

成分分析

HS-SPME/GC-MS 结合化学计量学鉴别
不同菌种发酵虫草产品及挥发性成分分析*宋玉玲¹, 胡坪^{1**}, 赵诗怡¹, 章弘扬¹,
姜志宏^{2**}, 王月荣¹, 张敏³

(1. 上海市功能性材料化学重点实验室, 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237;
2. 澳门科技大学中医药学院, 中国澳门 999078; 3. 上海市新药设计重点实验室,
华东理工大学药学院, 上海 200237)

摘要 目的: 建立一种快速分析发酵虫草菌丝粉中挥发性成分的方法, 并用于不同菌种发酵虫草产品的鉴别和特征性成分的寻找。**方法:** 利用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用 (HS-SPME/GC-MS) 技术测定发酵虫草菌丝粉的挥发性成分, 在优化萃取头、萃取温度、吸附时间、预平衡时间和解吸时间等萃取条件的基础上, 建立发酵虫草菌丝粉的 HS-SPME/GC-MS 测定方法, 用峰面积归一化法计算各成分的相对含量, 采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 2 种化学计量学方法对数据进行分析。**结果:** 最佳萃取条件为 DVB/CAR-PDMS 萃取头、萃取温度 90 °C、吸附时间 80 min、预平衡时间 40 min、解析时间 2 min。利用建立的 HS-SPME/GC-MS 方法从金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊 5 种发酵虫草制剂中分别鉴定出 56、71、72、81 和 75 个化合物, 主要包括酯类、醇类、羧酸类、醛类、烃类、酮类、杂环类化合物等。通过化学计量学方法对 HS-SPME/GC-MS 数据进行处理, 实现了不同发酵虫草制剂和伪品的鉴别, 并寻找到 5 种发酵虫草产品中的特征挥发性成分, 分别为马索亚内酯、吡嗪酰胺、2-吡咯烷酮、棕榈酸乙酯和棕榈酸。**结论:** HS-SPME/GC-MS 方法可用于发酵虫草产品中挥发性成分的快速分析。结合化学计量学方法对不同发酵虫草制剂进行鉴别和差异性成分寻找, 为特征性指标成分的确定提供了一条新思路, 为发酵虫草制剂质量标准的制定和提升提供了科学依据。

关键词: 发酵虫草粉; 挥发性成分; 化学计量学; 马索亚内酯; 吡嗪酰胺; 2-吡咯烷酮; 棕榈酸乙酯; 棕榈酸; 顶空固相微萃取; 气相色谱-质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2018) 01-0067-12

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.01.09

* 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室开放课题 (MUST-SKL-2016-06)

** 通信作者 胡坪 Tel: (021) 64252844; E-mail: huping@ecust.edu.cn

姜志宏 Tel: +853-88972777; E-mail: zhjiang@must.edu.mo

第一作者 Tel: (021) 64252844; E-mail: linda_song_1990@163.com

Distinction of fermented *Cordyceps* products from different strains and analysis of their volatile components by HS-SPME/GC-MS combined with chemometrics analysis*

SONG Yu-ling¹, HU Ping^{1**}, ZHAO Shi-yi¹, ZHANG Hong-yang¹,
JIANG Zhi-hong^{2**}, WANG Yue-rong¹, ZHANG Min³

(1. Shanghai Key Laboratory of Functional Materials Chemist, School of Chemistry and Molecular Engineering, East-China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macao 999078, China; 3. Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract Objective: To establish a rapid method for the analysis of volatile components in *Cordyceps sinensis* mycelium powder, and to distinguish the fermented *Cordyceps* products from different strains as well as to search the characteristic components. **Methods:** The volatile components in *Cordyceps sinensis* mycelium powder were determined by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS). By optimizing the extraction conditions of extraction head, extraction temperature, adsorption time, desorption time, pre-equilibration time and desorption time, the analytical method of volatile components in *Cordyceps sinensis* mycelium powder was established. The relative content of volatile components was calculated by peak area normalization, and the data of HS-SPME/GC-MS was further proceeded by chemometrics analyses of principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). **Results:** DVB/CAR/PDMS extraction head, extraction temperature of 90 °C, adsorption time of 80 min, pre-equilibration time of 40 min and desorption time of 2 min were selected as the optimum SPME extraction conditions. 56, 71, 72, 81, and 75 of compounds were identified by the established method of HS-SPME/GC-MS in Jinshuibao capsules, Bailing capsules, Ningxinbao capsules, Zhiling capsules and Xinganbao capsules, respectively. They mainly included esters, alcohols, carboxylic acids, aldehydes, hydrocarbons, ketones, heterocyclic compounds. Different fermented *Cordyceps* preparations were distinguished and counterfeits were identified by chemometrics analysis based on the HS-SPME/GC-MS data. The characteristic volatiles of massoia lactone for Jinshuibao capsules, pyrazinamide for Bailing capsules, 2-pyrrolidone for Ningxinbao capsules, ethyl palmitate for Zhiling capsules, and palmitic acid for Xinganbao capsules were also found by chemometrics analysis. **Conclusion:** HS-SPME/GC-MS can be used for rapid analysis of volatile components in fermented *Cordyceps sinensis*. Combined with chemometric methods for distinguishing different fermented *Cordyceps sinensis* and finding differential components, it gives us new ideas to search characteristic components, and provides us with scientific basis for the establishment and improvement of the quality standard of fermented *Cordyceps* preparations.

Keywords: *Cordyceps sinensis* mycelium powder; volatile components; chemometrics analysis; massoia lactone; pyrazinamide; 2-pyrrolidone; ethyl palmitate; palmitic acid; HS-SPME; GC-MS

近年来,随着名贵药材冬虫夏草资源的日益枯竭,通过液体发酵技术大规模生产的虫草菌丝已成为野生冬虫夏草的重要替代品^[1]。至今,国家批准了5种发酵虫草制剂用于临床,分别是金水宝胶囊(国药准字Z10890003)、百令胶囊(国药准字Z10910036)、宁心宝胶囊(国药准字Z33020008)、至灵胶囊(国药准字Z33020246)和心肝宝胶囊(国药准字Z13020082)。其中,金水宝菌丝为蝙蝠蛾拟青霉菌 *Cs-4* (*Paecilomyces hepiali* Chen) 的发酵物,具有补益肺肾、秘精益气的功效;百令菌丝为中国被毛孢菌 *Cs-C-Q80* (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu-et Zeng) 的发酵物,可补肺肾、益精气;宁心宝菌丝为虫草头孢菌 (*Cephalosporium sinensis* Chen. sp. nov) 的发酵物,主要用于治疗心律失常;至灵菌丝为孢霉属真菌 (*Mortierella* sp.) 的发酵物,具有补肺益肾的作用;心肝宝菌丝为粉红胶霉 (*Gliocladium roseum* (Link) Thom.) 的发酵物,功效为补虚损、益精气、保肺益肾、扶正固本^[2]。研究表明,该类制剂源于野生冬虫夏草的菌种,因此含有与野生虫草类似的化学成分类型,如核苷类、多糖类、氨基酸类和脂肪酸类等^[3]。但又由于菌株品种和培养条件不同,不同厂家生产的发酵虫草产品的化学成分种类和相对含量存在较大差异^[4],因此,其药理活性也不尽相同。

随着发酵虫草制剂产值的不断提升,市场上出现了大量发酵虫草制剂的伪冒产品。在多个网购平台上,均可购买到5种国药准字制剂的替代菌丝粉。由于这些伪冒产品的菌种、生产工艺等均未得到相关部门的认可,其化学成分和药理活性与相应的药品存在较大差异,将给消费者的健康带来潜在的风险,为此,发酵虫草产品的真伪鉴别和质量评价对市场监管显得尤为重要。

中药由于其挥发性物质的差异,能呈现出不同的气味。野生冬虫夏草具有腥香气味,发酵虫草菌丝也都具有浓郁的气味,因此可以通过挥发性成分的分析,达到质量评价和真伪鉴别的目的。中药中挥发性成分的分析一般采用GC法或GC-MS法,样品的前处理是分析过程的关键步骤。常用的挥发性成分预处理方法有同时蒸馏萃取法、水蒸气蒸馏法、溶剂萃取法、超临界流体萃取法等^[5-6],这些方法普遍存在样品和溶剂用量大,操作烦琐,提取溶液的再浓缩步骤易损失低沸点成分等缺点。固相微萃取技术(SPME)是1990年由Pawliszyn科研小组发明的一种样品前处理与富集萃取技术^[7-8],该技术属于非

溶剂型选择性萃取方法^[9],它集采样、萃取、浓缩、进样等步骤于一身,具有灵敏度高,操作简便快速,成本低,环境友好等特点^[10]。

SPME包括直接固相微萃取(direct-solidphase micro-extraction, DI-SPME)和顶空固相微萃取(headspace-solidphase micro-extraction, HS-SPME)^[11],其中HS-SPME适合分析易挥发性和半挥发性物质,它能全面快速地获得样品中挥发性物质的组成信息,广泛应用于挥发性成分的检测^[12-13]。本文建立了发酵虫草菌丝粉的HS-SPME/GC-MS分析方法,对发酵虫草制剂金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊中的挥发性成分进行分析,并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)这2种化学计量学方法,对不同发酵虫草产品及其真伪进行鉴别,在此基础上,进一步寻找不同发酵虫草产品中特征的差异性挥发成分,为发酵虫草制剂的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

GC-MS-QP2010plus 仪(Shimadzu 公司);DB-5 MS 毛细管柱(30 m × 0.25 μm × 0.25 mm;固定相:(5%-苯基)-甲基聚硅氧烷,非极性;安捷伦公司);1 cm 的 PA、CAR/PDMS、PDMS/DVB、DVB/CAR-PDMS 萃取头和手动 SPME 进样器(Supelco 公司);CPA225D 型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海英予仪器有限公司)。

金水宝胶囊(批号131004、130913、140208,江西济民可信药业有限公司),百令胶囊(批号121243、130749、131128,杭州中美华东制药有限公司),宁心宝胶囊(批号1306002、1401001、1401003,正大青春宝药业有限公司),至灵胶囊(批号130406、130703、130902,杭州天缘药业有限公司),心肝宝胶囊(批号130407、18130101、18140104,河北长天药业有限公司);网购伪品A(蝙蝠蛾被孢霉菌粉),网购伪品B(中国被毛孢菌粉),网购伪品C(虫草头孢菌粉)。

2 HS-SPME 方法

精密称取胶囊内容物或粉末样品30 mg,置于8 mL 低流失样品瓶内,90 °C 恒温水浴中预平衡40 min。取预先在GC进样口270 °C老化30 min的固相萃取头,通过聚四氟乙烯隔垫插入样品瓶顶空部分,在90 °C 恒温下萃取吸附80 min后,抽出萃取头,迅

速插入在预运行状态下的 GC-MS 进样口,于 250 °C 状态下解吸 2 min 后,进行气质联用分析。

3 GC-MS 分析条件

采用 DB-5 MS 毛细管柱(30 m×0.25 μm×0.25 mm),氮气作载气,程序升温(初始温度 40 °C,停留 5 min,以 2 °C·min⁻¹ 的速度升至 200 °C,停留 10 min),不分流进样,载气流速 1 mL·min⁻¹,进样口温度 250 °C,离子源温度 230 °C,接口温度 250 °C,四极杆温度 150 °C,离子源电压 70 eV,质谱扫描范围 *m/z* 30~500。

4 数据分析

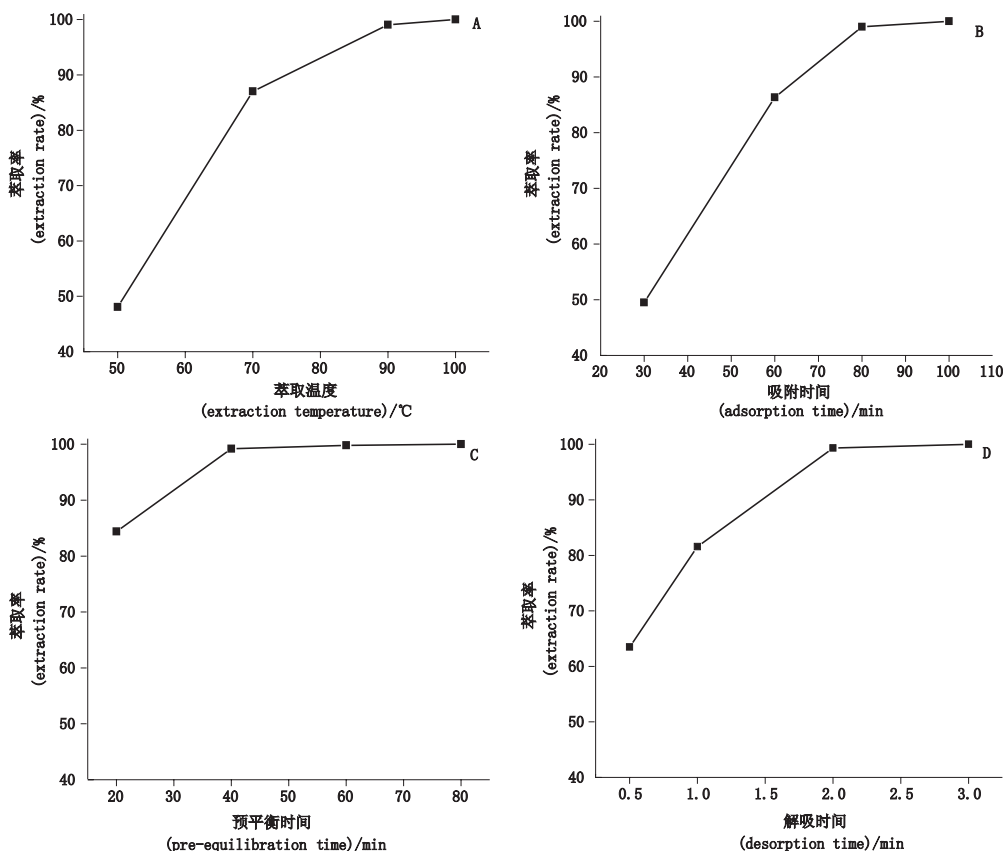
实验得到的 GC-MS 总离子流图数据通过 NIST 11 谱库检索定性,用峰面积归一化法计算各成分的相对含量,采用 SIMCA 13.0 软件进行多元化统计处理和分析。

5 结果与讨论

5.1 萃取条件的优化 首先通过实验对 SPME 萃

取头的类型(长度为 1 cm 的 PA、CAR/PDMS、PDMS/DVB 和 DVB/CAR-PDMS)进行选择;结果发现,DVB/CAR-PDMS 萃取头得到的 HS-SPME/GC-MS 的总离子流图中,挥发性成分种类最多,总峰面积最大,说明该萃取头对发酵虫草菌丝粉中的挥发性成分有较好的吸附和保留性,因此选择 DVB/CAR-PDMS 纤维萃取头进行后续的 SPME 分析。还考察了样品用量对分析结果的影响;结果表明,样品用量为 10、30、50、70 mg 时,挥发性物质的总峰面积基本一致,考虑到样品称量误差的控制,最终选择 30 mg 作为实验样品用量。

优化了萃取温度、吸附时间、预平衡时间、解吸时间等萃取条件。为消除样品不均匀性的影响,分别以各优化项目下所检出的挥发性物质的最大总峰面积作为基准计算萃取率,以萃取率为评价指标,所得结果见图 1。



A. 萃取温度的影响: 吸附时间 60 min, 预平衡时间 60 min, 解吸时间 2 min (effects of extraction temperature: adsorption time 60 min, pre-equilibration time 60 min, desorption time 2 min) B. 吸附时间的影响: 萃取温度 90 °C, 预平衡时间 60 min, 解吸时间 2 min (effects of adsorption time: extraction temperature 90 °C, pre-equilibration time 60 min, desorption time 2 min) C. 预平衡时间的影响: 萃取温度 90 °C, 吸附时间 80 min, 解吸时间 2 min (effects of pre-equilibration time: extraction temperature 90 °C, adsorption time 80 min, desorption time 2 min) D. 解吸时间的影响: 萃取温度 90 °C, 吸附时间 80 min, 预平衡时间 40 min (effects of desorption time: extraction temperature 90 °C, adsorption time 80 min, pre-equilibration time 60 min)

图 1 不同萃取条件对挥发性物质萃取率的影响

Fig. 1 Effects of different extraction conditions on the extraction rate of volatile compounds

由图 1-A 可以看出,随着萃取温度的升高,发酵虫草菌粉挥发性物质的萃取率呈现上升趋势。由于温度过高可能会导致易挥发的物质在萃取头上提前解吸,或者使热稳定性低的化合物分解,所以最终选择 90 °C 作为最佳萃取温度;由图 1-B 可知,随着吸附时间的延长,挥发性物质的萃取率显著增大,当达到 80 min 后,总峰面积变化不大,表明挥发性物质吸附和解吸过程已经达到了动态平衡,因此选择 80 min 作为最佳吸附时间;由图 1-C 可以看出,预平衡时间的变化对挥发性物质萃取率的影响不大,预平衡 40 min 后,挥发性物质的萃取率趋于稳定,说明菌粉中的挥发性物质达到了挥发平衡,最终选择 40 min 作为最佳预平衡时间;由图 1-D 可知,随着解吸时间的

延长,发酵虫草菌粉挥发性物质的萃取率显著增大,在 2 min 以后,萃取率的变化趋于平缓。考虑到样品挥发性物质的解吸是在高温下进行的,而高温可能导致挥发性物质的分解,因此在能满足挥发性物质完全解吸的条件下,解吸时间越短,对样品挥发性物质的不利影响越小,因此最终选择 2 min 作为最佳解吸时间。

通过对上述萃取条件的优化,最终确立的 HS-SPME 条件见“3”项下。

5.2 5 种发酵虫草制剂的 HS-SPME/GC-MS 分析结果 利用建立的 HS-SPME/GC-MS 方法,分别对金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊 5 种发酵虫草制剂的挥发性成分进行分析,得到的总离子流色谱图见图 2。

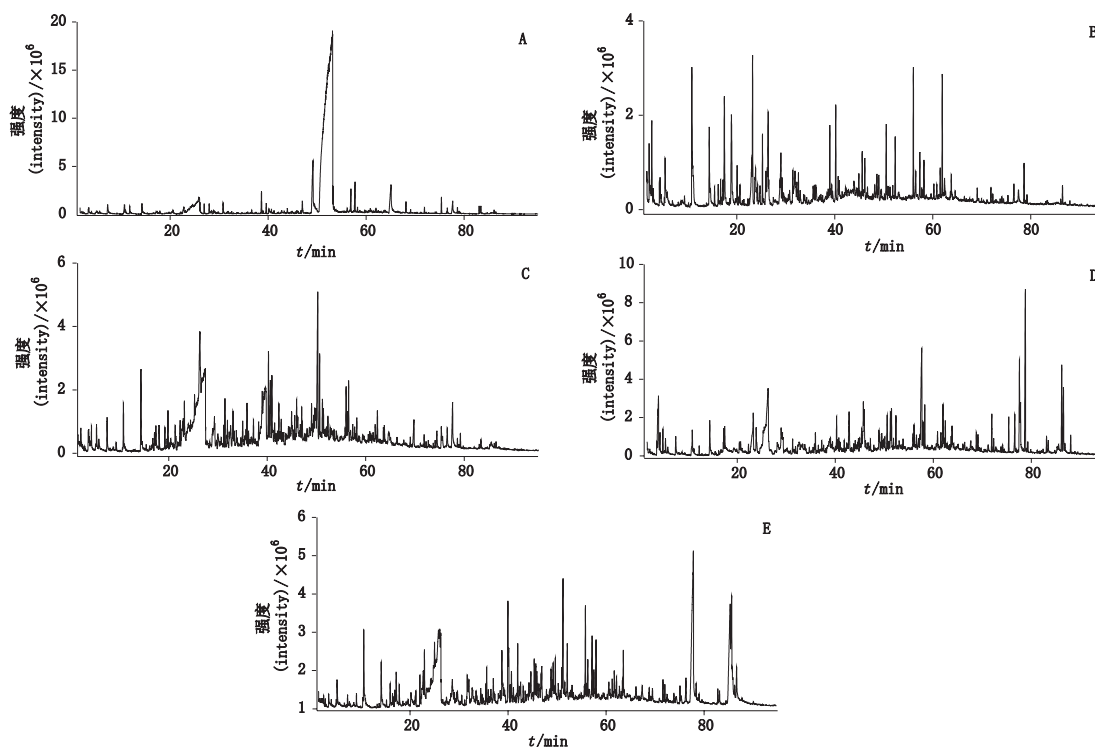


图 2 金水宝胶囊 (A)、百令胶囊 (B)、宁心宝胶囊 (C)、至灵胶囊 (D) 和心肝宝胶囊 (E) 的挥发性物质总离子流图

Fig. 2 The total ion chromatograms of volatile compounds extracted from Jinshuibao capsules (A), Bailing capsules (B), Ningxinbao capsules (C), Zhiling capsules (D) and Xingnanbao capsules (E)

通过 NIST11 谱库检索,鉴定了各产品中主要的挥发性成分,同时采用峰面积归一化法计算各组分的相对百分含量,鉴定结果及峰面积百分比见表 1。

由表 1 可以看出,在金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊 5 种发酵虫草制剂中分别鉴定出 56、71、72、81、75 个化合物,分别占挥发性成分的 93.6%、82.78%、84.94%、91.24%、83.9%,大体可以归为醇类、羧酸类、醛类、酚类、烃类、硫醚类、含氮杂环、

吡嗪类、酮类、含氧杂环、酯类共 11 类化合物,且成分种类和相对含量有较大差异。金水宝胶囊的内酯类含量最高,其中的马索亚内酯占总挥发性成分的 76.41%,远高于其他发酵虫草产品;百令胶囊的挥发性成分中,吡嗪类杂环化合物含量较高;宁心宝胶囊的挥发性成分中,除吡嗪类化合物以外的含氮杂环类所占比例较高;至灵胶囊的挥发性成分中,脂肪酸酯类所占比例较高;心肝宝胶囊的挥发性成分中,脂肪酸类化合物含量较高。

表 1 固相微萃取 / 气 - 质联用分析不同菌株挥发性成分结果

Tab. 1 Analysis of HS-SPME/GC/MS for five fermented *Cordyceps* preparations

类型 (type)	t_R /min	化合物 (compound)	峰面积百分比 (ratio of peak area) / %				
			金水宝 (Jinshuibao)	百令 (Bailing)	宁心宝 (Ningxinbao)	至灵 (Zhiling)	心肝宝 (Xinganbao)
醇类 (alcohol)	1.64	丙酮醇 (acetol)	—	0.38	—	0.20	—
	3.88	2,3-丁二醇 (2,3-butanediol)	—	—	0.53	5.43	—
	16.2	1-辛烯-3-醇 (1-octen-3-ol)	—	0.63	0.16	0.12	0.47
	20.4	苯甲醇 (benzyl alcohol)	0.02	—	—	0.27	0.89
	26.33	苯乙醇 (phenylethyl alcohol)	—	0.89	3.57	0.31	0.66
	55.82	橙花叔醇 (nerolidol)	—	0.08	0.16	0.57	0.22
		合计 (the total ratio of peak area)	0.02	1.98	4.42	6.90	2.24
羧酸类 (carboxylic acid)	1.97	丙酸 (propanoic acid)	0.19	—	0.16	—	0.14
	8.72	异戊酸 (isovaleric acid)	0.02	—	0.15	0.05	0.03
	11.29	戊酸 (pentanoic acid)	0.04	—	—	—	—
	39.61	苯乙酸 (benzeneacetic acid)	—	—	9.51	1.10	—
	57.03	十二酸 (dodecanoic acid)	—	—	—	0.71	—
	67.68	肉豆蔻酸 (tetradecanoic acid)	0.13	—	—	0.25	0.46
	77.83	棕榈酸 (hexadecanoic acid)	1.65	0.92	2.15	3.14	14.53
	85.26	亚油酸 (linoleic acid)	0.14	0.10	0.20	0.46	8.25
	85.55	油酸 (oleic acid)	0.12	0.05	0.19	0.40	3.92
	86.95	硬脂酸 (octadecanoic acid)	—	—	—	—	0.98
	合计 (the total ratio of peak area)	2.29	1.07	12.36	6.11	28.31	
醛类 (aldehyde)	4.18	己醛 (hexanal)	0.04	0.49	0.05	—	0.14
	10.14	庚醛 (heptanal)	—	0.12	0.02	0.03	0.03
	14.34	苯甲醛 (benzaldehyde)	0.34	3.63	2.08	1.86	1.38
	20.7	苯乙醛 (benzeneacetaldehyde)	0.03	—	—	0.29	—
	37.22	2-苯基-2-丁烯醛 (2-phenyl-2-butenal)	—	0.15	0.61	0.40	—
	37.53	肉桂醛 (3-phenyl-2-propenal)	0.10	0.29	—	—	0.18
	51.21	5-甲基-2-苯基-2-己烯醛 (5-methyl-2-phenyl-2-hexenal)	—	0.31	0.81	1.41	0.76
		合计 (the total ratio of peak area)	0.51	4.99	3.57	3.99	2.49
酚类 (phenol)	26.04	麦芽酚 (maltol)	0.24	1.64	—	7.24	2.32
	26.42	对甲苯酚 (<i>p</i> -cresol)	0.10	—	—	—	0.14
	31.42	4-乙基苯酚 (4-ethyl phenol)	—	—	1.02	0.61	—
	42.85	2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-dimethoxy-phenol)	0.14	0.23	0.51	2.54	0.51
		合计 (the total ratio of peak area)	0.48	1.87	1.53	10.39	2.97

表 1(续)

类型 (type)	t_R /min	化合物 (compound)	峰面积百分比 (ratio of peak area) / %				
			金水宝 (Jinshuibao)	百令 (Bailing)	宁心宝 (Ningxinbao)	至灵 (Zhiling)	心肝宝 (Xinganbao)
烃类 (hydrocarbon)	2.16	4-甲基-2-戊烯 (4-methyl-2-pentene)	—	0.21	—	0.09	0.04
	2.92	甲苯 (toluene)	—	0.21	0.05	0.03	0.11
	19.23	癸烷异构体 (decane isomer)	—	—	2.26	—	—
	25.23	十一烷 (undecane)	—	2.05	—	—	—
	30.8	萘 (naphthalene)	0.07	0.42	0.05	0.14	0.20
	32.56	十二烷 (dodecane)	0.06	0.69	—	—	0.09
	38.63	1-甲基萘 (1-methylnaphthalene)	0.11	0.42	—	—	0.25
	46.11	十四烷 (tetradecane)	0.08	1.43	0.10	0.17	0.45
	52.33	十五烷 (pentadecane)	—	2.19	0.48	1.03	1.01
	57.5	十六烯 (hexadecene)	—	5.15	2.45	1.48	3.82
	58.25	十六烷 (hexadecane)	0.13	1.21	0.53	1.62	1.20
	62.44	十七烯 (heptadecene)	—	0.71	—	1.09	—
	63.78	十七烷 (heptadecane)	—	0.71	0.41	0.72	0.90
	69.07	十八烷 (octadecane)	0.07	0.49	0.20	0.56	0.26
74.13	十九烷 (nonadecane)	0.04	0.21	0.14	0.25	0.14	
		合计 (the total ratio of peak area)	0.56	16.1	6.67	7.18	8.47
硫醚类 (thioether)	2.30	二甲基二硫醚 (methyl disulfide)	—	0.12	0.04	0.03	0.02
	14.66	二甲基三硫醚 (dimethyl trisulfide)	—	0.33	0.18	0.11	0.09
		合计 (the total ratio of peak area)	0	0.45	0.22	0.14	0.11
含氮杂环类 (nitrogen containing heterocycle)	2.16	1-甲基吡咯 (1-methylpyrrole)	—	—	0.24	—	—
	2.44	吡啶 (pyridine)	0.03	0.12	0.10	0.14	0.07
	2.64	吡咯 (pyrrole)	—	2.14	0.04	0.05	0.26
	18.02	戊基吡咯烷 (pentylpyrrolidine)	0.16	—	0.55	—	0.47
	19.15	2-甲酰基吡咯 (2-formylpyrrole)	—	—	—	0.38	—
	20.2	1-甲基-2-吡咯烷酮 (1-methyl-2-pyrro- lidinone)	0.05	—	—	0.20	—
	22.9	2-乙酰基吡咯 (2-acetylpyrrole)	0.37	3.87	0.73	4.73	1.16
	25.94	2-吡咯烷酮 (2-pyrrolidinone)	5.94	—	32.43	8.02	15.31
	29.8	1-乙酰基吡咯烷 (1-acetylpyrrolidine)	0.06	0.19	0.32	—	0.33
	31.87	2-哌啶酮 (2-piperidone)	—	1.59	—	—	—
	42.38	1-丁基-2-吡咯烷酮 (1-butyl-2-pyrro- lidinone)	0.04	—	0.80	0.34	1.44
		合计 (the total ratio of peak area)	6.65	7.91	35.21	13.86	19.04

表 1(续)

类型 (type)	t_R /min	化合物 (compound)	峰面积百分比 (ratio of peak area) / %				
			金水宝 (Jinshuibao)	百令 (Bailing)	宁心宝 (Ningxinbao)	至灵 (Zhiling)	心肝宝 (Xinganbao)
吡嗪类 (pyrazine)	2.09	吡嗪 (pyrazine)	—	0.86	—	—	—
	5.34	2-甲基吡嗪 (2-methylpyrazine)	0.08	2.10	0.54	0.54	0.75
	10.82	2,5-二甲基吡 (2,5-dimethylpyrazine)	0.26	9.44	1.53	1.99	3.26
	11.03	乙基吡嗪 (ethyl pyrazine)	—	0.24	0.08	0.07	0.12
	17.11	2-乙基-6-甲基吡嗪 (2-ethyl-6-methylpyrazine)	0.03	0.71	0.35	0.29	0.34
	17.4	三甲基吡嗪 (trimethyl-pyrazine)	0.04	4.85	0.43	0.98	1.00
	18.57	2-乙烯基-6-甲基吡嗪 (2-ethenyl-6-methylpyrazine)	—	0.28	—	—	—
	18.89	吡嗪酰胺 (pyrazinamide)	—	5.76	—	—	—
	23.16	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 (2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine)	0.07	5.10	0.57	—	0.96
	23.85	四甲基吡嗪 (tetramethyl-pyrazine)	—	—	—	1.05	—
	29	3,5-二乙基-2-甲基吡嗪 (3,5-diethyl-2-methylpyrazine)	—	1.76	—	0.10	—
	32.3	2,5-二甲基-3-异丁基吡嗪 (2,5-dimethyl-3-isobutylpyrazine)	—	0.64	0.34	—	0.60
	35.74	2-戊基-3-甲基吡嗪 (2-pentyl-3-methylpyrazine)	0.02	0.32	0.26	0.41	0.44
	35.85	2-异戊基-3-甲基吡嗪 (2-isopentyl-6-methylpyrazine)	0.03	0.43	0.81	0.81	0.74
	40.16	3-异戊基-2,5-二甲基吡嗪 (3-isopentyl-2,5-dimethylpyrazine)	0.12	3.19	2.03	1.69	2.68
	45.35	2,3,5-三甲基-6-异戊基吡嗪 (2,3,5-trimethyl-6-isopentylpyrazine)	—	0.10	0.16	0.69	0.18
		合计 (the total ratio of peak area)		0.65	35.78	7.10	8.62
酮类 (ketone)	9.29	2-庚酮 (2-heptanone)	0.04	0.22	0.17	0.07	0.25
	16.68	2-辛酮 (2-octanone)	—	0.70	—	—	—
	22.23	苯乙酮 (acetophenone)	0.06	0.22	0.15	0.36	0.86
	31.93	2-癸酮 (2-decanone)	—	—	0.38	—	0.50
	38.96	2-十一酮 (2-undecanone)	0.04	2.03	0.33	0.29	1.03
	47.13	苯己酮 (hexanophenone)	—	—	0.37	0.37	0.83
	49.01	反式-香叶基丙酮 (trans-geranylacetone)	—	0.87	0.51	0.62	0.81
	63.59	2-十五烷酮 (2-pentadecanone)	—	0.17	0.29	0.51	0.39
	合计 (the total ratio of peak area)		0.14	4.21	2.2	2.22	4.67

表 1(续)

类型 (type)	t_R /min	化合物 (compound)	峰面积百分比 (ratio of peak area) / %					
			金水宝 (Jinshuibao)	百令 (Bailing)	宁心宝 (Ningxinbao)	至灵 (Zhiling)	心肝宝 (Xinganbao)	
含氧杂环类 (oxygenated heterocycle)	5.8	糠醛 (furfural)	0.08	—	0.34	0.38	0.07	
	7.44	2-糠醇 (2-furanmethanol)	0.42	—	0.94	1.29	0.38	
	10.62	2-乙酰基呋喃 (2-acetylfuran)	—	0.05	0.06	0.15	0.25	
	10.85	γ -丁内酯 (γ -butyrolactone)	0.13	—	—	—	—	
	16.66	2-戊基呋喃 (2-amylfuran)	—	—	0.04	0.08	0.20	
	19.84	5,6-二氢-2H-吡喃-2-酮 (5,6-dihydro-2H-pyran-2-one)	0.09	1.28	—	0.07	0.07	
	29.24	脱氢内酯 (dehydromevalonic lactone)	0.11	1.20	0.42	0.58	0.27	
	33.92	3-苯基呋喃 (3-phenyl-furan)	—	0.15	—	—	0.28	
	43.38	γ -壬内酯 (γ -nonanoic lactone)	0.04	—	0.26	0.13	0.34	
	50.27	5-己基二氢-2(3H)-呋喃酮 (5-hexyldihydro-2(3H)-furanon)	—	—	5.64	0.41	—	
	50.5	马索亚内酯 (massoia lactone)	76.41	2.85	1.96	1.64	0.43	
	53.28	δ -癸内酯 (δ -decalactone)	0.34	—	—	—	—	
	56.38	γ -十一内酯 (γ -heptylbutyrolactone)	—	—	0.42	—	—	
	65.28	四氢-4-羟基-6-戊基-2H-吡喃-2-酮 (tetrahydro-4-hydroxy-6-pentyl-2H-pyran-2-one)	3.25	—	—	—	—	
		合计 (the total ratio of peak area)	80.87	5.53	10.08	4.73	2.29	
	酯类 (ester)	4.82	乳酸乙酯 (lactic acid ethyl ester)	—	—	—	0.71	—
		30.62	苯乙酸甲酯 (methyl benzeneacetate)	—	0.13	0.16	—	—
		35.47	苯乙酸乙酯 (benzeneacetic acid ethyl ester)	—	—	—	0.20	—
		45.86	癸酸乙酯 (decanoic acid ethyl ester)	—	—	—	0.43	—
57.92		十二酸乙酯 (dodecanoic acid ethyl ester)	—	—	—	1.11	—	
68.77		十四酸乙酯 (tetradecanoic acid ethyl ester)	—	—	—	0.78	—	
75.37		棕榈酸甲酯 (hexadecanoic acid methyl ester)	0.34	0.27	0.73	1.34	0.38	
77.58		9-十六碳烯酸乙酯 (9-hexadecenoic acid ethyl ester)	—	—	—	4.27	—	
78.65		棕榈酸乙酯 (hexadecanoic acid ethyl ester)	0.29	1.23	0.17	9.19	0.37	
83.08		亚油酸甲酯 (linoleic acid methyl ester)	0.21	0.09	0.08	0.58	0.30	
83.43		油酸甲酯 (elaidic acid methyl ester)	0.17	0.11	0.16	0.41	0.21	
84.83		硬脂酸甲酯 (methyl stearate)	0.04	0.05	0.03	0.12	0.10	
86.13		亚油酸乙酯 (linoleic acid ethyl ester)	0.23	0.17	0.11	3.95	0.45	
86.48		油酸乙酯 (oleic acid ethyl ester)	0.15	0.67	0.14	3.24	0.34	
88.04		硬脂酸乙酯 (octadecanoic acid ethyl ester)	—	0.17	—	0.77	0.09	
	合计 (the total ratio of peak area)	1.43	2.89	1.58	27.1	2.24		

注 (note): “—” 表示峰面积百分比低于 0.01% (“—” means the ratio of peak area is lower than 0.01%)

5.3 发酵虫草产品的鉴别 本文通过 PCA 对不同发酵虫草样品的 HS-SPME/GC-MS 数据进行分析, 以实现不同发酵虫草产品的真伪鉴别。以 5 种发酵虫草菌产品(各 3 个批次)和 3 种网购产品的 HS-SPME/GC-MS 总离子流图中各挥发性成分的峰面积百分比为特征值, 利用 SIMCA 13.0 软件进行 PCA, 得到的三维图见图 3。由图 3 可以看出, 5 种发酵虫草制剂产品金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、心肝宝胶囊和至灵胶囊的 3 个不同批次的数据均紧簇在一起, 即不同批次的产品中挥发性成分的种类和含量基本一致, 表明这些发酵虫草制剂不论是在菌种特性和发酵工艺方面, 均能实现稳定可控, 产品的质量可靠。

由图 3 还可以看出, 5 种发酵虫草制剂分布在 PCA 三维空间的 5 个相对独立的区域, 可得到很好的区分, 表明这 5 种发酵制剂的挥发性物质在成分和含量上存在差异, 提示挥发性成分可能是不同发酵虫草产品具有不同药理活性的物质基础之一。同时也表明, 利用 HS-SPME/GC-MS 结合 PCA 方法, 还可以方便地直观区分 5 种发酵虫草制剂产品。

对比图 3 中 5 种发酵产品和网购产品 A、B、C 的相对位置发现, 3 种网购产品与其发酵菌株相应的制剂相距较远, 表明网购产品可能并非其标示菌种发酵制得, 或由于发酵工艺的不同导致挥发性化学成分的差异。由此可见, 利用 HS-SPME/GC-MS 结合 PCA 方法还可以快速、方便、直观地鉴别发酵虫草产

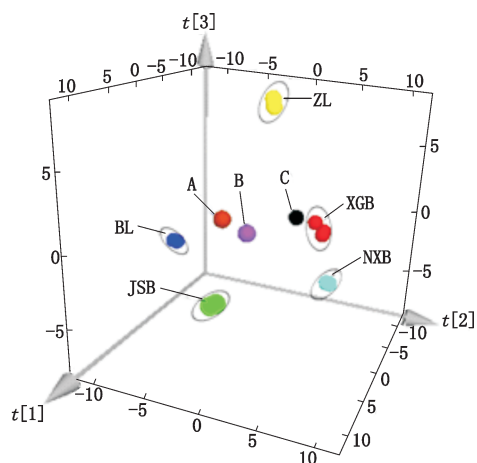


图 3 金水宝胶囊 (JSB, $n=3$)、百令胶囊 (BL, $n=3$)、宁心宝胶囊 (NXB, $n=3$)、至灵胶囊 (ZL, $n=3$)、心肝宝胶囊 (XGB, $n=3$) 和网购产品 (A、B、C) 的 PCA 三维得分图

Fig. 3 PCA score scatter 3D plot of Jinshuibao capsules (JSB, $n=3$), Bailing capsules (BL, $n=3$), Ningxinbao capsules (NXB, $n=3$), Zhiling capsules (ZL, $n=3$), Xinganbao capsules (XGB, $n=3$) and online shopping products (A, B and C)

品的真伪, 为发酵虫草产品的质量评价和鉴别提供了一种新思路。

5.4 发酵虫草产品的特征性挥发成分的寻找 借鉴代谢组学的研究思路, 利用有监督模式的聚类分析方法 PLS-DA, 对 5 种发酵虫草制剂的 HS-SPME/GC-MS 数据进行分析, 以寻找不同发酵虫草产品的特征性指标成分或药效成分。由 PLS-DA 得到载荷图如图 4 所示。

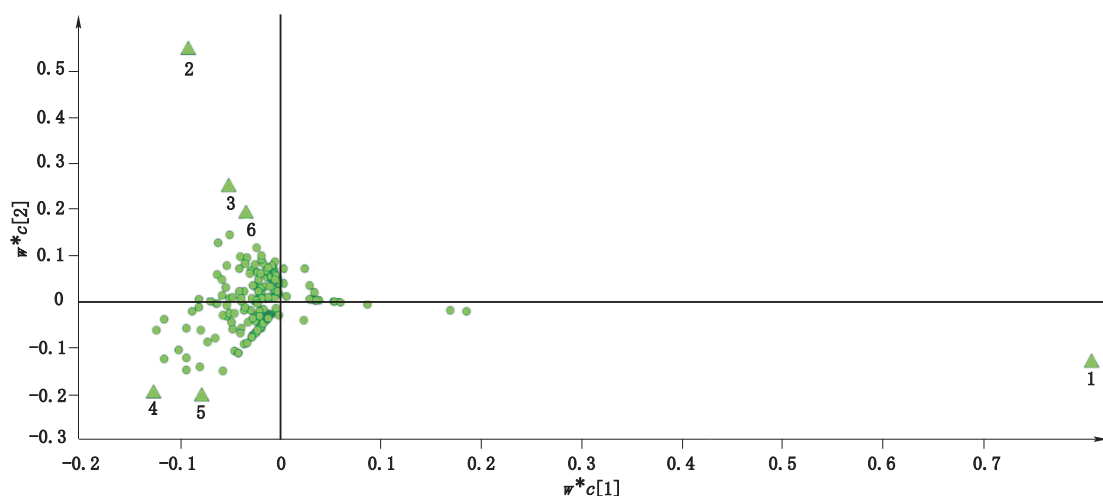


图 4 5 种发酵虫草制剂产品的载荷图

Fig. 4 Loading scatter plot of five fermentation products of *C. sinensis*

以 PLS-DA 分析得到的 VIP 值(变量重要性投影值)大于 1.7 作为显著性差异标准,并对载荷图进行筛选分析发现,有 6 个挥发性成分偏离了原点和主要化合物团,是对 5 种发酵虫草产品分离贡献较大的

化合物,可作为区分不同发酵虫草制剂的标志性物质。6 个差异性成分及其在发酵虫草产品中的峰面积百分比见表 2。

表 2 发酵虫草产品中的差异性成分及其在发酵虫草产品中的峰面积百分比

Tab. 2 Differential compounds and their peak area percentage in fermentation products of *C. sinensis*

序号 (No.)	VIP 值 (VIP score)	化合物 (compound)	峰面积百分比 (ratio of peak area) / %				
			金水宝 (Jinshuibao)	百令 (Bailing)	宁心宝 (Ningxinbao)	至灵 (Zhiling)	心肝宝 (Xinganbao)
1	7.57	马索亚内酯(massoia lactone)	76.41	2.85	1.96	1.64	0.43
2	5.02	2-吡咯烷酮(2-pyrrolidinone)	5.94	—	32.43	8.02	15.31
3	2.27	棕榈酸(hexadecanoic acid)	1.65	0.92	2.15	3.14	14.53
4	2.26	2,5-二甲基吡嗪 (2,5-dimethylpyrazine)	0.63	9.44	1.53	1.99	3.26
5	2.13	吡嗪酰胺(pyrazinamide)	—	5.76	—	—	—
6	1.71	棕榈酸乙酯(hexadecanoic acid ethyl ester)	0.29	1.23	0.17	9.19	0.37

由表 2 看出,经 PLS-DA 得到的载荷图寻找到的 6 个差异性成分分别为马索亚内酯、2-吡咯烷酮、棕榈酸、2,5-二甲基吡嗪、吡嗪酰胺和棕榈酸乙酯。其中马索亚内酯在金水宝胶囊挥发性成分中占极高比例,据报道,马索亚内酯具有潜在的抗真菌、抗病毒以及抗肿瘤活性^[14-15],金水宝胶囊独特而广泛的药理活性可能与其有关,所以马索亚内酯可考虑作为金水宝胶囊的特征性指标成分。百令胶囊的挥发性成分中含有较高的 2,5-二甲基吡嗪,但 2,5-二甲基吡嗪在其他虫草产品中的相对含量也较高,因此特征性不强。与 2,5-二甲基吡嗪相比,百令胶囊挥发性成分中的吡嗪酰胺更加具有特征性,并且吡嗪酰胺是一种重要的一线抗结核药物^[16],因此可以考虑将吡嗪酰胺作为百令胶囊的特征性指标成分。宁心宝胶囊的挥发性成分中含有较高的 2-吡咯烷酮,具有较强的特征性。2-吡咯烷酮常以药物中间体的形式进行功能化修饰,在医药行业应用广泛。至灵胶囊的棕榈酸乙酯可作为其特征的差异性指标成分;结合表 1 也可以发现,至灵胶囊中脂肪酸酯类化合物所占比例较高,达 27.1%。脂质是有机体的基本成分,能有效地增强细胞功能,提高细胞的代谢能力,供给人体所需的能量。心肝宝胶囊的挥发性成分中,除 2-吡咯烷酮占较高比例以外,脂肪酸类化合物含量也较高。脂肪酸是重要的生物活性成分,在抗氧化、抗血脂及

心肌保护等功能上具有广泛的药理作用^[17],相比于其他发酵虫草制剂,心肝宝胶囊中棕榈酸的相对含量较高,棕榈酸能够降低血清中的胆固醇含量^[17],可能是心肝宝胶囊中的特征性药效成分之一。

参考文献

- [1] 邹秦文,肖新月,林瑞超.冬虫夏草液体深层发酵菌丝体相关制剂的研究现状[J].药物分析杂志,2009,29(4):680
ZOU QW, XIAO XY, LIN RC. The research situation of related preparation of submerged fermentation of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(4): 680
- [2] 姚书文,李钰,陈丽华,等.冬虫夏草及各种发酵虫草菌粉产品药理学差异的文献研究[J].中国药房,2015,26(3):294
YAO SW, LI Y, CHEN LH, et al. Pharmacodynamic differences in the literature research of *Cordyceps sinensis* and its fermented mycelium [J]. *China Pharm*, 2015, 26(3): 294
- [3] 黄慧莲,杨敏娟,管咏梅,等.近 5 年发酵虫草菌粉的化学成分和临床应用研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(10):2242
HUANG HL, YANG MJ, GUAN YM, et al. Review on chemical compositions and clinical application of cultured *Cordyceps militaris* in recent five years [J]. *World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med Mater Med*, 2014, 16(10): 2242
- [4] 张萍,郑天骄,张文娟,等.5 种发酵虫草菌丝类制剂的特征图谱及其模式识别研究[J].中国药理学杂志,2015,50(4):293
ZHANG P, ZHENG TJ, ZHANG WJ, et al. HPLC characteristic fingerprint and chemical pattern recognition of fermentation

- mycelium preparations [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(4): 293
- [5] PENG F, SHENG L, LIU B, *et al.* Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040(1): 1
- [6] 何颖. 中药挥发油提取方法分析 [J]. *天津药学*, 2015, 27(1): 47
- HE Y. The analysis of methods for extracting essential oils [J]. *Tianjin Pharm*, 2015, 27(1): 47
- [7] ARTHUR CL, PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers [J]. *Anal Chem*, 1990, 62(19): 2145
- [8] ZHANG ZY, YANG MJ, PAWLISZYN J. Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1994, 66(17): 844A
- [9] 马继平, 王涵文, 关亚风. 固相微萃取新技术 [J]. *色谱*, 2002, 20(1): 16
- MA JP, WANG HW, GUAN YF. New technologies of solid-phase microextraction [J]. *Chin J Chromatogr*, 2002, 20(1): 16
- [10] ARTHUR CL, POTTER DW, BUCHHOLZ KD, *et al.* Solid-phase microextraction for the direct analysis of water: theory and practice [J]. *LC GC*, 1992, 10(9): 656
- [11] 余泽红, 贺小贤, 丁勇, 等. 固相微萃取在食品挥发性组分测定方面研究进展 [J]. *粮食与油脂*, 2010(7): 44
- YU ZH, HE XX, DING Y, *et al.* Research progress on solid phase micro-extraction determination of volatile components in foods [J]. *Cereals Oils*, 2010(7): 44
- [12] 乐之歆, 庄伟强, 黄健, 等. 固相微萃取/气-质联用分析猴头菇挥发性风味成分 [J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 278
- LE ZX, ZHUANG WQ, HUANG J, *et al.* Analysis of volatile flavors in hericium erinaceus by using solid phase microextraction combined with GC-MS [J]. *Food Ind*, 2015, 36(9): 278
- [13] RIU-AUMATELL M, MIRO P, SERRA-CAYUELA A, *et al.* Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS [J]. *Food Res Int*, 2014, 57: 196
- [14] KISHIMOTO N, SUGIHARA S, MOCHIDA KYO, *et al.* *In vitro* antifungal and antiviral activities of γ - and δ -lactone analogs utilized as food flavoring [J]. *Biocontrol Sci*, 2005, 10(1/2): 31
- [15] BARROS ME, FREITAS JC, OLIVEIRA JM, *et al.* Synthesis and evaluation of (-)-massoialactone and analogues as potential anticancer and anti-inflammatory agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 76: 291
- [16] ZHANG Y, MITCHISON D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7(1): 6
- [17] 陈银基, 鞠兴荣, 周光宏. 饱和脂肪酸分类与生理功能 [J]. *中国油脂*, 2008, 33(3): 35
- CHEN YJ, JU XR, ZHOU GH. Classification and physiological function of saturated fatty acids [J]. *China Oil Fats*, 2008, 33(3): 35

(本文于 2017 年 1 月 16 日收到)