

# 茯神挥发性成分及其生物活性研究

王军民<sup>1\*</sup>, 张加研<sup>2</sup>, 雷福厚<sup>3</sup>, 陈凯<sup>1</sup>, 严毅<sup>4</sup>

<sup>1</sup>西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室; <sup>2</sup>西南林业大学化学工程学院, 昆明 650224;

<sup>3</sup>广西民族大学 广西林产化学与工程重点实验室, 南宁 530006; <sup>4</sup>昆明市海口林场, 昆明 650114

**摘要:**为研究茯神挥发性成分含量、构成及其生物活性, 本实验采用二氧化碳超临界的方法提取茯神低极性成分, 以提取率作为响应值, 在单因素试验的基础上采用响应曲面法考察提取压力、温度、二氧化碳流速对提取效果的影响, 优化提取工艺。运用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对其主要化学成分进行鉴定, 并采用生长速率法测定了挥发油对5种真菌的生物活性。得到提取模型极值点, 即提取压力27.26 MPa、提取温度55.97 °C、提取流速10.68 L/min时, 提取率达到最大, 提取率预测值为1.66 mg/g。通过NIST14质谱库检索, 鉴定了其中17个主要化合物, 运用峰面积归一法确定各个组分的含量, 占挥发油总量的84.5%。抗菌实验表明茯神挥发油对采绒革盖菌菌株有低浓度促进高浓度抑制的活性。

**关键词:**茯神; 挥发性成分; 提取工艺; 生物活性

中图分类号: R284.2; R931.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)8-1402-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.8.015

## The volatile components from *Poria* with hostwood and their bioactivities

WANG Jun-min<sup>1\*</sup>, ZHANG Jia-yan<sup>2</sup>, LEI Fu-hou<sup>3</sup>, CHEN Kai<sup>1</sup>, YAN Yi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Utilization in Southwest Mountainous of China, Southwest Forestry University;

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

<sup>3</sup>Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineer of Forest Products, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China;

<sup>4</sup>The Forest Farms from Haikou in Kunming, Kunming 650114, China

**Abstract:** In order to study the content, composition and biological activities of volatile components from *Poria* with hostwood, the volatile components were extracted by the method of supercritical carbon dioxide. The extraction technology was optimized by response surface method based on the single factor test, with the extraction rate of volatile as an index and three factors investigated which contained pressure, temperature and carbon dioxide flow rate. The chemical compositions were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Also the antibacterial activities of the volatile to 5 strains of fungi were studied by the method of plate growth rate. As a result, the best extraction conditions were as follows: extraction pressure of 27.26 MPa, extraction temperature of 55.97 °C and carbon dioxide flow rate of 10.68 L/min. Totally 17 main compounds were identified by NIST14 mass spectral library retrieval, and the relative content was determined with the peak area normalization method, which was up to 84.5% of the volatile oil. The antibacterial experiment showed that the volatile oil had bioactivities to *Coriolus versicolor*.

**Key words:** *Poria* with hostwood; volatile constituent; extraction process; bioactivities

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 是我国传统常用中药材<sup>[1]</sup>。茯神为茯苓块中穿有坚实细松根者, 长宽4~5 cm, 厚4

~6 mm, 松根直径不超过1.5 cm, 边缘苓块可不成方形。茯苓中间生长的松木如为弯曲的松根, 似朽木状, 质松体轻, 每根直径不超过2.5 cm<sup>[2]</sup>。化学合成抗真菌药物活性较好, 但多数药物存在毒副作用大、抗菌谱窄、易产生耐药性等问题<sup>[3]</sup>, 因此寻找一种安全可靠的生物农药就显得至关重要。与化学合成抗菌剂相比, 用植物资源或其提取物制成的抗

收稿日期: 2019-02-25 接受日期: 2019-06-04

基金项目: 云南省科技计划(2016FD045); 农业联合面上项目(2017FG001-047); 广西林产化学重点实验室开放课题(GXFC14-12); 昆明市科技计划(2016-1-S-03064)

\* 通信作者 Tel: 86-013759508586; E-mail: magina@swfu.edu.cn

菌剂具有安全,环境友好,对人、动物等非靶标生物无害或毒性较小等优点<sup>[4]</sup>。中药挥发油一般具有很好的抗菌活性<sup>[5]</sup>,同时茯苓在松树上的生长具有绝对的优势,松树不易被其它常见真菌感染,故推测松树被茯苓代谢后的挥发性成分对其它真菌可能具有拮抗作用。现代学者对茯神化学成分及生物活性进行了大量的研究<sup>[6-8]</sup>,但茯神中挥发性成分的构成和抗菌活性研究未见报道。本研究以茯神为研究对象,优化二氧化碳超临界最佳提取工艺提取茯神挥发性成分,并对挥发性成分进行主成分分析,作用于5种常见真菌,研究挥发性成分对真菌的生物活性,旨在从茯神中探寻得到一种潜在的生物农药,为开发和探明茯神新的利用方向奠定基础。

## 1 仪器和材料

### 1.1 实验材料

茯神采于云南省临沧市双江拉祜族佤族布朗族傣族自治县茯苓种植基地,粉碎后过24目筛备用,茯苓母种为中科院5.78原种。五种真菌分别为腐皮镰孢 *Fusarium solani* (CGMCC 3.2889),禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* (CGMCC 3.4733),尖孢镰孢 *Fusarium oxysporum* (CGMCC 3.3633),芸苔链格孢 *Alternaria brassicicola* (CGMCC 3.7805),采绒革盖菌

*Coriolus versicolor* (CFCC 5336)。

### 1.2 实验仪器与试剂

二氧化碳超临界设备(美国ASI);Agilent 7890A-5975B型气质联用仪(美国Agilent公司);SQP型万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);超净工作台;移液枪;恒温培养箱。容量瓶、注射器、0.22 μm 无菌滤头、样品瓶、1 mL 移液枪枪头、10 mL 量筒、250 mL 锥形瓶、培养皿、5 mm 打孔器、无水乙醚、二甲基亚砜为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 超临界提取挥发油

每次称取50 g粉碎后样品进行实验,实验采取了单因素控制变量的实验方式,分别从提取压力、温度、二氧化碳的单位时间流量和提取时间4个方面进行相应的研究实验。根据实验结果,因提取时间对提取率的影响关系较小排除时间因素的影响,在单因素试验的基础上,选择压力、温度、二氧化碳的单位时间流量(下文简称流量)共3个因素为研究对象,按照3因素3水平进行Box-Behnken中心组合设计试验,因素与水平编码如表1所示。

表1 因素与水平编码

Table 1 Coding of factors and levels

水平 Level	A 提取压力 Extraction pressure (Mpa)	B 提取温度 Extraction temperature (°C)	A 流量 Flow rate of carbon dioxide (L/min)
-1	20	50	8
0	25	55	10
1	30	60	12

### 2.2 挥发油主成分分析

GC 条件:HP-5MS 石英毛细管柱(30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm);柱温:80 ~ 240 °C,程序升温 3 °C/min;柱流量 1.0 mL/min;进样口温度 250 °C;柱前压 100 kPa;进样量 0.3 μL;分流比 10:1;载气为高纯氦气。MS 条件:电离方式 EI;质量范围:35 ~ 500;采用 NIST14 质谱库检索计算机定性。

### 2.3 生物活性研究

精确称取样品 100 mg,用 2% DMSO 定容至 25 mL,配制为浓度为 4 mg/mL 的母液,采用梯度稀释法配制浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/mL 的待测样液,透过 0.22 μm 微孔过滤器除菌备用。

配制 1 L PDA 培养基 121 °C 灭菌 22 min。凝固前转移至超净工作台中分装至 90 mL,冷却至 40 °C 时与 10 mL 待测样液混匀,配制得到含挥发油浓度分别为 0.02、0.04、0.08、0.12、0.16 mg/mL 的培养基注入无菌培养皿(9 cm 直径)。每个培养皿中包含 10 mL PDA 培养基,标记后冷却凝固备用。溶剂对照采用不加样品的 2% DMSO 溶液,空白对照为不加任何样品和溶液的 PDA 培养基。

病原真菌的接种与培养:在已活化好的病原真菌菌落上用灭菌后的 5 mm 打孔器打取菌饼,后转移至培养皿中心位置,标记后放入培养箱培养 3 ~ 10 天。所有病原真菌应在同一天内接种完毕。

生长速率计算:培养至第2、4、6、8、10天时,用十字交叉法测量病原真菌的菌落生长直径,并记录数据。抑制率按照如下公式计算<sup>[9]</sup>。

$$IR(\%) = \{Do - [Ds - (Do - Dn)]\} \times 100\% / Do$$

IR:抑制率;Do 空白对照组菌落直径;Ds:处理组菌落直径;Dn:溶剂对照组菌落直径。

### 3 实验结果

#### 3.1 超临界提取挥发油

##### 3.1.1 单因素考察

提取压力考察:固定提取温度为 50 ℃,流量为 12 L/min,提取压力分别为 10、15、20、25、30 MPa 时,挥发油提取率分别为 0.41、0.53、0.691、1.13、1.14 mg/g。实验结果表明提取压力在 25 MPa 以上时挥发油的提取率变化趋于平缓,考虑能耗和安全问题初步确定最佳提取压力为 25 MPa。

提取温度考察:固定提取压力为 25 MPa,流量为 12 L/min,提取温度分别为 40、45、50、55、60 ℃ 时,挥发油提取率分别为 1.19、1.25、1.5、1.59、1.54 mg/g。实验结果表明提取温度在 55 ℃ 时挥发油的提取率最高,故初步确定最佳提取温度为 55 ℃。

提取流量考察:固定提取压力为 25 MPa,温度为 50 ℃,提取流量分别为 6、8、10、12、14 L/min 时,挥发油提取率分别为 1.02、0.98、1.25、1.25、1.19 mg/g。实验结果表明提取流量在 10 L/min 时趋于平缓,当流量逐渐增大为 14 L/min 时因分离部分不能及时分离导致部分挥发油可能随气体流失使提取

率反而降低。故初步确定最佳提取流量为 10 L/min。

##### 3.1.2 响应曲面试验结果与分析

响应曲面试验设计、统计及结果分析利用 Design-Expert 软件进行数据分析,响应曲面试验设计结果见表 2。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的提取得率数值以及 3 个因素进行统计分析,得到了每个因子的显著性,结果如表 3 所示,并得到了挥发油提取率(Y)对自变量提取压力(A)、提取温度(B)、提取流量(C)的多元二次回归方程为:提取率(Y) = 1.61 + 0.13A + 0.059B + 0.11C + 0.01AB + 0.038AC - 0.023BC - 0.16A<sup>2</sup> - 0.14B<sup>2</sup> - 0.18C<sup>2</sup> 由表 3 的方差分析结果可知,从表 3 方差分析结果可知,实验中选用的模型差异极显著(P < 0.000 1),表明该 2 次方程比较显著;失拟项 0.192 1 > 0.05,表明失拟不显著对试验拟合程度良好,试验误差较小,可以用该模型对不同条件下的试验结果进行预测。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对所得到的回归模型进行了响应面分析,并对回归方程的最值求解,得到了模型极值点,即提取压力、提取温度、提取流速分别为 27.26 MPa、55.97 ℃、10.68 L/min 时,响应值 Y 值达到最大,在此工艺下挥发油提取率预测值为 1.66 mg/g,见图 1。受仪器参数限制,设置取压力 27 MPa、提取温度 56 ℃、提取流速 10 L/min 时对最优工艺进行验证,提取率实际测定值分别为 1.61、1.63、1.63 mg/g,平均值为 1.62 mg/g。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果  
Table 2 Box-Behnken design and results

序号 No.	A 提取压力 Extraction pressure (Mpa)	B 提取温度 Extraction temperature (℃)	A 流量 Flow rate of CO <sub>2</sub> (L/min)	提取率 Yield (mg/g)
1	-1	0	1	1.21
2	-1	0	-1	1.05
3	0	0	0	1.61
4	1	0	-1	1.25
5	-1	-1	0	1.12
6	1	-1	0	1.36
7	1	1	0	1.5
8	1	0	1	1.56
9	0	0	0	1.61
10	0	0	0	1.59
11	0	1	-1	1.27
12	0	-1	1	1.35

续表 2

序号 No.	A 提取压力 Extraction pressure (Mpa)	B 提取温度 Extraction temperature (°C)	A 流量 Flow rate of CO <sub>2</sub> (L/min)	提取率 Yield (mg/g)
13	-1	1	0	1.22
14	0	1	1	1.42
15	0	0	0	1.61
16	0	0	0	1.62
17	0	-1	-1	1.11

表 3 Box-Behnken 响应面试验方差分析

Table 3 Variance analysis of Box-Behnken response surface design

方差来源 Source	自由度 df	平方和 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	9	0.071 288	355.173 2	0.000 1	Significant
A-Pressure	1	0.143 113	713.016	0.000 1	
B-Temperature	1	0.027 613	137.571 2	0.000 1	
C-Flow rate	1	0.092 45	460.605	0.000 1	
AB	1	0.000 4	1.992 883	0.200 9	
AC	1	0.005 625	28.024 91	0.001 1	
BC	1	0.002 025	10.088 97	0.015 6	
A <sup>2</sup>	1	0.113 246	564.216 5	0.000 1	
B <sup>2</sup>	1	0.087 309	434.993 8	0.000 1	
C <sup>2</sup>	1	0.131 167	653.502 9	0.000 1	
残差 Residual	7	0.000 201			
失拟项 Lack of Fit	3	0.000 308	2.569 444	0.192 1	Not significant
纯误差 Pure Error	4	0.000 12			
总离差 Cor Total	16				

### 3.2 挥发油主成分分析

茯神挥发油样品中共检测出 21 个物质,全扫描总离子流图见图 2。通过 GC-MS 工作站数据处理系统的 NIST14. L 标准谱库进行相似度检索,鉴定匹配度大于 95 的 17 种可能物质。结果见表 4。

由表 4 可见,从茯神提取物中鉴定出匹配度 95 以上的 17 中成分,由归一法计算含量,鉴定出的成分占总量的 84.5%。其中含量最高的为豆甾-3,5-二烯占总含量的 42.35%。

### 3.3 生物活性研究

结果表明茯神挥发油对尖孢镰孢菌有一定的抑制作用,挥发油浓度范围在 0.04 ~ 0.08 mg/mL 时对:采绒革盖菌、腐皮镰孢、禾谷镰孢菌有一定的促进作用,高浓度时有促进作用变为抑制作用。对芸

苔链格孢菌的作用不太明显。茯神挥发油的活性测试结果如表 1 所示。

### 4 结论

本实验首次采用响应曲面法对茯神挥发油的提取工艺参数进行优化,利用 Design-Expert 8.0.6 软件对提取率进行预测分析,并通过验证实验确定了高提取率的挥发油提取工艺,为后续挥发油的提取和生物活性研究奠定了基础。

二氧化碳超临界提取挥发性成分的过程中发现提取率随二氧化碳流量的增加而增加,当流速过大时提取率反而降低,这可能与分离过程中气体流量过大且冷却不及时导致挥发油随二氧化碳气体流失而造成损失。

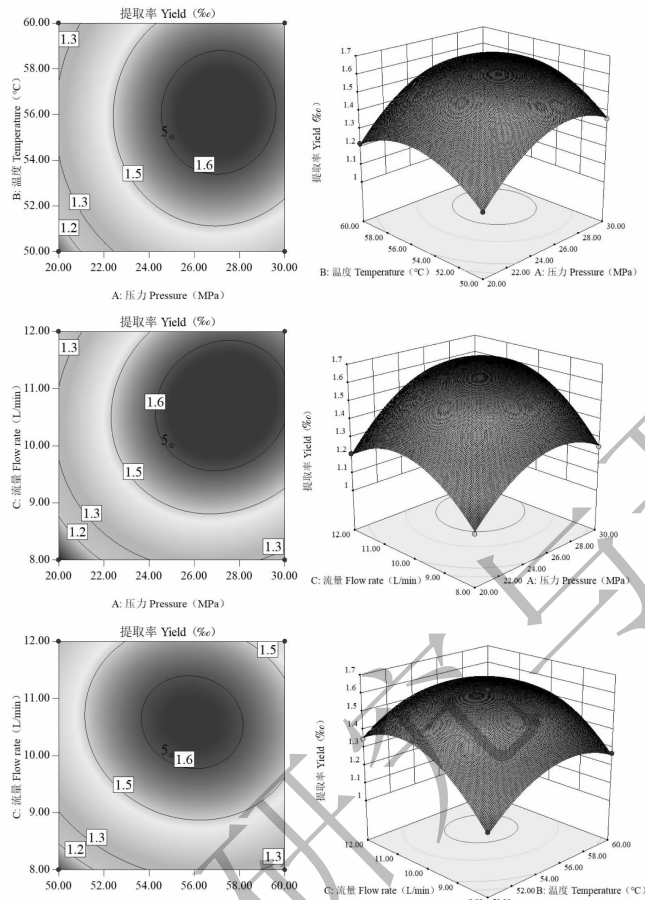


图1 各因素间的交互作用

Fig. 1 Interaction among each factor

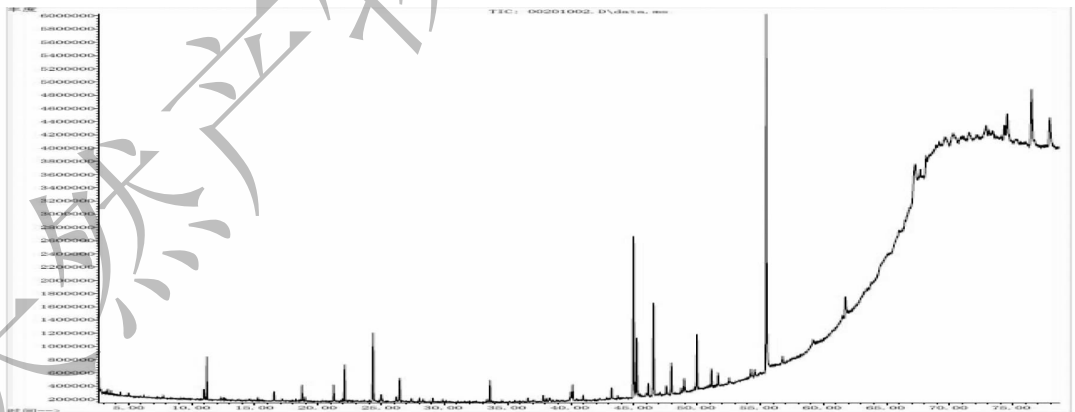


图2 GC-MS 全扫描总离子流图

Fig. 2 The total ion chromatography in full scan mode of GC-MS

茯神挥发油的化学成分分析表明,茯神挥发油中化学成分含有部分的松脂类成分同时也含有其它成分<sup>[10,11]</sup>,具体区分应采取不同材料差异提取进行研究,受材料的限制本研究未具体区分,后期将进行区分研究。

本实验在确定最优工艺的同时,也首次考察了

茯神挥发性成分对5种真菌的生物活性,在挥发油作用于腐皮镰孢菌时低浓度表现出一定的促进作用,高浓度时促进作用消失,生物活性转变为抑制作用。抑制作用的产生可能与松香酸等松树原生成分有关,具体机理有待后续研究。

表4 茯神挥发油的组成及相对含量

Table 4 The main components and their relative content of volatile in *Poria* with hostwood

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular mass	相对含量 Relative amount (%)	匹配度 Match (%)
1	10.962	月桂烷 Dodecane	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170.33	2.25	95
2	18.755	十四烷 Tetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.39	0.92	96
3	18.996	长叶烯 Longifolene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	4.11	99
4	25.004	(+)-Longicamphenylone	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206.32	2.11	99
5	26.488	正十六烷 Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226.44	1.09	98
6	33.629	十八烷 Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	254.49	2.58	99
7	41.011	海松醛 Pinalal	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	286.23	7.65	98
8	44.911	枞醇 Abirtol	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O	292.49	4.12	95
9	46.536	棕榈酸异丙酯 Isopropyl palmitate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298.5	2.89	99
10	47.962	去氢松香酸 Dehydroabietic acid	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	300.44	0.73	96
11	48.987	松香酸 Abietic	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302.21	4.08	98
12	49.991	脱氢枞酸甲酯 Methyl dehydroabietate	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314.46	3.28	99
13	52.54	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.56	0.37	95
14	55.475	豆甾-3,5-二烯 Stigmasta-3,5-diene	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub>	396.69	42.35	98
15	63.618	角鲨烯 Squalene	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub>	410.71	2.12	99
16	64.841	维生素 E Vitamin E	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430.71	1.28	99
17	67.679	24-亚甲基环阿尔廷醇 24-methylenecycloartan-3-one	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O	438.72	2.59	95

表5 茯神挥发油提取物对各供试菌的抑菌效果

Table 5 The bacteriostatic effect of volatile from *Poria* with hostwood

挥发油浓度 Volatile concentration (mg/mL)	菌落直径 Colony diameter														
	A: 采绒革盖菌 <i>Coriolus versicolor</i>			F: 腐皮镰孢 <i>Fusarium solani</i>			G: 禾谷镰孢 <i>Fusarium graminearum</i>			J: 尖孢镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>			Y: 芸苔链格孢 <i>Alternaria brassicicola</i>		
时间 Time(天)	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10
0.04	42.86	34.09	30.56	16.67	19.44	19.40	5.00	12.07	17.39	40.74	34.62	33.85	0.00	16.67	2.27
0.08	28.57	9.09	13.89	8.33	11.11	2.24	10.00	3.45	8.69	11.11	2.56	6.15	0.00	0.00	-6.82
0.12	8.57	3.09	6.89	0.33	9.11	7.24	5.10	1.45	5.69	16.30	3.12	6.88	3.12	4.23	4.11
0.16	0.00	-2.27	-5.56	0.00	-8.33	2.24	2.13	1.72	-1.09	25.93	8.97	7.69	7.14	6.67	6.82
0.2	5.38	4.63	3.22	0.11	-0.12	1.18	2.15	-2.14	0.12	5.20	1.24	2.57	2.11	8.55	8.22

## 参考文献

1 Xiao PG. Modern Chinese Material Medica (新编中药志) [M]. Beijing: Printed by Chemical Industry Publishing House, 2002: 890-895.

2 Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Dictionary of Medicinal Plant (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technique Publishing House, 2006: 1365-1367.

(下转第 1356 页)