

SPE-GC/MS 测定黄绿蜜环菌丙酮提取物脂溶性成分

唐楚沉¹,张耀洲¹,党 军²

(1. 浙江理工大学生命科学院,杭州 310018;2. 中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810008)

摘 要: 为了研究黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物的脂溶性成分。先用固相萃取(SPE)技术对黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物进行预处理,再采用气相色谱-质谱(GC-MS)法对黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物的脂溶性成分进行分析。共从黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物中鉴定出 33 个化合物,占总提取物含量的 98.8%。采用面积归一化法测定了各组分的百分含量,其中亚油酸含量高达 48.2%。其余含量超过 2%的成分依次为邻苯二甲酸丁辛酯(12.1%)、顺式-11-十八碳烯酸(7.1%)、邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(7.3%)、棕榈酸(4.1%)、E-14-十六烯醛(3.3%)、E-3-二十烯(3.0%)、反式-13-十八碳烯酸(2.6%)、1-二十二烯(2.1%)。结果表明黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物中富含脂肪酸类、酯类、烯类等化合物,为黄绿蜜环菌的进一步开发利用提供了依据。

关键词: 黄绿蜜环菌;丙酮提取物;GC-MS 分析;固相萃取

中图分类号: S567.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)01-0103-06 **引用页码:** 010703

0 引 言

黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)是一种野生珍稀食药兼用真菌,隶属于担子菌亚门(*Basidio-mycotina*),层菌纲(*Hymenomycetes*),伞菌目(*Agaricales*),白蘑科(*Tricholomataceae*)^[1],卷毛菌属(*Floccularia*)^[2],又名黄蘑菇、金蘑菇。其主要生长在海拔 3200~4800 m 的草甸上,如陕西、青海、甘肃、四川、西藏等地区^[3]。其分布区域多属于高寒草原,多由蒿草与其伴生;生长土壤为高山草甸土,pH 值在 6.8~7.2;黄绿蜜环菌的菌丝分布在 5~30 cm 的土壤中,菌丝在土壤中能以菌根共生的方式与草根共存^[3]。

黄绿蜜环菌子实体肥厚,味道鲜美,含有丰富的营养成分,如蛋白质、氨基酸、维生素、矿物质、多糖等,还含有少量的有机酸、黄酮、挥发油等^[3-5],是一种被公认为具有开发利用价值的野生食药兼用真菌^[3]。特别是黄绿蜜环菌含有丰富的“硒”,因此对

重金属有很好的解毒作用,同时还是一种理想的抗癌载体^[6-7];黄绿蜜环菌还能够起到防治神经炎、肺气病、抗流感、抗氧化和抗肿瘤等功效^[8]。目前,国内外对黄绿蜜环菌同属其他种的化学成分已进行过研究,同时还研究了黄绿蜜环菌菌丝体的生物学特性,化学成分,增强机体免疫等功能^[9-10]。如目前已有较多关于同属的蜜环菌、发光假蜜环菌等的研究报道,并已进行开发利用^[11]。而在过去的十年里,我国对于黄绿蜜环菌的研究也取得了重大的进展,但主要集中在其生态分布、蘑菇圈特征、子实体成分与培养基优化等方面的研究,且相关课题仍旧较少^[12]。目前关于黄绿蜜环菌子实体成分的研究报道以水提取法、醇提取法、石油醚提取法^[6]以及乙醚提取法^[13]为主,而对于使用丙酮提取法的研究尚未见报道。

本实验在已有的研究基础上,使用丙酮试剂对黄绿蜜环菌子实体进行提取,通过固相萃取气相色谱质谱联用技术(solid-phase extraction-gas chromatography/mass,

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KSZD-EW-Z-004-05-2)

作者简介: 唐楚沉(1989-),男,湖南永州人,硕士研究生,主要从事天然药物化学成分的提取与纯化方面的研究。

通信作者: 张耀洲,Email: zyz_tjedu@126.com

SPE-GC/MS)对其脂溶性化学成分进行了分析。固相萃取(solid-phase extraction,SPE)是近年来发展起来的一种样品预处理技术,由液固萃取结合柱液相色谱技术发展而来,主要用于分离、纯化和浓缩样品,具有处理样品容量大、分离效率高、有机溶剂耗用量小等优点^[14]。气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometer,GC-MS)可快速分离与鉴定药用植物挥发性成分,且兼具分离效能高及定性能力强的优点,获得数十种化合物的色谱峰仅0.5~1 h即可,操作简便、快捷^[15-16]。同时预实验的结果表明黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物对于人肝癌细胞(HepG2)和肺癌细胞(A549)的贴壁及增殖具有一定的抑制作用,因此本实验对于黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物脂溶性成分进行的分析和鉴定,可为黄绿蜜环菌的进一步开发利用提供参考与科学依据。

1 实验

1.1 实验材料和仪器

实验材料:黄绿蜜环菌于2013年6月采自青海省,由中科院西北高原生物研究所王启兰老师鉴定。0.45 μm 有机膜(购自天津博纳艾杰尔科技有限公司);实验所用的正己烷、甲醇、丙酮和乙酸乙酯均为分析纯(购自天津康科德科技有限公司)。

实验仪器:AL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);SQW-601型超微粉碎仪(山东三清不锈钢设备有限公司);8K型高速冷冻离心机(德国Sigma公司);旋转蒸发器(上海亚荣生物技术有限公司);Varian450-GC/Varian320-MS型气质联用仪(德国Bruker公司);TTL-DC型氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司);SPE-01型固相萃取仪(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物脂溶性组分的制备

a) 称取100 g黄绿蜜环菌样品,超微粉碎后置于萃取罐中,加入1000 mL丙酮试剂,于16 $^{\circ}\text{C}$ 下冷浸2 h,每30 min搅拌1次。搅拌4次后,将萃取罐静置1 h后再用0.45 μm 的有机膜进行过滤,收集滤液。

b) 将滤液离心15 min,转速为6000 r/min,收集合并上清液。用旋转蒸发器将上清液浓缩至约10 mL,水浴加热温度控制在50 $^{\circ}\text{C}$,再用氮吹仪进一步浓缩至约1 mL,得到黄棕色油状物。最后将浓缩得到的1 mL黄棕色油状物溶解在6 mL正己烷和3 mL乙酸乙酯混合液中,此即为样品溶液。

c) 用30 mL的乙酸乙酯试剂活化固相萃取柱(粒径80 μm 的高纯硅胶10 g),接着再用30 mL的正己烷试剂平衡柱子。将样品溶液加压上样,使其吸附在柱子上,之后用30 mL的正己烷试剂采用抽真空的方法在柱子上淋洗样品,收集洗脱液并用旋转蒸发器减压浓缩至1 mL,即可得到黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物的脂溶性组分。

1.2.2 GC-MS测定条件

GC条件:VF-5MS毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm),程序升温:初始柱温50 $^{\circ}\text{C}$,保留1 min,以8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至250 $^{\circ}\text{C}$,保留1 min;再以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至280 $^{\circ}\text{C}$,保留5 min;柱流量1 mL/min;进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$;柱前压1.15 Pa;进样量1 μL ;分流进样,分流比20:1;载气为高纯氮气。

MS条件:电离方式EI,电子能量70 eV;离子源温度250 $^{\circ}\text{C}$,接口温度280 $^{\circ}\text{C}$;倍增器电压1.25 kV;溶剂延时5 min;质量扫描范围33~600 amu,CID气体压力为0.27 Pa。

1.2.3 数据处理

定性:利用Varian MS Workstation 6.92、NIST2008标准谱库自动检索各组分质谱数据,鉴定结果由保留指数、检索结果和人工解析图谱共同确定。

定量:采用面积归一化法对检测出的成分进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 SPE条件的优化

2.1.1 萃取柱的选择

不同填料的固相萃取柱对各物质的吸附性能存在很大的差异。本实验通过对常用的C18小柱和硅胶柱对黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物脂溶性成分的回收率的比较来选择合适的柱子。结果表明C18小柱对黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物可挥发的脂溶性成分的吸附性较高,即回收率较低,如图1,故实验选择了硅胶柱。

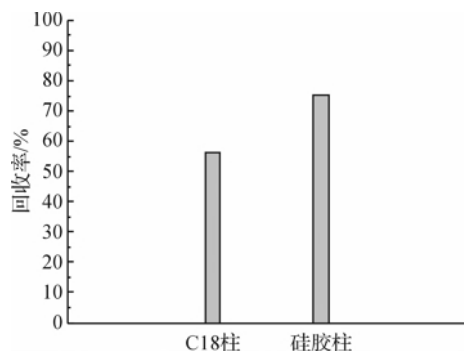


图1 固相萃取柱回收率的比较

2.1.2 流速的优化

不同的流速会直接影响固相萃取柱的吸附效率和工作效率。本实验通过比较脂溶性组分的固相萃取回收率在不同流速下的变化发现,当流速稳定在 3 mL/min 时,回收率较好,如图 2,因此选定过柱流速为 3 mL/min。

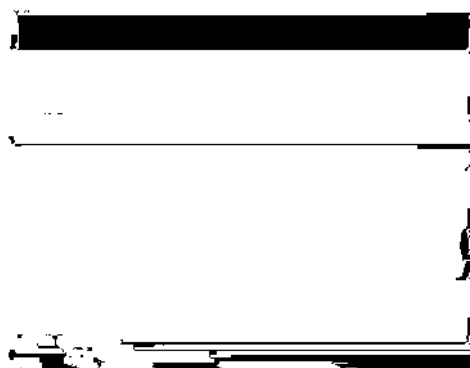


图 2 不同流速回收率的比较

2.1.3 洗脱剂的选择

洗脱溶剂的选择种类较多,有丙酮,二氯甲烷,乙腈,正己烷,甲醇,乙酸乙酯和石油醚等。文献中常用的洗脱剂主要是正己烷、甲醇和丙酮。实验选择这 3 种溶剂经行洗脱,经过比较回收率,如图 3,以及考虑到脂溶性物质较易溶于正己烷,且正己烷的极性较小,可避免因洗脱下其他物质影响实验,因此选择正己烷为洗脱剂。

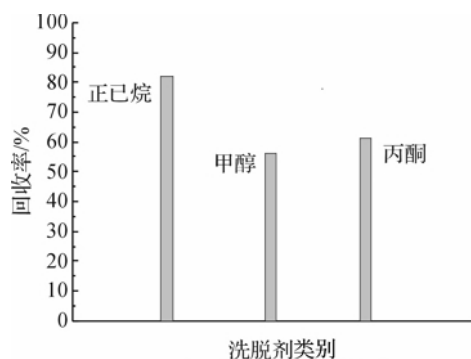


图 3 不同洗脱剂回收率的比较

2.2 数据整理与讨论

黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物可挥发的脂溶性成分经气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)进行分析,所得总离子流图见图 4,然后通过对比色谱峰的 NIST08 谱库检索、相关文献的查阅^[17-18]和计算保留指数方法共同鉴定其化学成分,共鉴定出 33 种物

质;采用面积归一法计算出各成分的相对百分含量,具体的鉴定结果见表 1。

从黄绿蜜环菌丙酮提取物中共检测到 46 个色谱峰,由表 1 可知,鉴定了其中的 33 个化合物,基本为脂肪酸类、醇类、酯类、醛类、烷烃类化合物,所鉴定的化合物占提取物总含量的 98.8%。其中,脂肪酸类物质 7 种(占总峰面积的 63.8%),醇类物质 5 种(占 3.4%),酯类物质 5 种(占 19.9%),醛类物质 2 种(占 3.6%),烷烃类物质 14 种(占 8.1%)。相对含量在 2% 以上的化合物依次为亚油酸(48.2%)、邻苯二甲酸丁辛酯(12.1%)、顺式-13-十八碳烯酸(7.1%)、邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(7.3%)、棕榈酸(4.1%)、E-14-十六烯醛(3.3%)、E-3-二十烯(3.0%)、反式-13-十八碳烯酸(2.6%)、1-二十二烯(2.1%)。

化合物中的脂肪酸、酯类和烷烃类化学成分在黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物中的含量较高,其中含量最多的是脂肪酸(63.8%),包括不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸是人体的必需脂肪酸,能够维持人体的正常生理活动。如提取物中所含的亚油酸(48.2%),人和动物自身无法合成,必须通过摄取食物获得;亚油酸经研究表明具有很好的生物活性,比如抗氧化、抗肿瘤、降低胆固醇、抑制脂肪积累等作用^[19-20];而提取物中的棕榈酸(4.1%),广泛分布在自然界中,研究表明棕榈酸可作为增溶剂、稳定剂适用于医药、颜料等产品,也是合成化妆品成分棕榈酸异丙酯、棕榈酸异辛酯的基本原料。有研究报道棕榈酸还具有抗肿瘤、抗衰老的生物活性^[21]。另外酯类、烷烃类化合物可以作为食品添香剂和食品调味剂,也具有一定的抑菌作用。

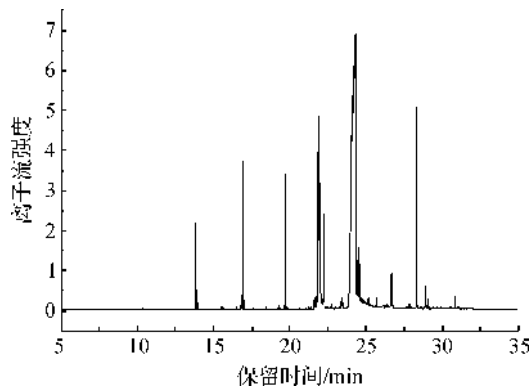


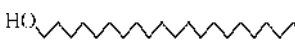
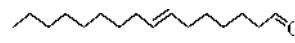
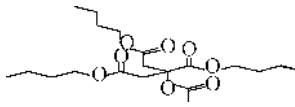
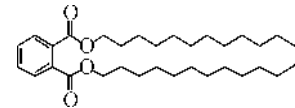
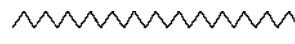
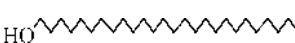

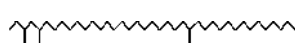
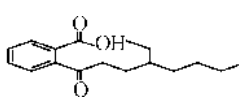



图 4 黄绿蜜环菌丙酮提取物的总离子流

表1 黄绿蜜环菌丙酮提取物中脂溶性成分的GC-MS鉴定结果

峰号	化合物名称	保留时间	分子式	相对含量	匹配概率	结构式
1	1-Dodecene 1-十二碳烯	10.314	$C_{12}H_{24}$	0.044	917/917	
2	1-Tridecene; 1-十三碳烯	13.792	$C_{13}H_{26}$	1.704	939/939	
3	Hexadecane 十六烷	13.908	$C_{16}H_{34}$	0.136	944/944	
4	E-14-Hexadecenal E-14-十六烯醛	16.909	$C_{16}H_{30}O$	3.283	956/952	
5	Eicosane 二十烷	16.998	$C_{20}H_{42}$	0.180	952/952	
6	1-(1-Methylethyl)- 2-nonylcyclopropane 1-(1-甲基乙基)- 2-壬基环丙烷	19.294	$C_{15}H_{30}$	0.101	886/817	
7	(E)-3-Eicosene E-3-二十烯	19.697	$C_{20}H_{40}$	3.020	953/950	
8	Heneicosane 正二十一烷	19.769	$C_{21}H_{44}$	0.126	928/922	
9	Nonanoic acid 壬酸	21.644	$C_{10}H_{20}O_2$	0.343	943/938	
10	Z-11-Hexadecenoic acid Z-11-十六烯酸	21.758	$C_{16}H_{30}O_2$	0.260	943/938	
11	1-2-Benzenedicarboxylic acid, butyl octylester 邻苯二甲酸丁辛酯	21.890	$C_{20}H_{30}O_4$	12.107	920/903	
12	n-Hexadecanoic 棕榈酸	21.967	$C_{16}H_{32}O_2$	4.106	958/957	
13	2-ethyl-1-lauryl alcohol 2-乙基-1-十二醇	22.138	$C_{14}H_{30}O$	0.033	864/824	
14	11-Tricosene 11-二十三烯	22.156	$C_{23}H_{46}$	0.098	927/973	
15	1-Nonadecene 1-二十二烯	22.229	$C_{22}H_{44}$	2.066	948/938	
16	1-Iodo-2-Methylundecane 1-碘代-2-甲基十一烷	22.289	$C_{12}H_{25}I$	0.103	879/820	
17	methyl linoleate 亚油酸甲酯	23.404	$C_{19}H_{34}O_2$	0.191	909/902	
18	Nonadecane 正十九烷	23.450	$C_{19}H_{40}$	0.182	887/854	
19	9,12-Octadecadienoic acid (z, z)亚油酸	23.875	$C_{18}H_{32}O_2$	48.155	933/927	
20	Trans-13-Octadecenoic acid 反式-13-十八碳烯酸	24.312	$C_{18}H_{34}O_2$	9.727	920/920	
21	(Z)-11-Octadecenoic acid 顺式-11-十八碳烯酸	24.384	$C_{18}H_{34}O_2$	0.186	879/879	

表 1 续

峰号	化合物名称	保留时间	分子式	相对含量	匹配概率	结构式
22	n-Octanoic acid 辛酸	24.424	C ₁₅ H ₂₈ O	1.030	898/891	
23	2-Methyl-z, z-3, 13-Octadecadienol 2-甲基-Z,Z-3, 13-十八碳二烯醇	24.463	C ₁₉ H ₃₆ O	0.477	888/849	
24	1-Heneicosanol 二十一醇	24.543	C ₂₁ H ₄₄ O	1.436	923/920	
25	(7Z)-hexadec-7-enal 7-十六碳烯醛	24.597	C ₁₆ H ₃₀ O	0.327	838/815	
26	Acetyl tributyl citrate 乙酰柠檬酸三丁酯	25.120	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	0.190	861/825	
27	Dilauryl phthalate 邻苯二甲酸双十二酯	25.205	C ₃₂ H ₅₄ O ₄	0.196	875/849	
28	Heptacosane 正二十七烷	25.654	C ₂₇ H ₅₆	0.196	878/871	
29	Heptacosanol 正二十七烷醇	26.699	C ₂₇ H ₅₆ O	0.740	933/933	
30	n-Tetratriacontane 正三十四烷	26.752	C ₃₄ H ₇₀	0.118	884/884	
31	3,5,24- Trimethyl-tetracontane 3,5,24-三甲基-四十烷	27.908	C ₄₃ H ₈₈	0.062	877/842	
32	Phthalic acid mono- 2-ethylhexyl ester 邻苯二甲酸单(2-乙基 己基)酯	28.352	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	7.264	961/961	
33	Octacosanol 正二十八烷醇	28.90	C ₂₈ H ₅₈ O	0.723	935/935	

3 结 论

本实验通过固相萃取气相色谱质谱联用技术(SPE-GC/MS)对黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物中可挥发的脂溶性成分进行了化学成分分析、含量测定及结构鉴定,共鉴定出 33 个化合物。主要为脂肪酸类、醇类、酯类、醛类、烷烃类化合物,所鉴定的化合物占提取物总含量的 98.8%。其中,脂肪酸类物质 7 种(占总峰面积的 63.8%),醇类物质 5 种(占 3.4%),酯类物质 5 种(占 19.9%),醛类物质 2 种(占 3.6%),烷烃类物质 14 种(占 8.1%)。相对含量在 2% 以上的化合物依次为亚油酸(48.2%)、邻苯二甲酸丁辛酯(12.1%)、顺式-13-十八碳烯酸(7.1%)、邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(7.3%)、棕榈酸(4.1%)、E-14-十六烯醛(3.3%)、E-3-二十烯

(3.0%)、反式-13-十八碳烯酸(2.6%)、1-二十二烯(2.1%)。同时本实验前期的预实验表明,黄绿蜜环菌子实体丙酮提取物对人肝癌细胞(HepG2)和肺癌细胞(A549)的贴壁及增殖有一定的抑制作用,可能与黄绿蜜环菌子实体中含有不饱和脂肪酸亚油酸和棕榈酸有关。因此实验结果说明黄绿蜜环菌子实体除了食用价值外,应该还有其独特的药理活性作用,为黄绿蜜环菌的进一步深入研究、开发利用提供了理论基础和科学依据。

参考文献:

- [1] 谢红民,刁治民,邓君. 青藏高原黄绿蜜环菌资源现状及可持续发展的研究[J]. 邵阳师范高等专科学校学报, 2005, 25(6), 67-70.
- [2] 戴玉成,周丽伟,杨祝良,等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21.

- [3] 刁治民. 青海草地黄绿蜜环菌生态学特性及营养价值研究[J]. 中国食用菌, 1997, 16(4): 21-22.
- [4] 周劲松, 熊辉岩, 杨春江, 等. 黄绿蜜环菌子实体挥发油的化学成分[J]. 农业科学与技术, 2008, 9(2): 90-92.
- [5] 刘葳, 于源华, 毛亚杰, 等. 黄绿蜜环菌多糖的分离纯化与组成结构分析[J]. 长春理工大学学报, 2007, 30(2): 102-105.
- [6] 白世俊, 包锦渊. 黄绿蜜环菌有效成分的定性分析[J]. 北方园艺, 2012(3): 161-163.
- [7] 周连玉. 黄绿蜜环菌的研究概述[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(3): 52-53, 60.
- [8] 李世峰, 陈桂琛, 毕玉蓉. 两种野生食用菌抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 中国食用菌, 2005, 24(3): 58-63.
- [9] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 574-591.
- [10] 刘景圣, 袁媛, 田忠华. 蜜环菌的活性成分研究及其在功能性食品中的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 165.
- [11] 张甫安. 菌菇深层发酵和液体菌种生产[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2001: 22-31.
- [12] 赵联正. 青藏高原黄绿蜜环菌的研究概述[J]. 食用菌, 2015(1): 1-3.
- [13] 周劲松, 熊辉岩, 杨春江, 等. 黄绿蜜环菌子实体挥发油的化学成分[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 840-841.
- [14] 祝伟霞, 杨冀州, 梁伟, 等. 固相萃取技术在兽药残留分析中的应用[J]. 动物医学进展, 2007, 28(8): 99-101.
- [15] BILIA A R, FLAMINI G, TAGLIOLI V, et al. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas[J]. Food Chemistry, 2002, 76(3): 307-310.
- [16] LOCKWOOD G B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 936(1-2): 23-31.
- [17] 孙玉婉, 蔡雯雯, 应娉婵, 等. 青枣核果木枝叶乙酸乙酯段脂溶性成分 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(11): 1803-1806.
- [18] 黎亦良, 莫建光, 刘布鸣, 等. 东兴金花茶脂溶性成分的 GC-MS 分析[J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(3): 51-53.
- [19] 黄亚非, 张永明, 陶玲, 等. 广东野菊花挥发油的化学成分[J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 40-41.
- [20] 谷利伟, 赵金兰. 共轭亚油酸研究进展[J]. 粮油食品科技, 2001, 9(2): 28-29.
- [21] HARADA H, YAMASHITA U, KURIHARA H, et al. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga[J]. Anticancer Res, 2002, 22(5): 2587-2590.

Determination of Liposoluble Constituents in *Armillaria Luteo-Virens* Acetone Extract by SPE-GC/MS

TANG Chuchen¹, ZHANG Yaozhou¹, DANG Jun²

(1. College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: To study liposoluble constituents of *Armillaria luteo-virens* acetone extract, solid phase extraction (SPE) technology was used to pretreat *Armillaria luteo-virens* acetone extract. Then, gas chromatography-mass spectrum (GC-MS) was used to analyze liposoluble constituents of *Armillaria luteo-virens* acetone extract. 33 compounds were identified from *Armillaria luteo-virens* acetone extract, accounting for 98.8% of all extracts. Area normalization method was applied to determine percentage content of each constituent. The content of linoleic acid was as high as 48.2%, and the content of the following chemical components exceeds 2%: 1-2-benzenedicarboxylic acid(12.1%), (Z)-11-octadecenoic acid(7.1%), phthalic acid mono-2-ethylhexylester(7.3%), n-hexadecanoic(4.1%), E-14-hexadecenal(3.3%), (E)-3-eicosene(3.0%), trans-13-octadecenoic acid(2.6%) and 1-nonadecene(2.1%). The results indicate that, *Armillaria luteo-virens* acetone extract is rich in fatty acids, esters and alkenes. This study provides scientific reference and theoretic basis for further development and utilization of *Armillaria luteo-virens*.

Key words: *Armillaria luteo-virens*; acetone extract; GC-MS analysis; solid-phase extraction

(责任编辑: 许惠儿)