3,84
turčin		zelena pupavka	
<i>Laccinum aurantium</i>	1 : 3,52	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2,27
kostanjevčica		brezovka	
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3,12	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 2,14
pečurka		žučkasta pupavka	
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 2,22	<i>Amanita citrina</i>	1 : 1,81
velika sunčanica			
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2,20	Srednja vrijednost	1 : 3,10
zlatnožuta griva			
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 2,13		
Srednja vrijednost	1 : 3,24		

Od istraživanih jestivih gljiva najviše nezasićenih masnih kiselina sadrže polarni lipidi vrganja (*Boletus edulis*), zatim blagve (*Amanita caesarea*) i grmačice (*Clitocybe tabescens*), a od istraživanih otrovnih gljiva polarni lipidi muhare (*Amanita muscaria*) i ludare (*Boletus satanas*).

Omjeri između zasićenih (ZMK) i nezasićenih masnih kiselina (NMK) u ukupnim lipidima istraživanih gljiva (Tab. 8) jesu:

<i>Jestive gljive:</i>	ZMK/NMK	<i>Otrovne gljive:</i>	ZMK/NMK
vrganj		muvara	
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4,69	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 5,01
grmačica		panterovka	
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 3,70	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3,76
blagva		ludara	
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3,47	<i>Boletus satanas</i>	1 : 3,44
turčin		zelena pupavka	
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 3,40	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2,50
kostanjevčica		žučkasta pupavka	
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3,35	<i>Amanita citrina</i>	1 : 2,50
zlatnožuta griva		brezovka	
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 2,88	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 1,66
pečurka			
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 2,68	Srednja vrijednost	1 : 3,14
velika sunčanica			
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2,31		
Srednja vrijednost	1 : 3,31		

Od istraživanih jestivih gljiva najviše nezasićenih masnih kiselina sadrže ukupni lipidi vrganja (*Boletus edulis*), i to 81,57%, a od istraživanih otrovnih gljiva ukupni lipidi muhare (*Amanita muscaria*), i to 83,25% od ukupnih masnih kiselina (Tab. 8).

Kada su postoci masnih kiselina u lipidima bili preračunani na suhu tvar gljiva, dobiveni su rezultati koji pokazuju da najviše nezasićenih masnih kiselina sadrži od jestivih gljiva blagva (*Amanita caesarea*) i to 6,62%, a od otrovnih žučkasta pupavka (*Amanita citrina*) 11,09% od ukupnih masnih kiselina.

Otrovnost gljiva i količina nezasićenih masnih kiselina ne zavise uzajamno jedna od druge. Smrtna se otrovnica zelena pupavka (*Amanita phalloides*) po količini nezasićenih masnih kiselina u suhoj tvari gljive nalazi na trećem mjestu, a po količini nezasićenih masnih kiselina u ukupnim lipidima istom na četvrtom mjestu.

6. Od zasićenih masnih kiselina najviše ima u svim istraživanim gljivama, i jestivim i otrovnim, palmitinske kiseline, a od nezasićenih oleinske i linolne kiseline (Tab. 8).

7. Sve istraživane jestive gljive osim blagve (*Amanita caesarea*) i zlatnožute grive (*Clavaria aurea*) sadrže više linolne nego oleinske kiseline.

Sve istraživane otrovne gljive osim ludare (*Boletus satanas*) sadrže više oleinske nego linolne kiseline.

Zanimljivo je, da jestiva gljiva blagva (*Amanita caesarea*) sadrži mnogo više oleinske nego linolne kiseline kao i otrovne gljive istog roda *Amanitae* zelena pupavka (*Amanita phalloides*), žučkasta pupavka (*Amanita citrina*), panterovka (*Amanita pantherina*) i muhara (*Amanita muscaria*).

Obratan je slučaj kod gljiva roda *Boletus*. Jestive gljive tog roda vrganj (*Boletus edulis*) i turčin (*Leccinum aurantium*) i otrovna gljiva ludara (*Boletus satanas*) sadrže više linolne nego oleinske kiseline.

8. Nazočnost esencijalne arahidonske kiseline nije bitna značajka ni jestivih, ni otrovnih gljiva. Ta kiselina nije nađena u jednoj jestivoj gljivi zlatnožutoj grivi (*Clavaria aurea*) i u jednoj otrovnoj gljivi muhari (*Amanita muscaria*), a nađena je u drugim istraživanim gljivama (Tab. 8).

9. Esencijalna arahidonska kiselina nađena je samo u polarnim lipidima istraživanih jestivih i otrovnih gljiva (Tab. 7), pa je za potpunu analizu masnih kiselina (kvalitativnu i kvantitativnu) potrebno ekstrahirati ukupne lipide, a ne kao što se u većini dosadašnjih slučajeva iz bilja ekstrahiralo samo nepolarne lipide (petroleterški ili eterski ekstrakt) poznatije pod nazivom masti i ulja odnosno neutralni lipidi.

10. Od istraživanih jestivih gljiva turčin (*Leccinum aurantium*), vrganj (*Boletus edulis*) i kostanjevčica (*Tricholoma conglobatum*) sadrže najviše esencijalnih masnih kiselina (str. 142) pa su s tog stajališta prehrambeno najvrednije.

To su tri najpoznatije domaće jestive gljive i skoro svake godine ih ima mnogo u okolici Zagreba.

11. Na osnovi pokusnih rezultata (količina ukupnih lipida, omjera između polarnih i nepolarnih lipida i količinskih razlika između oleinske i linolne kiseline) vidljivo je, da se istraživane gljive botaničkog roda *Amanita* razlikuju od istraživanih gljiva drugih rodova.

Bile su istraživane slijedeće gljive roda *Amanita*:

blagva ( <i>Amanita caesarea</i> )	jestiva gljiva
zelena pupavka ( <i>Amanita phalloides</i> )	smrtno otrovna
žučkasta pupavka ( <i>Amanita citrina</i> )	otrovna gljiva
panterovka ( <i>Amanita pantherina</i> )	otrovna gljiva
muhara ( <i>Amanita muscaria</i> )	otrovna gljiva

Sve istraživane gljive tog roda sadrže veće količine ukupnih lipida u suhoj tvari gljiva (Tab. 5) od drugih istraživanih gljiva.

Osim toga sve nabrojene gljive roda *Amanita* sadrže mnogo više nepolarnih nego polarnih lipida (Tab. 5).

Za sve je istraživane gljive roda *Amanita* značajno to što sadrže mnogo veće količine oleinske nego linolne kiseline.

Na osnovi tih podataka može se zaključiti, da gljive istog roda, i jestive i otrovne, imaju određene kemijske sličnosti. To su u prvom redu količine ukupnih lipida, omjeri između polarnih i nepolarnih lipida, i količine oleinske i linolne kiseline.

#### LITERATURA — REFERENCES

1. Allen C. F. and P. Good, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 610 (1965).
2. Ansell G. B. and J. N. Hawthorne, *Phospholipids*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London—New York, 1964, str. 1—79.
3. Balenović K., D. Cerar, B. Gašpert i T. Galijan, *Arhiv Kem.*, 27, 107 (1955).
4. Balenović K., D. Cerar, Z. Pučar i V. Škarić, *Arhiv Kem.*, 27, 15 (1955).
5. Balint A. J., E. Kyriakides, L. H. Spitzer and S. E. Morrison, *J. Lipid Res.*, 6, 96 (1965).
6. Bamberger M. und A. Landsiedl, *Monatsh. Chem.*, 26, 1109 (1905).
7. Bard L. und J. Zellner, *Monatsh. Chem.*, 44, 9 (1923).
8. Beerthuis R. K. and J. G. Keppler, *Nature*, 179, 731 (1957).
9. Beiss U., *Planta Med.*, 12, 252 (1964).
10. Belcher R. and A. L. Codberg, *Semimicro Quantitative Organic Analysis*, Longmans, Green and Co., 1945.
11. Bertram S. H., *Z. Deutsche Öl- und Fett-Ind.*, 45, 733 (1925).
12. Bissinger T., *Arch. Pharm.*, 221, 321 (1883).
13. Blagaić K., *Gljive naših krajeva, vlastita naklada*, Zagreb, 1931, str. 71—262.
14. Bobbit J. M., *Thin-layer Chromatography*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1963, str. 1—30.
15. Body D. R., F. B. Shorland and J. P. Gass, *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 207 (1966).
16. Bogojevski D., Ž. Prošić i B. Vračarić, *Hrana i ishrana*, 5, 293 (1967).
17. Bonner J. and J. E. Varner, *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York—London, 1965, str. 66—72.
18. Bonnet J. L., *Application de la chromatographie sur papier à l'étude de divers champignons*, monografija, I, 1959, str. 239—291.
19. Bougault J. et C. Charaux, *C. R. Acad. Sci. Fr.*, 153, 572 (1911).
20. Bouillon — E. Lagrange, *Ann. Chim.*, 51, 75 (1804), loc. cit. 18.
21. Bowman R. D. and R. O. Mumma, *Biochim. Biophys. Acta*, 144, 501 (1967).
22. Bracco U., J. J. Wuhrmann et R. H. Egli, *Rev. Franç. Corps Gras*, 14, 707 (1967).
23. Braconnot H., *Ann. Chim.*, 80, 272 (1811), loc. cit. 18.
24. Braconnot H., *Ann. Chim.*, 87, 237 (1813), loc. cit. 18.
25. Eregant N. und Z. Turk, *Bull. Scientifique*, 15, 158 (1970).
26. Browning B. L., *Methods of Wood Chemistry*, Interscience Publishers, New York—London—Sydney, Vol. I., 1967, str. 138—159.
27. Butkus A. and J. N. Berretoni, *Lipids*, 2, 212 (1967).
28. Bygrave F. L., *J. Biol. Chem.*, 244, 4768 (1969).

29. *Cerbulis J., Agr. Food Chem., 5, 784 (1967).*
30. *Clayton P. A. and C. E. Rowe, Biochem. J., 101, 674 (1966).*
31. *Craig B. M. and N. L. Murty, J. Am. Oil Chemists 'Soc., 36, 549 (1959).*
32. *Crider Q. E., P. Alaupović, J. Hillsberry, C. Yen and R. H. Bradford, J. Lipid Res., 5, 479 (1964).*
33. *Crooper F. R. and A. Heywood, Nature, 174, 1063 (1954).*
34. *Davis J. T., R. B. Bridges and J. G. Coniglio, Biochem. J., 98, 342 (1966).*
35. *De Bohner L. S., E. F. Soto and T. De Cohan, J. Chromatog., 17, 513 (1965).*
36. *Deur-Šiftar Đ., Osnove plinske kromatografije, Tehnološki fakultet u Zagrebu, 1968, str. 1—38.*
37. *Dolev A. and H. S. Olcott, J. Am. Oil Chemists 'Soc., 42, 1046 (1965).*
38. *Ellis M. T., Biochem. J., 12, 173 (1918).*
39. *Fieser L. F. i M. Fieser, Uvod u organsku hemiju, I. knjiga, Savez studenata Prirodno-matematičkog fakulteta, Beograd, 1960, str. 360.*
40. *Filajdić M., Kemija u industriji, IV. 41 (1955).*
41. *Filajdić M., D. Viličić i D. Štrucelj, Kemija u industriji, 9, 757 (1965).*
42. *Filipović I. i P. Sabioncello, Laboratorijski priručnik I/3, Tehnička knjiga Zagreb, 1965, str. 99—114.*
43. *Folch J., I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath and N. F. Le Baron, J. Biol. Chem., 191, 833 (1951).*
44. *Folch J., M. Lees and G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).*
45. *Fritsch K., Arch. Pharm., 227, 193 (1889).*
46. *Galanos D. S. and V. M. Kapoulas, J. Lipid Res., 3, 134 (1962).*
47. *Galanos D. S. and V. M. Kapoulas, Biochim. Biophys. Acta, 98, 293 (1965).*
48. *Gobley M., J. Pharm., III. 81 (1856), loc. cit. 18.*
49. *Goris A. et M. Mascré, C. R. Acad. Sci. Fr., 153, 1082 (1911).*
50. *Gray G. M. and M. Macfarlane, Biochem. J., 70, 409 (1958).*
51. *Grom J., Gobe, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1964.*
52. *Hadorn H. und K. Zürcher, Dtsch. Lebensm.-Rdsch., 66, 77 (1970).*
53. *Hagan S. N., E. W. Murphy and L. M. Shelley, J. Ass. Agr. Chemists, 50, 250 (1967).*
54. *Hanahan D. J. and J. N. Olley, J. Biol. Chem., 231, 318 (1958).*
55. *Hanahan D. J., Lipids Chemistry, John Wiley & Sons Inc. New York, 1960, str. 1—39 i 217.*
56. *Harris P. and A. T. James, Biochem. J., 112, 331 (1969).*
57. *Hartmann E. und J. Zellner, Monatsh. Chem., 50, 193 (1928).*
58. *Heinisch W. und J. Zellner, Monatsh. Chem., 25, 537 (1904).*
59. *Herb S. F., P. Magidman and R. W. Riemenschneider, J. Am. Oil Chemists 'Soc., 37, 127 (1960).*
60. *Hilditch T. P., The Chemical Constitution of Natural Fats, Third edition, Champan & Hall Ltd., London, 1956, str. 574—581.*
61. *Hilditch T. P. and P. N. Williams, The Chemical Constitution of Natural Fats, fourth edition, Chapman & Hall, London, 1964, str. 676—699.*
62. *Holjkin J. I., Hromatografija v himii drevesiny, Lesnaja promyšlennost', Moskva, 1968, str. 20—23.*
63. *Hughes D. H., Proc. Intern. Conf. Sci. Aspects Mushroom Growing, 5th, Philadelphia, 1962, str. 540—546.*
64. *Hughes B. P. and F. F. Frais, Biochem. J., 96, 6P (1965).*
65. *Izmailov N. A. & M. S. Shraiber, Farmatsiya, 3, 1 (1938), Chem. Abstr., 34, 855 (1940).*
66. *Jack R. C. M., J. Am. Oil Chemists 'Soc., 42, 1051 (1965).*
67. *James A. T. and A. J. P. Martin, Brit. Med. Bull., 10, 170 (1954).*
68. *Jasinska M. and J. Szymczak, Roczniki Panstwowego Zakladu Hig., 17, 193 (1966), Chem. Abstr., 65, 9625 d (1966).*
69. *Johnston P. V. and B. I. Roots, Biochem. J., 98, 157 (1966).*
70. *Kaić M., D. Viličić, F. Mihelić i L. Barišić, Farm. Glas., 23, 317 (1967).*
71. *Kaufmann H. P., Analyse der Fette und Fettprodukte, Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1958.*
72. *Kaufmann H. P., S. S. Radwan und A. K. S. Ahmad, Fette — Seifen — Anstrichmittel, 68, 261 (1966).*
73. *Kelley T. F., J. Chromatog., 22, 456 (1966).*
74. *Kolattukudy P. E., Lipids, 5, 398 (1970).*

75. Kopaczyk C. K. and S. N. Radin, *J. Lipid Res.*, 6, 140 (1965).
76. Kotani M., K. Seiki, A. Yamashita, A. Takashima, T. Nakagawa and I. Horii, *J. Lipid Res.*, 8, 181 (1967).
77. Krajčinović M., Analiza masti i ulja i drugih produkata organske kemijske industrije, Sveučilišna litografija, Zagreb, 1950, str. 69—139.
78. Lee F. A. and L. R. Mattick, *J. Food sci.*, 26, 273 (1961).
79. Leopold H., *Z. Lebensm. Untersuch.—Forsch.*, 86, 220 (1943).
80. Lepage M., *Lipids*, 2, 244 (1967).
81. Long C. and D. A. Staples, *Biochem. J.*, 73, 385 (1959).
82. Long C. and D. A. Staples, *Biochem. J.*, 78, 179 (1961).
83. Lösecke A., *Arch. Pharm.*, 209, 133 (1876).
84. Lovelock J. E., *J. Chromatog.*, 1, 1 (1958).
85. Lucas C.C., J. M. Patterson und J. H. Ridout, *Arch. Biochem. Biophysics*, 78, 546 (1958).
86. Maggioni A., C. Passera, F. Renosto and E. Benetti, *J. Agr. Food Chem.*, 16, 517 (1968).
87. Mangold H. K., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38, 708 (1961).
88. Margewicz K., Dissert. Kaisl. Med. Akad. St. Petersburg, 1883, loc. cit. 18.
89. Marinetti G. V., *J. Lipid Res.*, 3, 1 (1962).
90. Marshal C. L. and A. D. Brown, *Biochem. J.*, 110, 441 (1968).
91. Mc Killican M. E., R. P. A. Sims, F. B. Johnston and J. C. Mes, *Cereal Chem.*, 45, 512 (1968).
92. Medcalf D. G., V. L. Youngs and K. A. Gilles, *Cereal Chem.*, 45, 88 (1968).
93. Metcalfe L. D. and A. A. Schmitz, *Anal. Chem.*, 33, 363 (1961).
94. Mihajlović M. Lj., G. A. Garton, M. Antić i D. Hadžijev, *Glasnik Hem. Društva*, 28, 179 (1963).
95. Monasterio G. & G. Berti, *Arch. Ricambio*, 15, 165 (1951).
96. Mondy N. I., A. Bourque, B. Breslow and L. R. Mattick, *J. Food Sci.*, 30, 420 (1965).
97. Nelson G. J., *Lipids*, 2, 323 (1967).
98. Newman H. A., S. E. Gordesky, C. Hoppel and C. Cooper, *Biochem. J.*, 107, 381 (1968).
99. Nicols B. W., *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 417 (1963).
100. Nicolaidis N., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 691 (1965).
101. Nikolić B., Biohemija, Naučna knjiga, Beograd, 1963, str. 60.
102. Opitz E., *Arch. Pharm.*, 229, 290 (1891).
103. Owens K., *Biochem. J.*, 100, 354 (1966).
104. Petkovšek V. i I. Stanič, Gobe, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1965, str. 34—145.
105. Phillips B. M. and N. Robinson, *Clin. Chim. Acta*, 8, 832 (1963).
106. Pomeranz Y., O. Chung and J. Robinson, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 43, 45 (1966).
107. Pons W. A. Jr., and V. L. Frampton, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 786 (1965).
108. Rac M. Ulja i masti, Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd, 1964, str. 23—24.
109. Rahn J. J. and R. T. Holman, *J. Lipid Res.*, 5, 169 (1964).
110. Ratcliffe A., *Biochem. J.*, 31, 240 (1937).
111. Rogina B., Biokemija, Sveučilište u Zagrebu, 1968, str. 35.
112. Roots I. B. and P. V. Johnston, *Biochem. J.*, 94, 61 (1965).
113. Rosenthal R., *Monatsh. Chem.*, 43, 237 (1922).
114. Rouser G., G. Kritchevsky, D. Heller and E. Lieber, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40, 425 (1963).
115. Rouser G., C. Galli, E. Lieber, M. L. Blank and O. S. Privett, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41, 836 (1964).
116. Rouser G., G. Kritchevsky, C. Galli and D. Heller, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 215 (1965).
117. Rouser G., G. Kritchevsky, G. Simon and G. J. Nelson, *Lipids*, 2, 37 (1967).
118. Rouser G., and G. Kritchevsky, *Lipids*, 4, 599 (1969).
119. Sarudi I., *Z. Lebensm. Untersuch.—Forsch.*, 82, 451 (1941).
120. Sastry P. S. and M. Kates, *Biochemistry*, 3, 1271 (1964).
121. Schettler G., *Lipids and lipidoses*, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1967, str. 1—25.
122. Schormüller J., *Handbuch der Lebensmittelchemie*, Band I., Springer—Verlag, Berlin, 1965, str. 308—310.

123. Scott T. W., B. F. Good and K. A. Ferguson, *Endocrinology*, 79, 949 (1966).
124. Scott T. W., J. K. Voglmayer and B. P. Setchel, *Biochem. J.*, 102, 456 (1967).
125. Scott T. W. and R. M. C. Davson, *Biochem. J.*, 108, 457 (1968).
126. Scott T. W., W. Hansel and L. E. Donaldson, *Biochem. J.*, 108, 317 (1968).
127. Secchi G., *Ann. Fac. Econ. Commer. Univ. Studi Messina*, 4, 623 (1966).
128. Shaw N., *Biochem. J.*, 107, 329 (1968).
129. Shaw N. and F. Dinglinger, *Biochem. J.*, 112, 769 (1969).
130. Sheppard A. J., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40, 545 (1963).
131. Stakotos A. N. and G. Rouser, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 913 (1965).
132. Skipski V. P., R. F. Peterson and M. Barclay, *Biochem. J.*, 90, 374 (1964).
133. Skipski V. P., M. Barclay, F. M. Archibald, O. Terebus—Kekish, E. S. Reichman and J. J. Good, *Life Sci.*, 4, 1673 (1965).
134. Skipski V. P., A. F. Smolowe, R. C. Sullivan and M. Barclay, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 386 (1965).
135. Skipski V. P., J. J. Good, M. Barclay and R. B. Regio, *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 10 (1968).
136. Stahl E., *Thin-Layer Chromatography*, Acad. Press Inc. Publishers, New York—London, 1965, str. 75—127.
137. Stevan M. A. and D. F. Houston, *Cereal. Chem.*, 43, 353 (1966).
138. Sun G. Y. and L. A. Horrocks, *Lipids*, 3, 79 (1968).
139. Suzuki M., and M. Kobayashi, *Lipids*, 5, 539 (1970).
140. Šumarska enciklopedija, I. dio, Leksikografski zavod FNRJ, Zagreb, 1959, str. 450—459.
141. Thörner W., *Ber. Chem. Gessellsch.*, 12, 1635 (1879).
142. Tinker O. D. and D. J. Hanahan, *Biochemistry*, 5, 423 (1966).
143. Urbani M., Gljive — meso naših šuma, Poljoprivredna naklada, Zagreb, 1946, str. 17—47.
144. Vajić B., Živežne namirnice — određivanje osnovnih sastojaka, Sveučilište u Zagrebu, 1964, str. 115.
145. Vogel W. C., W. M. Doizaki and L. Zieve, *J. Lipid Res.*, 3, 138 (1962).
146. Vouk V. i I. Pevalak, *Prirodoslovna istraživanja Hrvatske i Slavonije*, 8, 18 (1916).
147. Wagenknecht A. C., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 34, 509 (1967).
148. Wajda M., *Biochem. J.*, 95, 252 (1965).
149. Ways P. and D. J. Hanahan, *J. Lipid Res.*, 5, 318 (1964).
150. Weernink R. O., *J. Sci. Food Agr.*, 12, 34 (1961).
151. Wells M. A. and J. C. Dittmer, *Biochemistry*, 2, 1259 (1963).
152. White A., P. Handler and E. L. Smith, *Principles of Biochemistry*, Mc Graw—Hill Book Comp., New York—Toronto—London, 1964, str. 61—90.
153. Wiese H. F., E. Coon, W. Yamanaka, S. Barber and P. Johnson, *J. Lipid res.*, 8, 313 (1967).
154. Zellner J., *Monatsh. Chem.*, 26, 727 (1905).
155. Zellner J., *Monatsh. Chem.*, 27, 295 (1906).
156. Zellner J. und E. Zikmunda, *Monatsh. Chem.*, 56, 200 (1930).

### Summary

Investigated were systematically edible and poisonous mushrooms of the narrower and wider environs of Zagreb, of which eight were edible, and six poisonous. All the investigated mushrooms except one edible mushroom (*Agaricus bisporus*) were wild-growing mushrooms of the Zagreb region.

Investigated were the following mushrooms:

I. Wild-growing edible mushrooms: *Amanita caesarea* Quel., *Macrolepiota procera* Sing., *Tricholoma conglobatum* Vitt., *Clitocybe tabescens* Scop., *Clavaria aurea* Fr., *Boletus edulis* Bull., *Leccinum aurantium* Bull.

II. The industrially grown edible mushroom *Agaricus bisporus* Lange.

III. Wild-growing poisonous mushrooms: *Amanita phalloides* Fr., *Amanita citrina* Gray, *Amanita pantherina* Quel., *Amanita muscaria* Hooke, *Lactarius torminosus* Fr. ex Schöff., *Boletus satanas* Lenz.

In fresh mushrooms were determined the amounts of water and dry matter.

In dried mushrooms were determined the amounts of water and total lipids.

In isolated total lipids were determined the amounts of non-polar and polar lipids, and in them the composition of higher fatty acids (relative percents) by means of gas-liquid chromatography (GLC).

On the basis of the results obtained by the determination of water, dry matter and total lipids it may be concluded as follows:

1. Fresh edible mushrooms had an average of 90,16% of water and 9,84% of dry matter.

Most of the dry matter was found in fresh *Boletus edulis* — 11,68% and least of it in *Amanita caesarea* — 8,33%.

2. Fresh poisonous mushrooms had an average of 91,40% of water and 8,60% of dry matter.

The largest amount of dry matter was found in fresh *Amanita citrina* — 9,99%, and the smallest in fresh *Amanita phalloides* — 6,90%.

3. In the dry matter of the investigated edible mushrooms were found smaller amounts of total lipids than in the dry matter of the investigated poisonous mushrooms.

The average contents of total lipids in the edible mushrooms was 5,20 g., and in the poisonous mushrooms 11,49 g. in 100 g. of dry matter.

4. The investigated mushrooms of the genus *Amanita* contain considerably greater quantities of total lipids than the investigated mushrooms of other genera.

In the genus *Amanita* are to be found only three death-causing mushrooms. In addition, there are to be found four poisonous mushrooms damaging the nervous system, and two edible mushrooms. Of these mushrooms were investigated one edible mushroom and four poisonous mushrooms.

The amounts of total lipids found in 100 g. of dry matter of the investigated mushrooms of the genus *Amanita* are:

in the edible <i>Amanita caesarea</i>	8.64 g
in the death-causing <i>Amanita phalloides</i>	13.46 g
in the poisonous <i>Amanita citrina</i>	15.74 g
in the poisonous <i>Amanita pantherina</i>	13.79 g
in the poisonous <i>Amanita muscaria</i>	10.41 g

These data bear out the conclusion that the poisonous mushrooms contain a greater amount of total lipids than the edible mushrooms.

On the basis of the experimental results of investigating the isolated total lipids it may be concluded as follows:

1. All the investigated poisonous mushrooms had considerably greater amounts of non-polar than polar lipids (Tab. 5).

Also the investigated edible mushrooms had greater amounts of non-polar lipids, but not all of them, as in the case with poisonous mushrooms (Tab. 5).

The ratios of polar (PL) to non-polar lipids (NL) in the investigated mushrooms (Tab. 5) amount to:

Edible mushrooms	PL/NL	Poisonous mushrooms	PL/NL
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3.32	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 5.24
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 2.51	<i>Amanita citrina</i>	1 : 3.94
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 1.91	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 3.92
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 1.78	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 3.42
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 1.42	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 2.47
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 1.42	<i>Boletus satanas</i>	1 : 2.19
<i>Boletus edulis</i>	1 : 1.20		
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 1		

From the presented ratios of polar to non-polar lipids are visible the differences between the amounts of polar and non-polar lipids in the investigated edible and poisonous mushrooms.

The edible mushroom *Tricholoma conglobatum* had equal amounts of polar and non-polar lipids. The rest of edible mushrooms contained slightly greater amounts of non-polar lipids than polar ones, and only *Amanita caesarea* and *Leccinum aurantium* had considerably more non-polar than polar lipids. From which it follows that the presence of greater quantity of non-polar than polar lipids is not a characteristic phenomenon of edible mushrooms.

On the basis of ratios of polar to non-polar lipids in the investigated poisonous mushrooms, it may be concluded that the characteristic of poisonous mushrooms is to contain considerably greater amounts of non-polar than polar lipids.

However, it cannot be asserted that through increase of poisonousness of the mushroom the quantity of non-polar lipids uniformly increases. This is visible from the presented ratios of polar to non-polar lipids. The most toxic mushroom viz. the death-causing *Amanita phalloides*, did not contain the greatest quantity of non-polar lipids, and thus, according to the ratio of polar to non-polar lipids, it was found to rank third.

2. In the lipids of the investigated edible and poisonous mushrooms the following fatty acids were found:

Saturated fatty acids: 12 : 0 — lauric acid, 14 : 0 — myristic acid, 15 : 0 — pentadecane acid, 16 : 0 — palmitic acid, 17 : 0 — margaric acid, 18 : 0 — stearic acid.

Unsaturated fatty acids: 14 : 1 — myristoleic acid, 16 : 1 — palmitoleic acid, 17 : 1 — heptadecene acid, 18 : 1 — oleic acid, 18 : 2 — linoleic acid, 18 : 3 — linolenic acid, 20 : 3 — eicosatrienoic acid, 20 : 4 — arachidonic acid, ) C<sub>20</sub> — a non-identified acid with more than 20 C-atoms per molecule.



3. In the lipids of all the investigated edible and poisonous mushrooms were found saturated acids such as myristic, pentadecane, palmitic and stearic acids, as well as unsaturated acids such as palmitoleic, oleic and linoleic acids (Tabs. 6—8).

4. Non-significant differences were found as to the qualitative composition of the fatty acids of the investigated edible and poisonous mushrooms.

5. Both in the non-polar and polar lipids of the edible and poisonous mushrooms were found greater amounts of unsaturated fatty acids than saturated ones (Tabs. 6—7).

The ratios of saturated fatty acids (ZMK) to unsaturated ones (NMK) in the non-polar lipids of the investigated mushrooms (Tab. 6) amount to:

Edible mushrooms	ZMK/NMK	Poisonous mushrooms	ZMK/NMK
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4.99	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 5.25
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 3.68	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3.75
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3.61	<i>Boletus satanas</i>	1 : 3.20
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 3.55	<i>Amanita citrina</i>	1 : 2.74
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 3.36	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2.57
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3.26	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 1.54
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 3.10		
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2.38		
Mean value	1 : 3.62	Mean value	1 : 3.17

Of the edible investigated mushrooms most of unsaturated fatty acids contained non-polar lipids of *Boletus edulis*, and of poisonous mushrooms non-polar lipids of *Amanita muscaria*.

The ratios of saturated fatty acids (ZMK) to unsaturated ones (NMK) in the polar lipids of the investigated mushrooms (Tab. 7) amount to:

Edible mushrooms	ZMK/NMK	Poisonous mushrooms	ZMK/NMK
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4.38	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 4.48
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 4.34	<i>Boletus satanas</i>	1 : 4.07
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 4.02	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3.84
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 3.52	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2.27
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3.12	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 2.14
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 2.22	<i>Amanita citrina</i>	1 : 1.81
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2.20		
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 2.13		
Mean value	1 : 3.24	Mean value	1 : 3.10

Of the edible investigated mushrooms the largest amount of unsaturated fatty acids had the polar lipids of *Boletus edulis*, *Amanita caesarea* and *Clitocybe tabescens*, and of poisonous mushrooms the polar lipids of *Amanita muscaria* and *Boletus satanas*.

The ratios of saturated fatty acids (ZMK) to unsaturated ones (NMK) in the total lipids of the investigated mushrooms (Tab. 8) amount to:

Edible mushrooms	ZMK/NMK	Poisonous mushrooms	ZMK/NMK
<i>Boletus edulis</i>	1 : 4.69	<i>Amanita muscaria</i>	1 : 5.01
<i>Clitocybe tabescens</i>	1 : 3.70	<i>Amanita pantherina</i>	1 : 3.76
<i>Amanita caesarea</i>	1 : 3.47	<i>Boletus satanas</i>	1 : 3.44
<i>Leccinum aurantium</i>	1 : 3.40	<i>Amanita phalloides</i>	1 : 2.50
<i>Tricholoma conglobatum</i>	1 : 3.35	<i>Amanita citrina</i>	1 : 2.50
<i>Clavaria aurea</i>	1 : 2.88	<i>Lactarius torminosus</i>	1 : 1.66
<i>Agaricus bisporus</i>	1 : 2.68		
<i>Macrolepiota procera</i>	1 : 2.31	Mean value	1 : 3.14
Mean value	1 : 3.31		

Of the edible mushrooms investigated it is *Boletus edulis* whose total lipids contain the largest amount of unsaturated fatty acids — 81,57%, to be followed by poisonous mushrooms investigated, among which the total lipids of *Amanita muscaria* contain 83,25% of total fatty acids.

When the percentages of fatty acids in lipids were converted to the dry matter of mushrooms, the author obtained results showing that the largest amount of unsaturated fatty acids found in edible mushrooms was in *Amanita caesarea* — 6,62%, while of poisonous mushrooms *Amanita citrina* contained 11,09% of total fatty acids.

The toxicity of mushrooms and the contents of unsaturated fatty acids are not interdependent. According to the amount of unsaturated fatty acid in the dry matter of a mushroom the death-causing *Amanita phalloides* ranks third, while according to the amount of unsaturated fatty acids in the total lipids it hardly ranks fourth.

6. Palmitic acid ranks first as to the quantity among saturated acids in all the investigated mushrooms, edible and poisonous, while oleic acid and linoleic acid first among unsaturated acids (Tab. 8).

7. All the investigated edible mushrooms — except *Amanita caesarea* and *Clavaria aurea* — contained more linoleic than oleic acid.

All the investigated poisonous mushrooms — except *Boletus satanas* — contained more oleic than linoleic acid.

It is not without interest to note that the edible mushroom *Amanita caesarea* had a larger amount of oleic than linoleic acid, as is the case with poisonous mushrooms of the same *Amanita* genus: *Amanita phalloides*, *Amanita citrina*, *Amanita pantherina* and *Amanita muscaria*.

It was quite the obverse with mushrooms of the genus *Boletus*. Edible mushrooms of this genus, *Boletus edulis* and *Leccinum aurantium*, and the poisonous mushroom *Boletus satanas*, had more linoleic than oleic acid.

8. The presence of the essential arachidonic acid is not an essential characteristic either of edible or poisonous mushrooms. This acid was not found in one edible mushroom, i. e. *Clavaria aurea*, also in one poisonous mushroom, *Amanita muscaria*, while it was found in other investigated mushrooms (Tab. 8).

9. Essential arachidonic acid was found only in the polar lipids of the investigated edible and poisonous mushrooms (Tab. 7). Thus for a complete (qualitative and quantitative) analysis of fatty acids is necessary

to extract from plants the total lipids and not only — as has been done so far in most cases — non-polar lipids (petroleum-ether or ether extracts) better known under the term of fats and oils or neutral lipids.

10. Of the investigated edible mushrooms *Leccinum aurantium*, *Boletus edulis* and *Tricholoma conglobatum* had the largest quantities of essential fatty acids (p. 142), so that from the nutritional viewpoint they are most valuable.

These three mushrooms are the best known domestic edible mushrooms, and they occur in abundance almost every year in the environs of Zagreb.

11. On the basis of experimental results (amounts of total lipids, polar to non-polar lipid ratios, and quantitative differences between oleic and linoleic acids) it is visible that the mushrooms of the botanical genus *Amanita* differ from the investigated mushrooms of other genera.

Investigated were the following mushrooms of the genus *Amanita*:

<i>Amanita caesarea</i>	edible mushroom
<i>Amanita phalloides</i>	death-causing mushroom
<i>Amanita citrina</i>	poisonous mushroom
<i>Amanita pantherina</i>	poisonous mushroom
<i>Amanita muscaria</i>	poisonous mushroom

All the investigated mushrooms of this genus contained greater quantities of total lipids in the dry matter (Tab. 5) than other investigated mushrooms.

In addition, all the enumerated mushrooms of the genus *Amanita* contained considerably more non-polar lipids than polar ones (Tab. 5).

Of all the investigated mushrooms of the genus *Amanita* it is characteristic that they had considerably greater amounts of oleic than linoleic acid (Tab. 8).

From the data obtained it may be inferred that mushrooms of the same genus, both edible and poisonous, have definite chemical similarities. These similarities are in the first place the amounts of total lipids, ratios of polar to non-polar lipids, and the amounts of oleic and linoleic acids.