

西藏白肉灵芝三萜高效液相检测分析及含量测定

谢 荣^{1*}, 韩俊杰², 宝 丽², 刘宏伟²

(1. 西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850032; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100000)

摘 要:通过高效液相检测分析了西藏拉萨国家农业科技示范园区2017—2020年日光温室栽培的白肉灵芝不同形式样品的三萜含量。图谱比对结果表明,孢子粉、液体发酵培养均不如子实体栽培三萜含量高,组分丰富,连作障碍影响三萜含量,水杨酸蕾期喷施对三萜含量有影响,其中喷施浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时较高,组分差异不大。传统灵芝三萜相对含量最丰富,说明水杨酸诱导三萜生物合成有一定作用,只能刺激部分白肉灵芝特有萜组分形成。

关键词:西藏;白肉灵芝;三萜;高效液相;水杨酸

中图分类号:S567.3⁺1

文献标志码:A

Triterpenoids of *Ganoderma Leucocontextum* in Tibet HPLC Analysis and Content Determination

XIE Rong^{1*}, HAN Junjie², BAO Li², LIU Hongwei²

(1. Institute of Vegetable, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet Lhasa 850032, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 10000, China)

Abstract: The content of triterpenoids in different forms of *Ganoderma leucocontextum* cultivated in Solar Greenhouse in Lhasa national agricultural science and technology demonstration park from 2017 to 2020 was analyzed by HPLC. The results showed that spore powder and liquid fermentation culture were not as good as fruiting body culture with high triterpene content and rich components. Continuous cropping obstacles affected the content of triterpenoids, and salicylic acid spraying in bud stage had an impact on the content of triterpenoids, of which 100 $\mu\text{mol/L}$ was higher, and there was little difference in components. Among them, the relative content of triterpenoids was mostly abundant in traditional *Ganoderma lucidum*, indicating that salicylic acid induced triterpenoid biosynthesis has a certain effect, which can only stimulate the formation of some unique triterpenoid components of *Ganoderma leucocontextum*.

Key Words: Tibet; *Ganoderma leucocontextum*; Triterpenoids; High performance liquid chromatography; Salicylic acid

西藏白肉灵芝自2014年在拉萨国家农业科技示范园区驯化栽培成功^[1]后,在拉萨市曲水县聂当乡、才纳乡,林芝市巴宜区、工布江达县巴河镇、米林县、波密县的脱贫攻坚中发挥了重要作用。三萜作为白肉灵芝的主要药效成分^[2-7],白肉灵芝相关产品的开发,需提供品质稳定的原料,不同生长环境对其三萜成分有何影响目前尚无研究。因此,本

研究采用化学分光光度法和高效液相色谱(HPLC),测定和分析了孢子粉、液体发酵和不同来源的子实体中三萜含量和组分种类。有研究指出,在赤芝生长初期即原基期,喷施一定剂量的水杨酸会刺激子实体中三萜的生成^[8,9],水杨酸是否对白肉灵芝的三萜合成有同样作用,目前均尚未有报道。本研究为栽培白肉灵芝三萜的开发利用及质量控制和标准化提供依据。

1 材料与方法

供试样品见表1。

收稿日期:2021-03-04

基金项目:西藏自治区自然科学基金(XZ2019ZRG-89Z);国家食用菌产业技术体系拉萨试验站(CARS-20)

作者简介:谢 荣(1981-),男,副研究员,硕士,主要从事西藏野生食用菌资源研究与利用及栽培技术推广工作,E-mail:xr-20082004@163.com。

表1 供试样品列表

序号	名称	样品来源
1	2019(子实体磨粉)	2019年栽培
2	2019-1号棚(子实体)	2019年栽培
3	2018基地(子实体)	2018年栽培
4	2017基地(子实体)	2017年栽培
5	2018(孢子粉)	2018年栽培
6	2019(孢子粉)	2019年栽培
7	发酵罐菌丝体	液体发酵培养
8	发酵液乙酸乙酯萃取后旋蒸部分	
9	林芝1号(子实体)	2019年收集林芝市5个不同产地栽培种,种于拉萨国家农业科技示范园区E区高效日光温室4号棚
10	林芝2号(子实体)	
11	林芝3号(子实体)	
12	林芝4号(子实体)	
13	林芝5号(子实体)	米林县2种不同颜色子实体
14	灵芝甲(子实体)	
15	灵芝乙(子实体)	山南市乃东区栽培
16	乃东(子实体)	
17	波密(子实体)	林芝市波密县栽培
18	巴河(子实体)	林芝市工布江达县巴河镇栽培
19	水杨酸混合(子实体磨粉)	2019年水杨酸50 μmol/L, 100 μmol/L, 200 μmol/L, 400 μmol/L, 800 μmol/L, 1600 μmol/L, 6个浓度处理,蕾期喷施于料面、原基、子实体,每周1次,每个处理至少300袋
20	5号棚水杨酸50(子实体)	
21	5号棚水杨酸100(子实体)	
22	5号棚水杨酸200(子实体)	
23	5号棚水杨酸400(子实体)	
24	5号棚水杨酸800(子实体)	
25	5号棚水杨酸1600(子实体)	
26	CK	2020年水杨酸100 μmol/L, 200 μmol/L, 400 μmol/L, 800 μmol/L, 1600 μmol/L, 5个浓度处理,CK为不喷施,蕾期喷施于料面、原基、子实体,每周1次,每个处理至少300袋
27	100	
28	200	
29	400	
30	800	
31	1600	

1.1 总三萜含量测定方法:

(1)将白肉灵芝子实体放在50℃的烘箱,20 h后取出,粉碎,过60目的筛备用。

(2)供试品溶液的制备 取(1)的样品5 g,精密称定,置于圆底烧瓶,加入100 mL乙醇,回流提取2 h,滤去滤渣,即得供试品溶液。

(3)对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品20.00 mg,加甲醇定容至100 mL,即得0.20 mg/mL的对照品溶液。

(4)显色方法 灵芝总三萜含量的测定采用冰醋酸-香草醛法。精密量取供试品溶液或对照品溶液置于15 mL具塞试管中,挥干,放冷,精密加入现配的冰醋酸-香草醛溶液(精密称取香草醛0.5 g,加冰醋酸使溶解成10 mL,即得)、0.2 mL、高氯酸0.8 mL,摇匀,在70℃水浴中加热15 min,立即置冰浴中冷却5 min,取出,精密加入乙酸乙酯4 mL,摇匀,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在546 nm波长处测定吸光度。

(6)标准曲线的制备 按照中国药典的方法:精密量取对照品溶液0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,0.6 mL,0.8 mL,分别置15 mL具塞试管中,挥干,放冷,精密加入新配制的香草醛-冰醋酸溶液(精密称取香草醛0.5g,加冰醋酸使溶解成10 mL,即得)0.2 mL高氯酸0.8 mL,摇匀,在70℃水浴中加热15 min,立即置冰浴中冷却5 min,取出,精密加入乙酸乙酯4 mL,摇匀,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在546 nm波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线。得到线性回归方程为 $y=5.4062x-0.0403$,相关系数 $R=0.9995$,表明方程拟合度较好。

1.2 HPLC分析方法:

流速:1 mL/min,色谱柱:YMC,C18,250 min×4.6 mm,检测波长254 nm,高效液相洗脱流程见表2。

表2 高效液相洗脱流程

时间/min	色谱乙腈/%	酸水(纯水+0.01%三氟乙酸)/%
0.01	10	90
12.00	38	62
27.00	38	62
45.00	75	25
55.00	100	0
70.00	100	0

2 结果分析

图1结果显示,在连作2年的前提下,2019年栽培的白肉灵芝三萜质量比下降明显,2020年栽培的白肉灵芝三萜质量比又有所恢复,为16.8 mg/g。

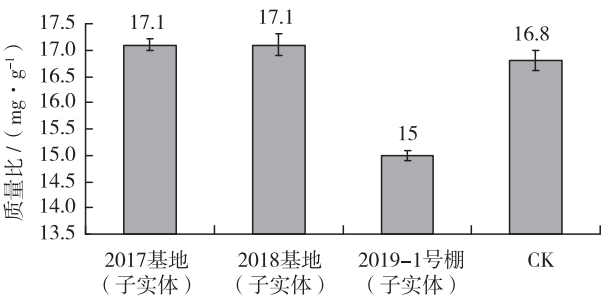


图1 2017—2020年连作栽培三萜含量变化

根据三萜来源和结构差异将液相图谱三萜组分划分为:混源萜类化合物、白肉灵芝特有灵芝三萜、传统灵芝三萜、三萜法尼基复合物类,其中传统灵芝三萜即为赤芝常见的种类。表3和图2结果显示,孢子粉中三萜含量较低,只有极少量的混源萜类化合物、传统灵芝三萜及三萜法尼基,基本不含白肉特有灵芝三萜,丰富程度低。

表3 供试样品三萜含量

序号	名称	三萜质量比(mg·g ⁻¹)
1	2019(子实体磨粉)	16.5±0.1
2	2019-1号棚(子实体)	15.0±0.1
3	2018基地(子实体)	17.1±0.2

续表

序号	名称	三萜质量比(mg·g ⁻¹)
4	2017基地(子实体)	17.1±0.1
1	2018(孢子粉)	4.2±0.3
2	2019(孢子粉)	5.3±0.1
3	发酵罐菌丝体	5.9±0.3
4	发酵液乙酸乙酯萃取后旋蒸部分	0.8±0.5
5	林芝1号(子实体)	15.6±0.1
6	林芝2号(子实体)	16.9±0.1
7	林芝3号(子实体)	14.5±0.2
8	林芝4号(子实体)	15.9±0.2
9	林芝5号(子实体)	17.7±0.2
10	灵芝甲(子实体)	18.0±0.1
11	灵芝乙(子实体)	18.2±0.4
12	乃东(子实体)	18.4±0.2
13	波密(子实体)	19.5±0.2
14	巴河(子实体)	23.1±0.1
15	水杨酸混合(子实体磨粉)	19.8±0.3
16	5号棚水杨酸50(子实体)	20.6±0.2
17	5号棚水杨酸100(子实体)	24.5±0.6
18	5号棚水杨酸200(子实体)	21.5±0.1
19	5号棚水杨酸400(子实体)	21.4±0.3
20	5号棚水杨酸800(子实体)	21.8±0.1
21	5号棚水杨酸1600(子实体)	22.2±0.2
22	CK	16.8±0.2
23	100	17.8±0.4

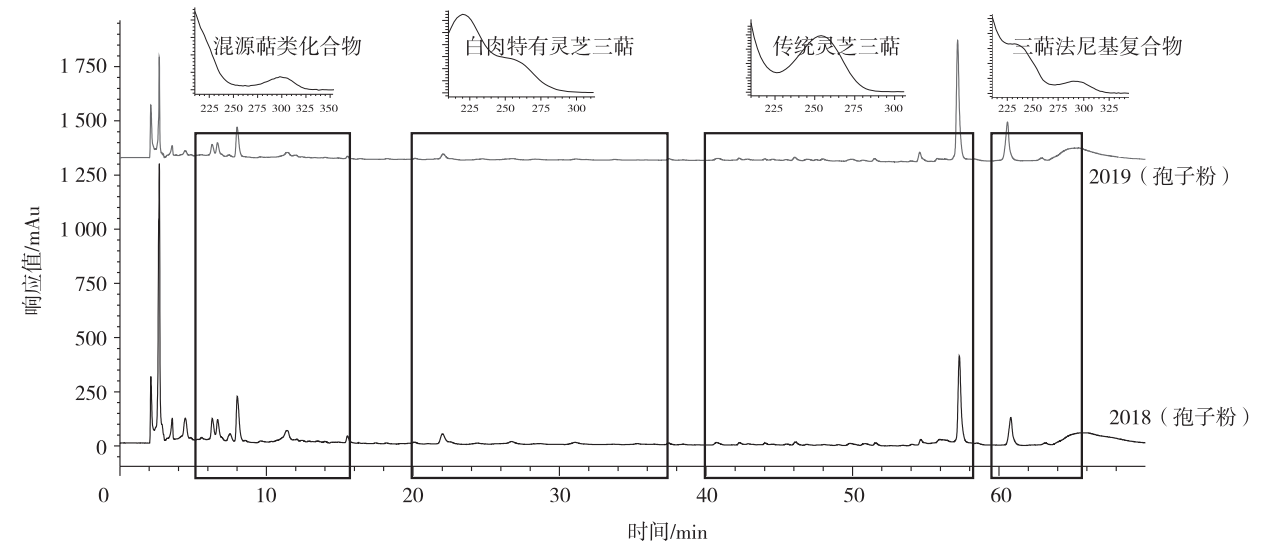


图2 孢子粉三萜组分

续表

序号	名称	三萜质量比(mg·g ⁻¹)
24	200	17.5±0.1
25	400	16.4±0.3
26	800	15.7±0.4
27	1600	16.2±0.3

图3结果显示,发酵菌丝体中含有少量的传统灵芝三萜及三萜法尼基复合物化合物,而发酵液乙酸乙酯萃取后旋蒸部分中几乎不含三萜化合物。

图4结果显示,乃东和波密的混源萜类化合物、白肉特有灵芝三萜、传统灵芝三萜及三萜法尼

基的化合物成分组成基本没有差异,巴河三萜化合物丰富度高于乃东和巴河。

表3、图1和图5结果显示,在连作两年前提下,2019年栽培的白肉灵芝三萜质量比下降明显,2020年栽培的白肉灵芝三萜质量比又有所恢复,为16.8 mg/g。

图6结果显示,白肉特有灵芝三萜和传统灵芝三萜化合物在林芝1-5号中相对含量较高,林芝2号、5号三萜含量较高与液相图谱结构一致。

图7结果显示,同一栽培地,不同颜色子实体白肉灵芝特有灵芝三萜、传统灵芝三萜及三萜法尼基复合物的含量在中基本没有差异。

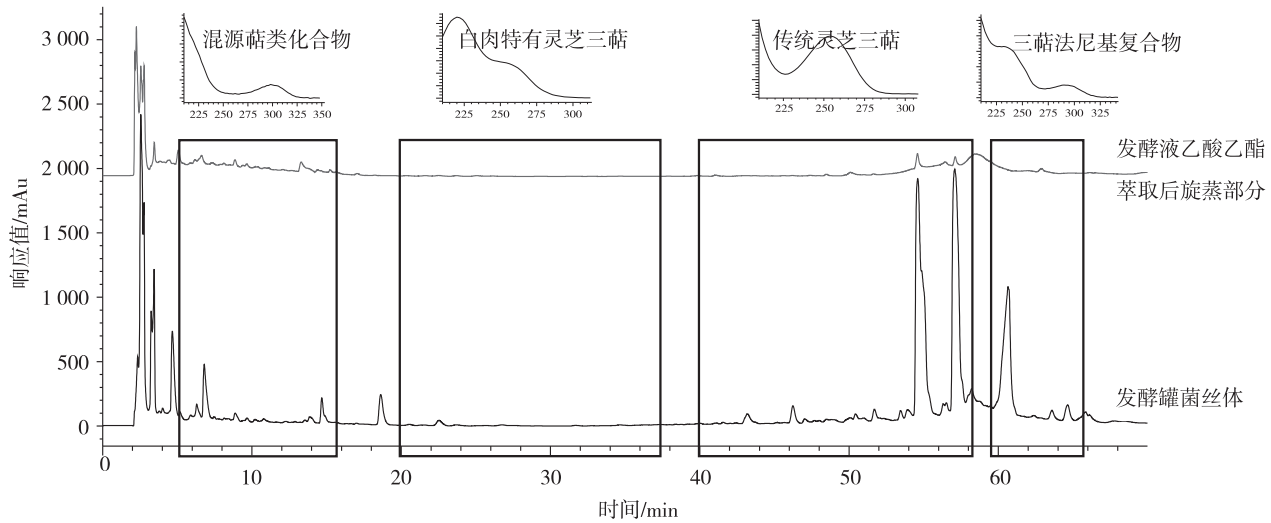


图3 液体发酵培养三萜组分

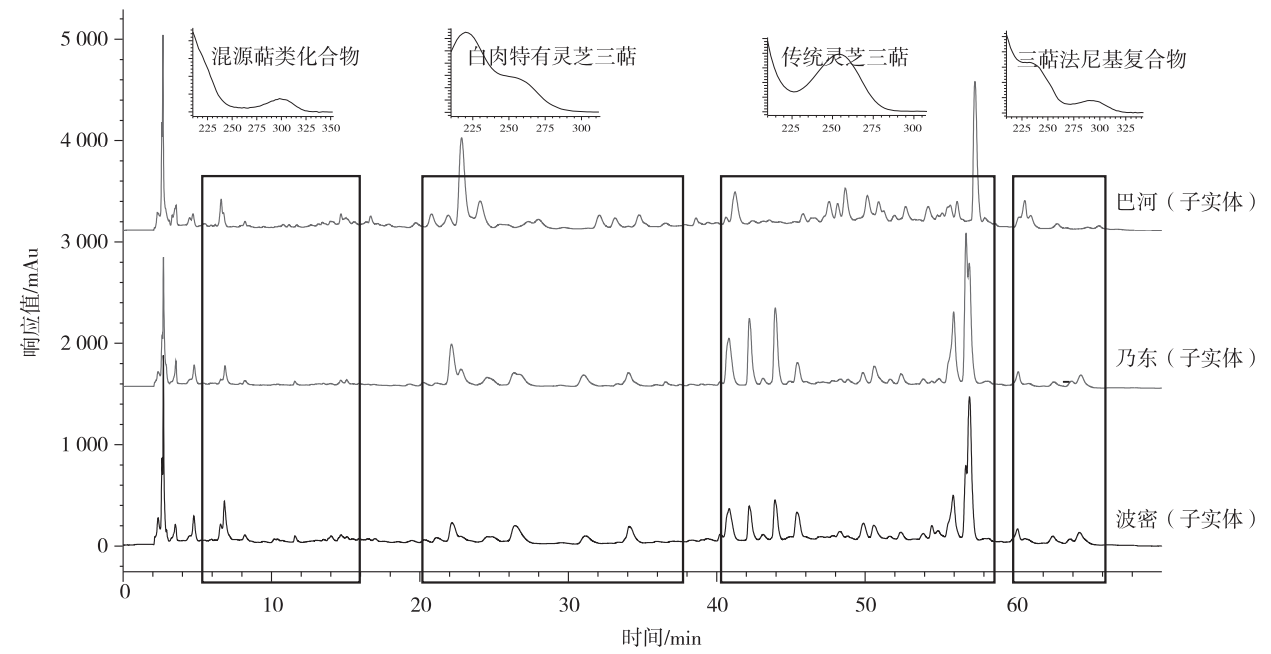


图4 不同栽培地三萜组分差异

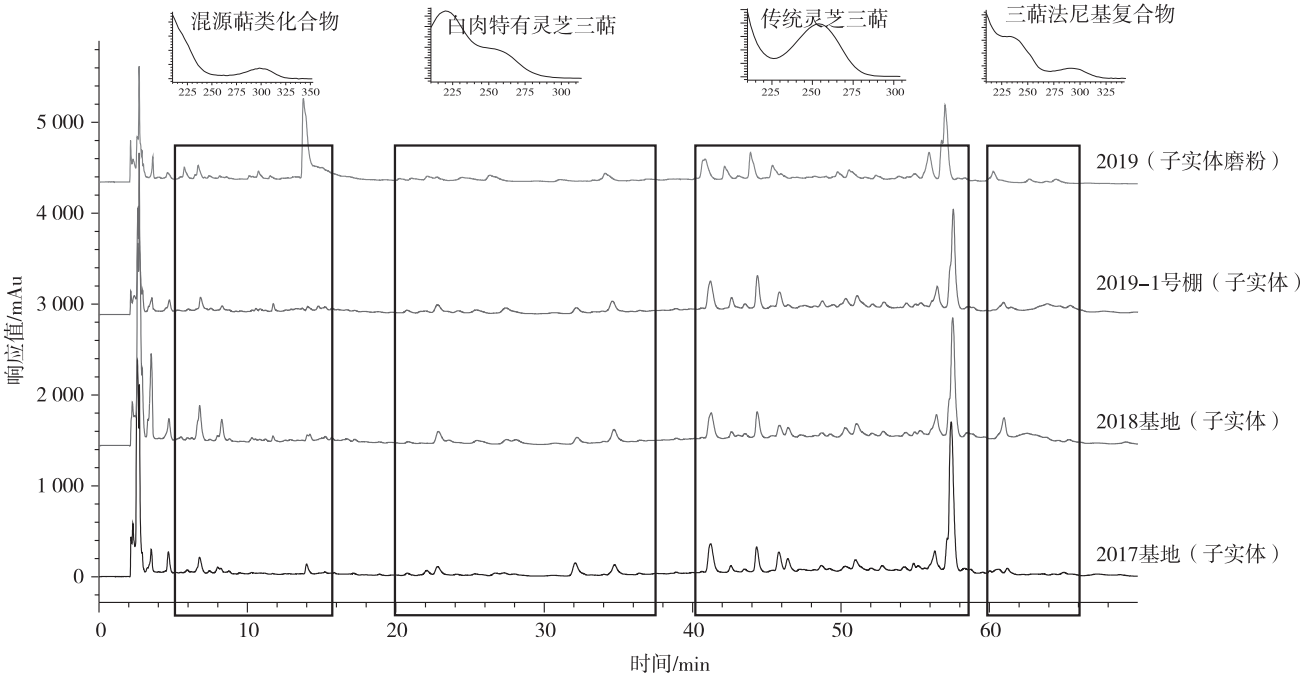


图5 不同年份三萜组分差异

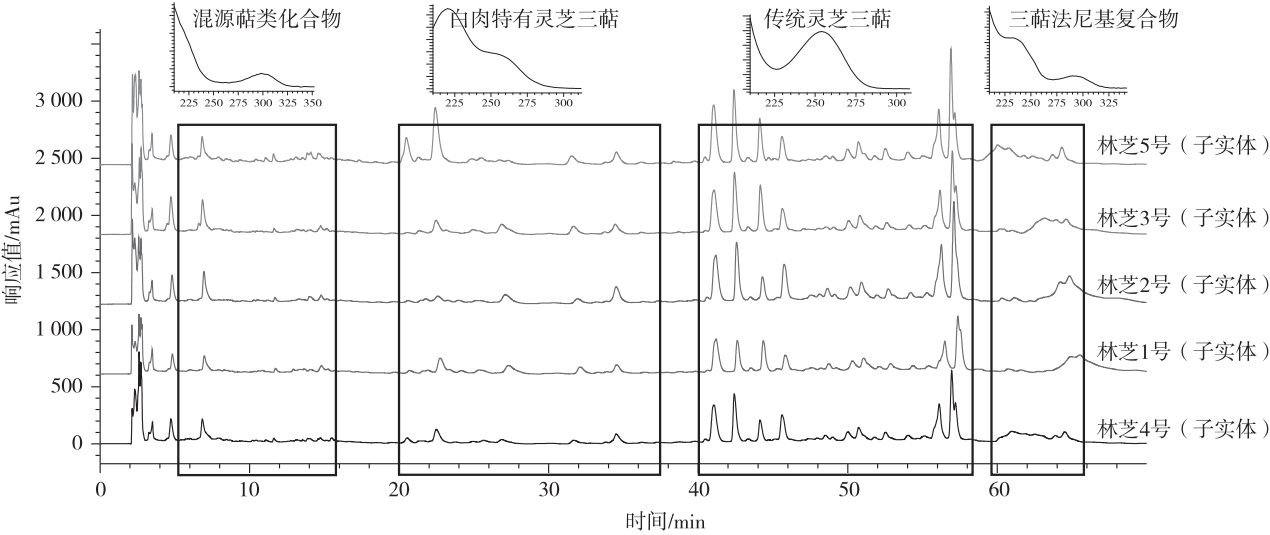


图6 不同产地来源栽培种在同一日光温室栽培三萜组分差异

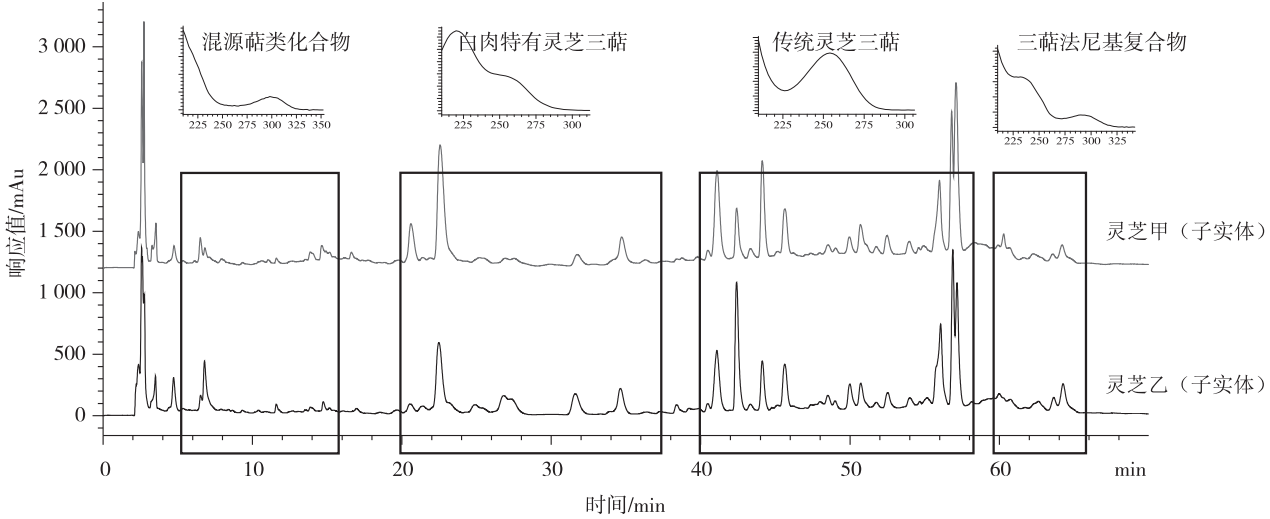


图7 米林县栽培2种不同颜色子实体三萜组分差异

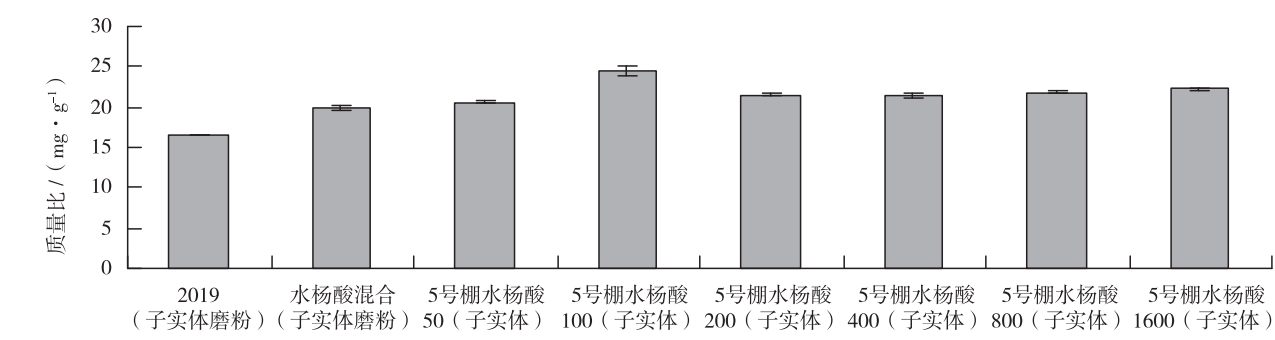


图8 2019年水杨酸蕾期喷施诱导试验

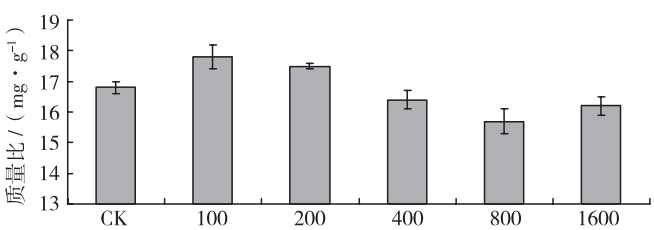


图9 2020年水杨酸蕾期喷施诱导试验

图8和图9结果表明,水杨酸蕾期喷施浓度100 μmol/L时三萜质量比增加显著。

图10结果表明,5号棚中白肉特有灵芝三萜和传统灵芝三萜化合物相对含量较高,其中5号棚水杨酸100三萜质量比最高,水杨酸混合部分三萜质量比略低。

图11结果表明,灵芝CK,100,200,400,800,1600样品间成份差异不大,其中传统灵芝三萜相对质量比最丰富,灵芝100总三萜质量比略高。

3 结 论

孢子粉、液体发酵培养均不如子实体栽培三萜含量高,组分丰富;同一产地连作三萜含量有下降趋势,与不同产地、不同来源栽培种同一地栽培比较,在组分上丰富度也明显下降,尤其是白肉灵芝特征三萜几乎没有。浓度为100 μmol/L的水杨酸蕾期诱导喷施试验总三萜含量略高,组分差异不大,其中传统灵芝三萜相对含量最丰富,说明水杨酸诱导三萜生物合成有一定作用,只能刺激部分白肉灵芝特有三萜组分形成。

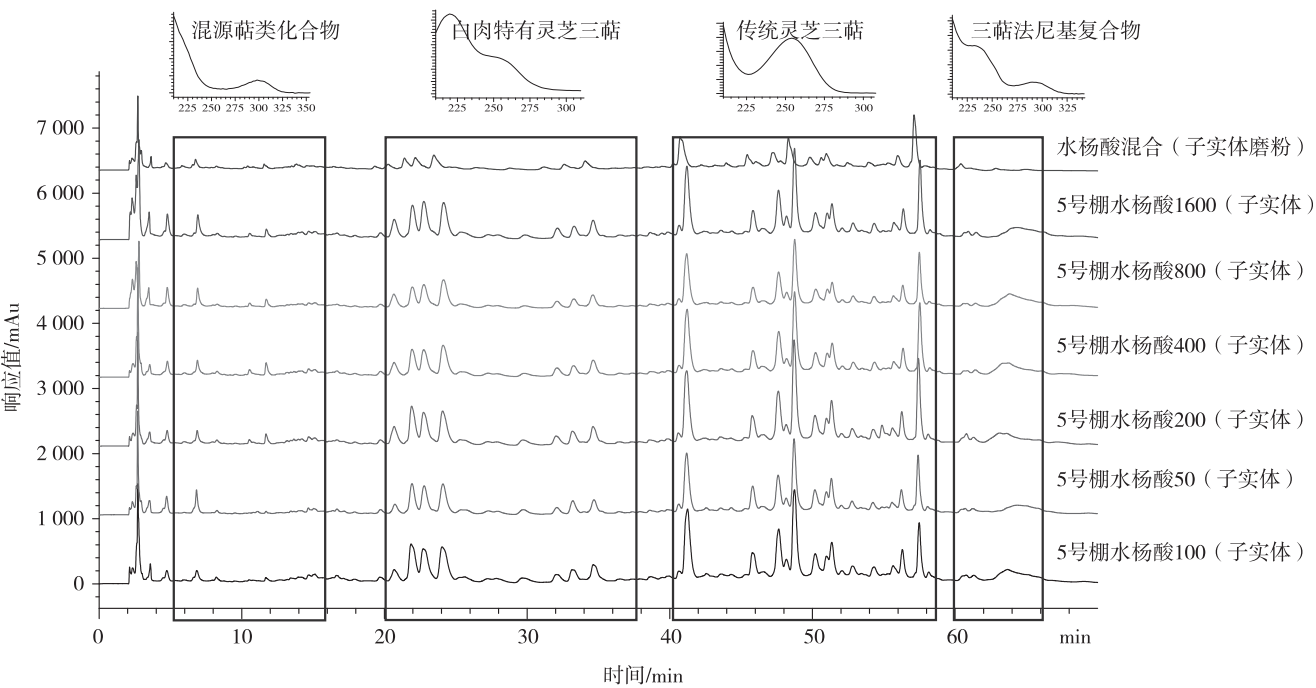


图10 5号棚水杨酸诱导试验三萜组分差异

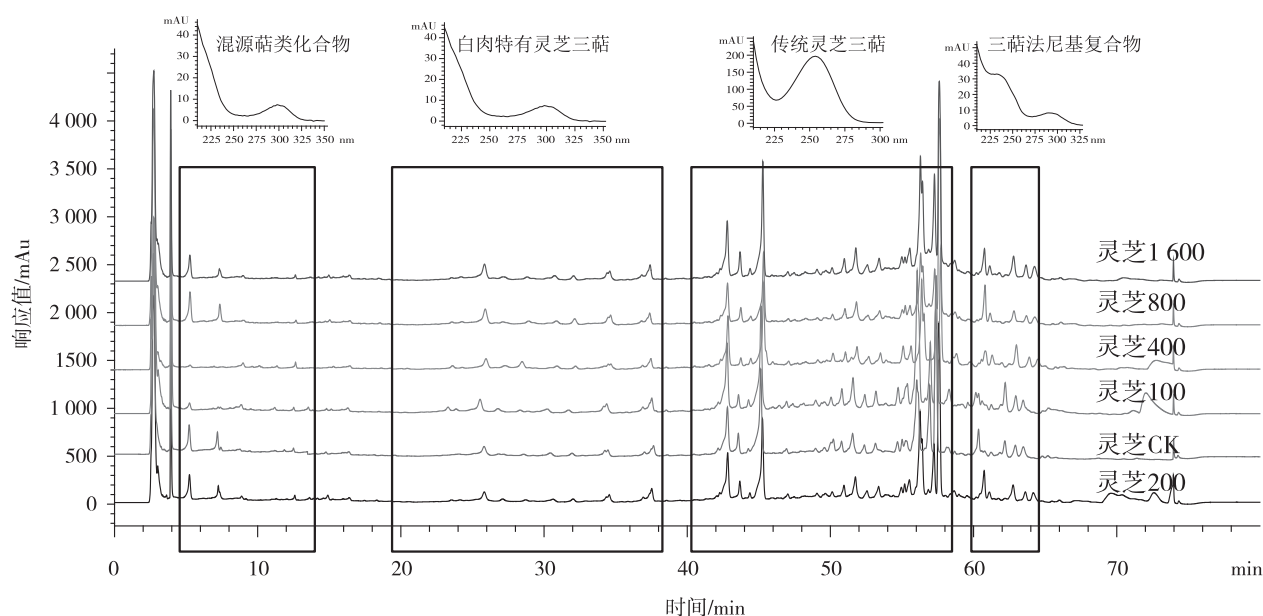


图11 2020年水杨酸诱导试验三萜组分差异

参考文献:

- [1] 谢荣. 西藏白肉灵芝栽培关键技术 [J]. 食用菌, 2017, 39(5): 59-61.
- [2] WANG K, BAO L, MA K, et al. A Novel Class of α -Glucosidase and HMG-CoA Reductase Inhibitors from *Ganoderma leucocontextum* and the Anti-Diabetic Properties of Ganomycin I in KK-Ay Mice [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 127: 1035-1046.
- [3] WANG K, BAO L, XIONG W P, et al. Lanostane Triterpenes from the Tibetan Medicinal Mushroom *Ganoderma leucocontextum* and Their Inhibitory Effects on HMG-CoA Reductase and α -Glucosidase [J]. Journal of Natural Products, 2015, 78(8): 1977-1989.
- [4] ZHANG J, MA K, CHEN H, et al. A Novel Polycyclic Meroterpenoid with Aldose Reductase Inhibitory Activity from Medicinal Mushroom *Ganoderma leucocontextum* [J]. The Journal of Antibiotics, 2017, 70(8): 915-917.
- [5] LI X, XIE Y, PENG J, et al. Ganoderiol F Purified from *Ganoderma leucocontextum* Retards Cell Cycle Progression by Inhibiting CDK4/CDK6 [J]. Cell Cycle (Georgetown, Tex), 2019, 18(21): 3030-3043.
- [6] ZHANG J J, MA K, HAN J J, et al. Eight New Triterpenoids with Inhibitory Activity Against HMG-CoA Reductase from the Medicinal Mushroom *Ganoderma leucocontextum* Collected in Tibetan Plateau [J]. Fitoterapia, 2018, 130: 79-88.
- [23] CHEN H P, ZHAO Z Z, ZHANG Y, et al. (+)- and (-)-Ganodilactone, a Pair of Meroterpenoid Dimers with Pancreatic Lipase Inhibitory Activities from the Macromycete *Ganoderma leucocontextum* [J]. RSC Advances, 2016, 6(69): 64469-64473.
- [7] CHEN H Y, ZHANG J J, REN J W, et al. Triterpenes and Meroterpenes with Neuroprotective Effects from *Ganoderma leucocontextum* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2018, 15(5): e1700567.
- [8] 福建农林大学. 一种提高灵芝子实体产量及多糖、三萜含量的处理方法: 201610904356.7[P]. 2017-03-29.
- [9] 山东农业大学. 一种提高灵芝子实体中灵芝三萜含量的方法: 201811435545.X[P]. 2019-01-11