

虎乳灵芝栽培品和野生品的脂溶性成分分析

李翁坤¹, 李甲¹, 吴冰敏¹, 林颖¹, 康华生², 刘利², 张桂芳¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 茂名市忆顺生物科技有限公司, 广东 茂名 525000)

摘要: **目的** 比较虎乳灵芝栽培品和野生品脂溶性化学成分的差异。**方法** 采用回流提取法提取虎乳灵芝野生品和栽培品(包括大米和木屑培养)菌核的脂溶性成分, 用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法分析栽培品和野生品的化学成分, 并计算各化学成分的相对百分含量。**结果** 虎乳灵芝大米、木屑栽培品及野生品分别鉴定出 11 种、10 种、14 种化合物。主要为烃类化合物, 三者共有成分为 2,4-二叔丁基苯酚、二十五烷和三十一烷等, 并且二十五烷和三十一烷在大米栽培品、木屑栽培品和野生品中相对百分含量分别为 15.85%、17.36%、16.43%和 12.01%、11.58%、19.29%。三者成分差异表现为: 大米栽培品含有麦角甾醇、二十九烷; 木屑栽培品含有二十二烷、二十三烷、二十四烷; 野生品还含有二十四烷、芥酸酰胺、邻苯二甲酸二丁酯、亚油酸乙酯。**结论** 栽培品和野生品的脂溶性成分中含有 2,4-二叔丁基苯酚、二十五烷和三十一烷等相同的化学成分, 但又存在明显的差异, 可为虎乳灵芝栽培品的质量评价和开发利用提供参考。

关键词: 虎乳灵芝; 栽培品; 野生品; 气相色谱-质谱联用法; 化学成分; 麦角甾醇

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)02-0259-04

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.016

Analysis of Liposoluble Components of Cultivated and Wild *Lignosus rhinoceros*

LI Wengkun¹, LI Jia¹, WU Bingmin¹, LIN Ying¹, KANG Huasheng², LIU Li², ZHANG Guifang¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Yishun Biological Technology Corporation, Maoming 525000 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** Analyzing the differences in fat-soluble chemical composition between cultivated and wild *Lignosus rhinoceros*. **Methods** The sclerotium of *Lignosus rhinoceros* was artificially cultivated, and then, the liposoluble components were extracted from sclerotium by refluxing extraction with petroleum ether, and the difference in chemical compositions between cultivated (in rice and in sawdust, respectively) and wild *Lignosus rhinoceros* were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The relative percentages of components were also calculated. **Results** Eleven, 10 and 14 compounds were identified from the ingredients in petroleum ether extracts of the rice group(RP), sawdust group(SP), and wild group(WP) respectively. The majority of them are hydrocarbon compounds. The common components are 2, 4-Di-tert-butylphenol, pentacosane and hentriacontane. The relative percentage contents of pentacosane and hentriacontane were 15.85%, 17.36%, 16.43% and 12.01%, 11.58%, 19.29% for RP, SP and WP, respectively. The difference of these three are: the ingredients of the rice group mainly contain Ergosterol and Nonacosane; those of the sawdust group mainly contain Docosane, Tricosane, Tetracosane; those of wild group varieties mainly contain Tetracosane, Erucylamide, Dibutyl phthalate, and 9, 12-Octadecadienoic acid(Z, Z)-, ethyl ester. **Conclusion** The lipophilic composition in petroleum ether extracts of cultivated and wild *Lignosus rhinoceros* are identical, which included 2, 4-Di-tert-

收稿日期: 2020-05-27

作者简介: 李翁坤, 男, 硕士研究生, 研究方向: 濒危药用植物的繁育与开发。Email: lwk8436@163.com。通信作者: 张桂芳, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 濒危药用植物的繁育与开发。Email: zhanggf@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省中药新药研发重点实验室开放课题项目(2017B030314096); 国家中医药管理局全国中药资源普查项目(GZY-KJS-2018-004)。

butylphenol, pentacosane and hentriacontane; but there are clear differences. These findings provide reference for the quality evaluation and utilization of cultivated products of *Lignosus rhinocerus*.

Keywords: *Lignosus rhinocerus*; cultivated products; wild species; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); chemical compositions; Ergosterol

虎乳灵芝 [*Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryv], 又称虎乳芝、虎奶菌、老虎奶, 隶属于多孔菌科 Polyporaceae 虎乳灵芝属 *Lignosus*, 主要分布于马来西亚、菲律宾、印度尼西亚以及中国海南等地区^[1]。其菌核具有良好的药用价值, 用于治疗慢性、过敏性、虚寒型顽咳, 小儿咳嗽, 哮喘^[2]。现代研究^[3-4]表明虎乳灵芝具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌等作用, 对免疫系统、呼吸系统以及神经系统也有一定的生理活性^[5-7]。Mohanarji 等^[8]研究虎乳灵芝提取物对真菌和细菌生长的抑制作用, 发现虎乳灵芝石油醚提取物能有效抑制肺炎克雷伯菌和总状毛霉的生长。Nallathamby 等^[9]研究发现虎乳灵芝脂溶性物质对脑小胶质细胞具有体外抗氧化和抗神经炎活性, 且无细胞毒性。目前尚未见虎乳灵芝脂溶性成分分析研究。因此, 本研究采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 法对比分析虎乳灵芝栽培品 (包括大米和木屑培养) 和野生品的脂溶性成分, 比较他们的差异, 以期为建立人工栽培虎乳灵芝菌核的质量控制和开发利用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 7890B-5977A 型安捷伦气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); DHP-9272 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 材料 实验所用野生虎乳灵芝采摘于海南省保亭县, 经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室林颖讲师及华大基因分子鉴定为虎乳灵芝 (*Lignosus rhinocerus*); 栽培品虎乳灵芝由广州中医药大学中医药数理工程研究院组织培养实验室培养, 覆土培养于茂名市电白区虎乳灵芝栽培基地; 粳米 (福临门清香米, 中粮国际有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA, 广东环凯微生物有限公司); 石油醚 (沸程: 30~60 °C) 及其他试剂均为分析级。

2 方法

2.1 人工培养虎乳灵芝 取野生虎乳灵芝菌核内部菌

丝体, 置于 PDA 培养基活化, 接种至灭菌的木屑培养基 (木屑 72%、麸皮 22%、黄豆粉 2%、石膏 1%、葡萄糖 3%; 水: 固体培养料质量比为 65:35) 和大米培养基 (粳米 86%、麸皮 4%、葡萄糖 8%、KH₂PO₄ 1%、MgSO₄ 1%; 水与固体培养料质量比为 65:35) 中, 在恒温箱中避光培养, 待培养基完全长满菌丝后, 将木屑培养基覆土培养 3 个月, 大米培养基继续在恒温箱中培养 3 个月, 直至菌核长至直径为 3~5 cm 后, 采收菌核。

2.2 虎乳灵芝脂溶性成分的提取 将虎乳灵芝菌核低温 (30 °C) 烘干, 粉碎, 过 40 目筛。分别取大米、木屑培养的灵芝菌核和野生虎乳灵芝菌核粉末 10 g, 精密称定, 加入 150 mL 石油醚在室温条件下浸提 24 h 后, 置于索氏提取器中回流提取 4 h, 冷却至室温, 减压回收石油醚, 加入氯仿 2 mL 溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即为供试液。

2.3 GC 条件 HP-5ms Ultra Inert 色谱柱 (30 m × 250 μm, 0.25 μm); 进样口温度 250 °C; 载气: He; 升温程序: 初始温度 70 °C, 保持 1 min; 以 10 °C·min⁻¹ 升至 220 °C, 保持 1 min; 以 5 °C·min⁻¹ 升至 300 °C, 保持 5 min; 进样流速: 1 μL·min⁻¹; 进样量: 1 μL; 分流比: 10:1。

2.4 MS 条件 EI 离子源; 离子源温度: 230 °C; 四级杆温度: 150 °C; 接口温度: 280 °C; 质量扫描范围 (*m/z*): 45~800, 溶剂延迟 3 min。

2.5 数据分析 虎乳灵芝石油醚提取物经气相色谱-质谱联用仪分离分析, 将所得结果经计算机自动检索, 与 NIST14 标准质谱检索库对照, 并采用峰面积归一化法计算各组分的相对百分含量。

3 结果

栽培和野生虎乳灵芝的脂溶性成分经 GC-MS 法分离检测, 共鉴定出 23 种成分, 大米栽培品、木屑栽培品及野生品分别鉴定出 11 种、10 种、14 种。以峰面积归一化法测定栽培品和野生品的化学性成分, 各成分的相对百分含量见表 1。

表 1 栽培和野生虎乳灵芝菌核脂溶性成分

Table 1 The components dissolved in petroleum ether of sclerotin in cultivated and wild *Lignosus rhinocerus* analyzed by GC-MS

序号	化合物名称	分子式	相对百分含量/%		
			大米栽培品	木屑栽培品	野生品
1	枯烯	C ₈ H ₁₂	0.77	-	1.04
2	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₈ H ₂₂ O	1.44	0.75	2.75
3	十四甲基环庚硅氧烷	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si ₇	-	-	0.48
4	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	8.06	-	8.06
5	麦角甾醇	C ₂₈ H ₄₄ O	23.01	-	-
6	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	0.61
7	(22E)-5α-麦角甾-14,22-二烯-3β-醇	C ₂₈ H ₄₆ O	9.45	-	-
8	亚油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	-	-	1.73
9	十八烯酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	-	-	1.02
10	3-乙基-5-(2-乙基丁基)十八烷	C ₂₆ H ₅₄	1.76	-	-
11	二十烷	C ₂₀ H ₄₂	-	1.21	-
12	二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	-	7.30	-
13	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	-	16.42	-
14	二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	-	22.39	-
15	二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	-	21.54	19.94
16	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	-	0.35	0.86
17	(Z)-三十五碳-17-烯	C ₃₅ H ₇₀	4.30	-	-
18	二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	15.85	17.36	16.43
19	二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	-	-	1.23
20	芥酸酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	-	-	12.32
21	二十九烷	C ₂₉ H ₆₀	21.90	-	-
22	三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	12.01	11.58	19.29
23	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-十六甲基八硅氧烷	C ₁₆ H ₅₀ O ₇ Si ₈	1.45	1.06	1.51

注：“-”表示未检测出

栽培品与野生品共有成分有 8 种，分别为枯烯、2,4-二叔丁基苯酚、邻苯二甲酸二丁酯、二十四烷、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)、二十五烷、三十一烷、1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-十六甲基八硅氧烷。其中，大米栽培品、木屑栽培品及野生品均共有的成分有 4 种(2,4-二叔丁基苯酚、二十五烷、三十一烷、1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-十六甲基八硅氧烷)，大米栽培品和野生品共有的成分有 2 种(枯烯、邻苯二甲酸二丁酯)，木屑栽培品与野生品共有的成分有 2 种[(二十四烷、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)]。

大米栽培品独有成分有 5 种，分别为麦角甾醇、

(22E)-5α-麦角甾-14,22-二烯-3β-醇、3-乙基-5-(2-乙基丁基)十八烷、(Z)-三十五碳-17-烯、二十九烷；木屑栽培品独有成分有 4 种，分别为二十烷、二十一烷、二十二烷、二十三烷；野生品独有成分有 6 种，分别为十四甲基环庚硅氧烷、棕榈酸乙酯、亚油酸乙酯、十八烯酸乙酯、二十七烷、芥酸酰胺。从成分种类分析，栽培品与野生品之间有明显差异，而不同的栽培品之间也有较大差异。

从成分相对含量分析，大米栽培品中麦角甾醇含量较高，相对百分含量为 23.01%；其次为烷烃类化合物，相对百分含量为 55.80%，主要有二十五烷(15.85%)、二十九烷(21.90%)、三十一烷(12.01%)等。木屑栽培品中烷烃化合物相对百分含量达 97.80%，主要有二十二烷、二十三烷、二十四烷、二十五烷和三十一烷，相对百分含量分别为 16.42%、22.39%、21.54%、17.36%、11.58%。野生品检出成分包括二十四烷(19.94%)、二十五烷(16.43%)、芥酸酰胺(12.32%)和三十一烷(19.29%)等烃类化合物，另外还检出少量的脂肪酸酯化合物，包括邻苯二甲酸二丁酯(8.06%)、棕榈酸乙酯(0.61%)、亚油酸乙酯(1.73%)、十八烯酸乙酯(1.02%)。

4 讨论

本研究分析了虎乳灵芝栽培品和野生品脂溶性成分，结果显示，虎乳灵芝主要成分为烃类化合物，三者共有成分为 2,4-二叔丁基苯酚、二十五烷和三十一烷等，并且二十五烷和三十一烷在大米栽培品、木屑栽培品和野生品中相对百分含量分别为 15.85%、17.36%、16.43% 和 12.01%、11.58%、19.29%。三者成分差异表现为：大米栽培品含有麦角甾醇、二十九烷；木屑栽培品含有二十二烷、二十三烷、二十四烷；野生品还含有二十四烷、芥酸酰胺、邻苯二甲酸二丁酯、亚油酸乙酯。虎乳灵芝野生品的脂溶性成分多为烃类化合物和脂肪酸酯类化合物，并且脂肪酸酯的相对百分含量少于烃类化合物，验证了虎乳灵芝是一种低脂肪的药食两用真菌^[10]。除此之外，相对于野生品，栽培品中几乎不含有脂肪酸酯类化合物，木屑栽培的虎乳灵芝脂溶性成分均为烃类化合物，而大米栽培的虎乳灵芝脂溶性成分也大致和木屑栽培的相似，但大米栽培品中含有甾醇类化合物，如麦角固醇、(22E)-5α-麦角

甾-14, 22-二烯-3 β -醇。麦角甾醇为主要存在于菌类中的一种化合物^[11], 是微生物细胞膜的重要组成部分^[12], 对保证细胞膜的完整性、细胞活力以及细胞物质运输等起着重要作用, 并有降脂、抗肿瘤作用^[13-14]。这为以提高麦角甾醇含量为目的的人工培养虎乳灵芝提供了研究方向。本研究为人工栽培虎乳灵芝菌核的质量控制提供了一定的依据, 并为人工栽培虎乳灵芝提供了思路。

参考文献:

- [1] 黄年来. 一种药用菌——虎乳灵芝学名的鉴定[J]. 食用菌学报, 1999, 6(1): 30-32.
- [2] 胡婷. 虎乳灵芝多糖的多级结构及溶液行为研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [3] NALLATHAMBY N, PHAN C, SEOW S L, et al. A Status review of the bioactive activities of Tiger Milk mushroom *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryvarden[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 998.
- [4] LEE M L, TAN N H, FUNG S Y, et al. The Antiproliferative activity of sclerotia of *Lignosus rhinocerus* (Tiger Milk Mushroom)[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 2012: 697603.
- [5] GUO C X, WONG K H, CHEUNG P C K, et al. Hot water extract of the sclerotium of *Polyporus rhinocerus cooke* enhances the immune functions of murine macrophages[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2011, 13(3): 234-244.
- [6] EIK L, NAIDU M, DAVID P, et al. *Lignosus rhinocerus* (cooke) Ryvarden: a medicinal mushroom that stimulates neurite outgrowth in PC-12 cells[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012: 320308.
- [7] LEE M K, LI X J. Airway relaxation effects of water-soluble sclerotial extract from *Lignosus rhinocerotis*[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 461.
- [8] MOHANARJI S, DHARMALINGAM S, KALUSALINGAM A. Screening of *Lignosus rhinocerus* extracts as antimicrobial agents against selected human pathogens[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2012, 18(11): 1-4.
- [9] NALLATHAMBY N, SERM L G, RAMAN J, et al. Identification and in vitro evaluation of lipids from sclerotia of *Lignosus rhinocerotis* for antioxidant and anti-neuroinflammatory activities[J]. *Natural Product Communications*, 2016, 11(10): 1485-1490.
- [10] JAMIL N M N, RSHID N M N, ABD HAMID M H, et al. Comparative nutritional and mycochemical contents, biological activities and LC/MS screening of tuber from new recipe cultivation technique with wild type tuber of tiger's milk mushroom of species *Lignosus rhinocerus*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 34: 1-10.
- [11] 陈路林, 李吉来, 宁德山, 等. 灵芝孢子油中麦角甾醇含量测定方法研究[J]. *中药材*, 2008, 31(12): 1843-1845.
- [12] 刘京晶, 黄文华, 吕明亮, 等. HPLC法测定不同品种及段木栽培灵芝子实体中麦角甾醇含量[J]. *中药材*, 2011, 34(2): 187-190.
- [13] 崔丹丹. 香菇麦角甾醇的降脂功效研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [14] 吴梅佳, 黄挺, 米完完, 等. 麦角甾醇与顺铂联合用药协同抑制人肺癌A549细胞增殖[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(6): 433-440.

(编辑: 梁进权)