

基于多元统计学方法的亚香棒虫草与冬虫夏草化学差异研究

潘宏春¹, 阳 勇², 秦伟瀚², 李 卿², 雷中惠^{3*}

1. 重庆中药饮片厂有限公司, 重庆 408000

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

3. 重庆市长寿区人民医院 药学部, 重庆 401220

摘要: 目的 采用高分辨质谱分析鉴定亚香棒虫草 *Cordyceps hawkesii* 与冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 间差异性成分。方法 结合 PeakView、SIMCA-P 等软件、在线数据库 (Human Metabolome Database、Pub Chem、Metlin) 及二级碎片裂解规律分析鉴定区分 2 种虫草的显著差异性成分。结果 通过正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 发现区分亚香棒虫草与冬虫夏草的显著差异性成分共 12 个, 其中 11 个为氨基酸及其衍生物以及 1 个磷脂酰胆碱。结论 通过差异分析并未鉴定出如虫草素、腺苷等特征成分, 从化学层面证明了亚香棒虫草或可作为冬虫夏草的补充资源, 为亚香棒虫草深入开发应用提供科学支撑。

关键词: 亚香棒虫草; 冬虫夏草; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; 正交偏最小二乘判别分析; 差异成分

中图分类号: R282.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)16-4316-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.028

Analysis of chemical differences between *Cordyceps hawkesii* and *Cordyceps sinensis* based on multivariate statistics

PAN Hong-chun¹, YANG Yong², QIN Wei-han², LI Qing², LEI Zhong-hui³

1. Chongqing Traditional Herbal Pieces of Decoction Factory Co., Ltd., Chongqing 408000, China

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

3. Department of Pharmacy, Chongqing Changshou District People's Hospital, Chongqing 401220, China

Abstract: Objective To analyze and identify the significant different components between *Cordyceps hawkesii* and *Cordyceps sinensis* by using method of ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Methods** Mass spectrometry combined with formula finder of PeakView software and database (Human Metabolome Database, Pub Chem, Metlin) and secondary fragmentation analysis, significant different components were identified and analyzed. **Results** Through OPLS-DA analysis, it was found that 12 significant different components were identified. Eleven of them were amino acids and their metabolites, and one was phosphatidylcholine. **Conclusion** Surprisingly, characteristic components such as cordycepin and adenosine were not identified by significant difference analysis. In this study, it was proved that *C. hawkesii* can be used as a supplementary resource instead of *C. sinensis*, which provided scientific support for the further development and utilization of *C. hawkesii*.

Key words: *Cordyceps hawkesii* Gray; *Cordyceps sinensis*; UPLC-Q-TOF-MS; OPLS-DA; different components

虫草类中药材在中国已有较长的临床应用历史, 主要品种包括冬虫夏草、亚香棒虫草、蛹虫草、江西虫草、凉山虫草等^[1-4]。冬虫夏草被历版《中国药典》所收载, 《中国药典》2015 年版对其功能主治的描述为“具有补肾益肺、止血化痰之功效, 可

用于治疗肾虚精亏、阳痿遗精、腰膝酸痛、久咳虚喘、劳嗽咯血等症”, 从而证明虫草类中药材具有一定的临床药理活性^[5-10]。亚香棒虫草 *Cordyceps hawkesii* Gray, 又名古尼虫草、霍克斯虫草, 自 1973 年江西省中兽医研究所首次报道“亚香棒虫草”之

收稿日期: 2020-02-09

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2017ZX09101002-002-004); 重庆市科技局项目 (cstc2019jxjl-jbky0017); 重庆市自然科学基金项目 (cstc2019jcyj-msxmX0464)

作者简介: 潘宏春, 从事中药炮制与质量控制研究。E-mail: phc6976@163.com

*通信作者 雷中惠 E-mail: 1404976072@qq.com

后,中国国内研究人员陆续对亚香棒虫草的生物学特性进行了大量的研究^[11-13]。该虫草广泛分布于中国南方各省山区、丘陵地带,在江西、安徽、湖南等地民间均有较长的药用历史。亚香棒虫草的寄主昆虫湖南棒蝠蛾具有分布广、生育期短、食料易得且丰富、所需的环境条件并不十分严格、雌虫产卵量大、卵孵化率高、能适应室内人工饲养等诸多优势特点^[14-15]。由此可见,亚香棒虫草是具有巨大开发利用价值的虫草资源,据相关文献统计数据显示,目前中国国内亚香棒虫草销量已经占到冬虫夏草销量的 20%,且该比例呈逐年上升的趋势^[16]。

迄今为止对亚香棒虫草化学成分研究报道较少,且仅有采用化学分析和高效液相色谱进行初步定性、定量检测^[17-23],与现今分析手段相比已明显不足,本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 采集亚香棒虫草与冬虫夏草样品数据,并结合 PeakView、SIMCA-P 等软件及功能对 2 种虫草化学差异进行深入解析,有助于阐释亚香棒虫草的药效物质基础,为其深入开发应用及质量控制奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本,岛津公司); Triple TOF™ 4600 型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国,AB 公司); JY92-II D 型超声波细胞粉碎机(中国,宁波新艺超声设备有限公司); CPA225D 型十万分之一分析天平(德国,赛多利斯公司)。

1.1.2 试药 对照品虫草素(批号 110858-201503)、甘露醇(批号 100533-201304)、腺苷(批号 110879-200202)购于中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%;乙腈、甲醇(色谱级,德国 Merck 公司);甲酸(色谱级,美国 ACS 公司);甲醇(分析纯,重庆川东化工公司)。药材为重庆市中药研究院中药生药研究所采自不同产地,经重庆市中药研究院虫草研究所鲁增辉副研究员鉴定,1~10 号样品为麦角菌科虫草属真菌亚香棒虫草 *Cordyceps hawkesii* Gray 寄生在鳞翅目昆虫幼虫的子囊菌;11~20 号样品为麦角菌科虫草属真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的真菌子座和幼虫尸体的干燥复合体,样品收集详细信息见表 1。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取虫草素、甘露醇、腺苷对照品适

表 1 虫草样品收集信息

Table 1 Cordyceps sample collection information

编号	药材名称	产地	样品批号	基原
1	亚香棒虫草	贵州	201803-1	亚香棒虫草
2	古尼虫草	贵州	201803-3	亚香棒虫草
3	亚香棒虫草	广西	201705-1	亚香棒虫草
4	霍克斯虫草	安徽	201707-1	亚香棒虫草
5	古尼虫草	湖南	201710-1	亚香棒虫草
6	亚香棒虫草	重庆	201804-1	亚香棒虫草
7	霍克斯虫草	江西	201703-1	亚香棒虫草
8	霍克斯虫草	湖南	201710-2	亚香棒虫草
9	亚香棒虫草	贵州	201803-4	亚香棒虫草
10	亚香棒虫草	四川	201803-5	亚香棒虫草
11	冬虫夏草	西藏	201811-1	冬虫夏草
12	冬虫夏草	西藏	201811-2	冬虫夏草
13	冬虫夏草	西藏	201811-3	冬虫夏草
14	冬虫夏草	西藏	201811-4	冬虫夏草
15	冬虫夏草	西藏	201811-5	冬虫夏草
16	冬虫夏草	青海	201810-1	冬虫夏草
17	冬虫夏草	青海	201810-2	冬虫夏草
18	冬虫夏草	青海	201810-3	冬虫夏草
19	冬虫夏草	青海	201810-4	冬虫夏草
20	冬虫夏草	青海	201810-5	冬虫夏草

量于量瓶中,用体积分数为 20%的甲醇配制成质量浓度分别为 2.900、2.700、3.300 mg/mL 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

虫草样品切段后置于-80℃冰箱冷冻 1 h,迅速取出于研钵中研成细末,取虫草样品粉末 0.1 g,精密称定,置 5 mL 试管中,精密加入 45%甲醇 2 mL,精密称定质量,于超声波细胞破碎仪中超声处理(功率:600 W,频率:20 KHz) 30 min,取出,放冷,再次称定质量,用 45%甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 高分辨质谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度程序:0~1.5 min, 5% B; 1.5~9.0 min, 5%~58% B; 9.0~15.0 min, 58%~75% B; 15.0~20.0 min, 75%~85% B; 20.0~22.0 min, 85%~5% B; 22.0~25.0 min, 5% B; 体积流量 0.2 mL/min,柱温 30℃,进样体积 2 μL。

电喷雾离子源(ESI),正离子模式采集数据,

喷雾电压 (IS): +5 500 V; 雾化气压力 (GS1): 0.37 MPa; 气帘气压力 (CUR): 0.16 MPa; 辅助气压力 (GS2): 0.37 MPa; 离子源温度 (TEMP): 600 °C; 簇裂解电压 (DP): 60 V; 碰撞能量 (CE): 45 V; 碰撞能量滚动区间 (CES): 15 V; 检测模式为 IDA (信息关联采集模式), 多重质量亏损 (MMDF) 和动态背景扣除 (DBS) 为触发二级的条件, 满足该条件优先进行二级扫描。

2.4 数据处理方法

将亚香棒虫草与冬虫夏草质谱数据导入 Notepad 软件, 该软件会自动提取离子精确质荷比、保留时间、强度等信息, 并对每个离子进行编号; 再将 Notepad 软件处理的数据代入 SIMCA-P 14.1 软件进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 拟合, 分析得到显著差异性成分的质谱信息, 结合 PeakView 软件的 Formula Finder、Mass Calculators 等功能、在线数据库 (Human Metabolome Database、Pub Chem、Metlin、Chemical Book 等) 及二级碎片裂解规律, 对 2 种虫草间显著差异性化学成分进行分析鉴定。

3 结果与分析

3.1 差异性成分鉴定结果

OPLS-DA 分析是在主成分分析 (PCA) 的基础上, 有意识地将样本分组, 进行有监督的 OPLS-DA 分析, 结果表明模型对 X 变量的可解释性 R^2_X 为 0.883, 模型对 Y 变量的可解释性 R^2_Y 为 1.0, 模型的可预测性为 0.989, 说明对模型的评估良好。通过 Scatter 得分图 (图 1) 可以看出亚香棒虫草 (I) 与冬虫夏草 (II) 样品数据点区分明显, 表明亚香棒虫草在化学成分上与冬虫夏草有明显区别; 通过 S-plot 分析 (图 2), 共找到显著差异性离子 29 个, 结合 Human Metabolome Database、Pub Chem、Chemical Book、Metlin、PeakView 等数据库及软件, 对质谱一级、二级离子进行分析, 共鉴定出 12 个显著差异性成分 (表 2), 其中 11 个为氨基酸及其衍生物, 以及 1 个磷脂酰胆碱; 同时按该模型某 X 变量对 Y 变量的解释能力 (Variable influence on projection, VIP) 大小进行排序, 对 VIP 值大于 1 的离子进行解析鉴定, 其结果与 S-plot 分析一致。在 OPLS-DA 结果中并未发现如腺苷、虫草素等特征性成分, 能否表明 2 种虫草间化学成分乃至至于功效相似, 还有待课题组通过药理药效学实验进一步证实。

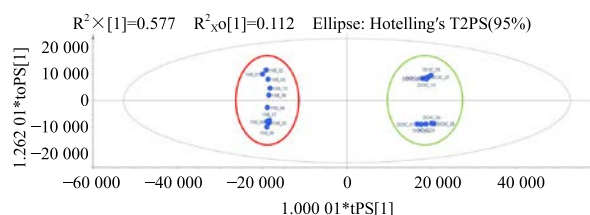


图 1 OPLS-DA 分析的得分图

Fig. 1 Score chart of OPLS-DA analysis

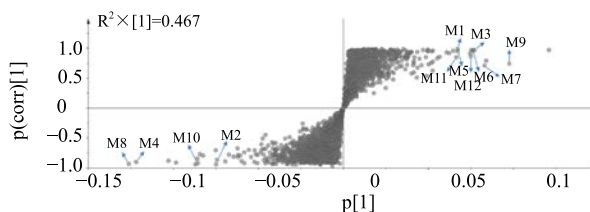


图 2 OPLS-DA 分析的 S-plot 图

Fig. 2 S-plot chart of OPLS-DA analysis

3.2 差异性成分的质谱裂解规律解析

M1 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$ 的质荷比为 175.196 0, 经质谱电离裂解作用连续脱去 17.026 0、17.028 2、45.022 3、14.028 0 生成质荷比为 158.170 0、141.141 8、130.173 7、116.145 7 的碎片离子 (图 3), 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 NH_3 、 CH_3NO 、 CH_2 的理论值分别为 17.026 00、45.020 92、14.015 10, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 RARECHEMAL BZ 0112。

M2 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$ 的质荷比为 657.321 0, 经质谱电离裂解作用分别脱去 18.006 4、47.026 1、144.058 5、162.065 6、217.060 4、231.074 0、249.081 5、328.075 7、375.142 7、393.151 4、417.149 3、425.116 9、443.126 3、472.151 6、512.146 8 生成质荷比为 639.314 6、610.294 9、513.262 5、495.255 4、440.260 6、426.247 0、408.239 5、329.245 3、282.178 3、264.169 6、240.171 7、232.204 1、214.194 7、185.169 4、145.174 2 的碎片离子 (图 4); 再由质荷比为 639.314 6、610.294 9 的离子分别脱去 18.006 3、18.006 8 生成 621.308 3 和 592.288 1 的碎片离子; 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 CH_3NO 、 $C_5H_8N_2O_3$ 、 $C_6H_{14}N_2O_3$ 、 $C_8H_{15}N_3O_4$ 、 $C_9H_{17}N_3O_4$ 、 $C_{13}H_{15}NO_4$ 、 $C_{18}H_{20}N_2O_4$ 、 $C_{19}H_{25}N_3O_5$ 、 $C_{19}H_{27}N_3O_6$ 、 $C_{22}H_{31}N_3O_5$ 、 $C_{19}H_{31}N_5O_6$ 、 $C_{23}H_{29}N_3O_6$ 、

表 2 亚香棒虫草与冬虫夏草的 OPLS-DA
Table 2 OPLS-DA analysis results of *C. hawkesii* and *C. sinensis*

编号	保留时间/min	离子峰归属	质荷比 (m/z)		偏差/ $\times 10^{-12}$	分子式	鉴定结果
			实测值	理论值			
M1	1.0	$[M+H]^+$	175.118 3	175.118 2	0.3	$C_6H_{14}N_4O_2$	RARECHEM AL BZ 0112
M2	1.8	$[M+H]^+$	657.326 0	657.325 2	1.3	$C_{32}H_{44}N_6O_9$	N2-[(benzyloxy) carbonyl]-N5-hydroxy-N2- <i>L</i> -ornithyl-N5-[(benzyloxy) carbonyl]- <i>N</i> -[(3 <i>S</i>)-1-hydroxy-2-oxo-3-piperidinyl]- <i>L</i> - ornithinamide
M3	2.1	$[M+H]^+$	294.118 9	294.119 2	-1.1	$C_{11}H_{19}NO_8$	(6 <i>R</i>)-5-acetamido-3,5-dideoxy-6-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)- 1,2-dihydroxypropyl]- α - <i>L</i> -threo-hex-2- ulopyranosonic acid
M4	2.3	$[M+H]^+$	281.149 7	281.149 5	0.7	$C_{14}H_{20}N_2O_4$	4-[(2-Methoxy-2-phenylethyl) carbamoyl] amino}butanoic acid
M5	5.3	$[M+H]^+$	547.289 4	547.288 3	1.9	$C_{27}H_{34}N_{10}O_3$	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-6-benzyl-3-methyl-4,7-dioxo-17- [(2-pyridinylmethyl) amino]-2,5,8,14,16,18, 19-heptaazabicyclo [13.3.1] nonadeca-1 (19), 15,17-triene-9-carboxamide
M6	7.1	$[M+H]^+$	679.358 9	679.354 2	1.7	$C_{38}H_{50}N_2O_9$	2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl [(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 5-benzyl-3-hydroxy-6-[(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-2-hydroxy- 2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yl] amino}-6-oxo-1- phenyl-2-hexanyl] carbamate
M7	8.5	$[M+NH_4]^+$	542.328 0	542.327 8	0.3	$C_{24}H_{40}N_6O_7$	tyr-ser-lys-lys
M8	10.0	$[M+Na]^+$	488.243 9	488.242 7	2.5	$C_{22}H_{35}N_3O_6$	4-amino-7-[(diaminomethylene)amino]- 2,3-dihydroxy- <i>N</i> -[1-(8-hydroxy-1-oxo-3,4- dihydro-1 <i>H</i> -isochromen-3-yl)-3-methylbutyl] heptanamide
M9	10.1	$[M+H]^+$	316.284 7	316.284 8	-0.5	$C_{18}H_{37}NO_3$	2-[(2-hydroxyethyl) amino] hexadecanoic acid
M10	10.1	$[M+Na]^+$	430.239 5	430.238 9	1.3	$C_{23}H_{37}NO_3S$	Geranylgeranylecysteine
M11	12.8	$[M+Na]^+$	418.307 0	418.306 7	0.6	$C_{22}H_{41}N_3O_3$	11-[(1-butyl-5-sec-butyl-2-oxo-2,5-dihydro- 1 <i>H</i> -imidazol-4-yl) amino] undecanoic acid
M12	13.2	$[M+H]^+$	520.341 4	520.338 3	4.9	$C_{26}H_{50}NO_7P$	LysoPC (18:2 (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>))

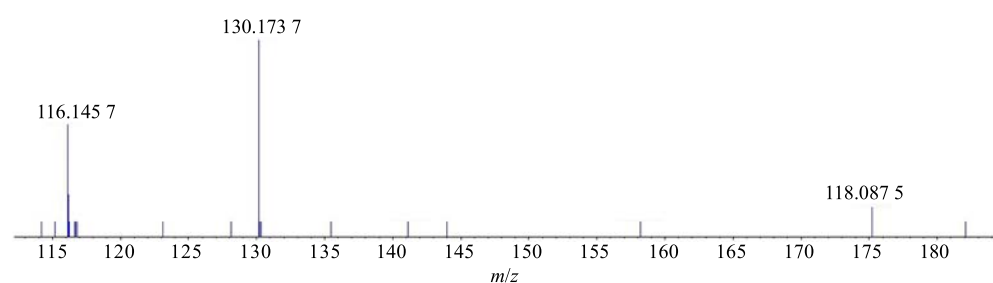


图 3 M1 质谱裂解规律

Fig. 3 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M1

$C_{24}H_{32}N_4O_6$ 、 $C_{26}H_{32}N_4O_7$ 的理论值分别为 18.010 02、47.036 57、144.052 94、162.099 89、217.105 71、231.121 36、249.099 56、328.141 76、375.178 87、393.189 44、417.225 82、425.226 89、443.205 09、472.231 64、512.226 55，与脱去碎片的实际值之差均小于 0.1。通过上述对二级碎片裂解规律的分

析并结合在线数据库及化合物结构特点，判定该化合物应为 N2-[(benzyloxy) carbonyl]-N5-hydroxy-N2-methyl-*L*-ornithyl-N5-[(benzyloxy) carbonyl]-*N*-[(3*S*)-1-hydroxy-2-oxo-3-piperidinyl]-*L*-ornithinamide。

M3 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$

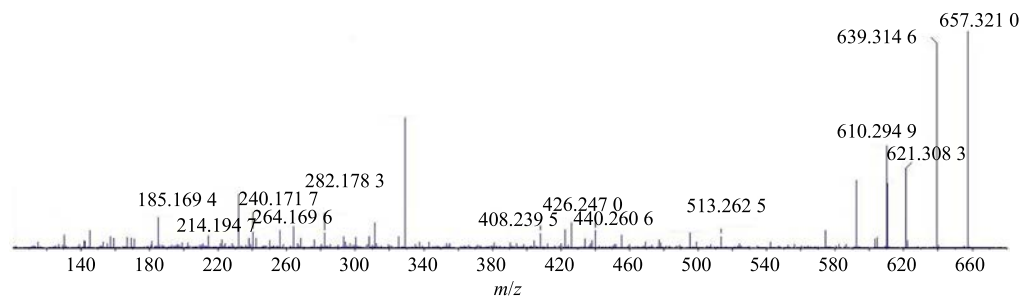


图 4 M2 质谱裂解规律

Fig. 4 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M2

的质荷比为 294.185 4, 经质谱电离裂解作用分别脱去 18.007 8、46.004 93 生成质荷比为 276.177 6、248.185 9 的碎片离子, 再由 248.185 9 的离子分别脱去 59.043 9、27.992 4 生成质荷比为 189.142 0、220.193 5 的碎片离子, 再由 220.193 5 的离子分别脱去 42.019 2、17.011 5 生成 178.174 3 和 203.168 2 的碎片离子, 最后由质荷比为 189.142 0 的离子脱去 27.993 9 生成 161.148 1 的碎片离子 (图 5); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 CH_2O_2 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}$ 、 CO 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ 、 OH 的理论值分别为 18.010 02、46.004 93、59.036 5727.994 37、42.010 02、17.002 19, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并

结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 (6R)-5-acetamido-3,5-dideoxy-6-[(1R,2R)-1,2-dihydroxypropyl]- α -L-threo-hex-2-ulopyranosonic acid。

M4 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比为 281.218 8, 经质谱电离裂解作用连续脱去 46.001 0、59.070 5、27.994 9、14.015 8 生成质荷比为 235.217 8、176.147 3、148.152 4、134.136 6 的碎片离子, 再由 134.136 6 的离子分别脱去 15.012 0、18.012 0、27.013 0 生成质荷比为 119.124 6、116.124 6、107.123 6 的碎片离子 (图 6), 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 CH_2O_2 、 $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$ 、 CO 、 CH_2 、 NH 、 H_2O 、 CHN 的理

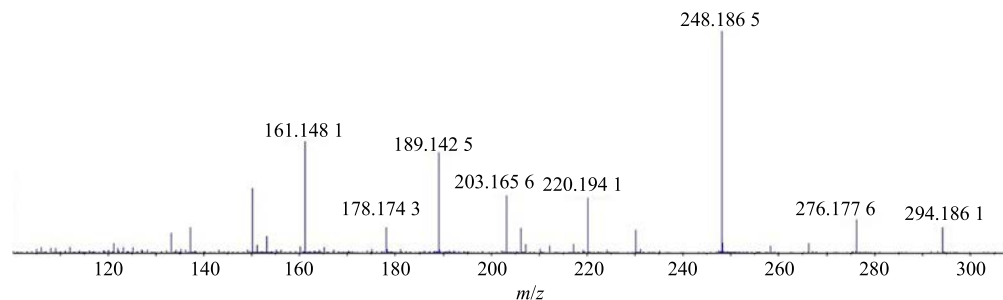


图 5 M3 质谱裂解规律

Fig. 5 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M3

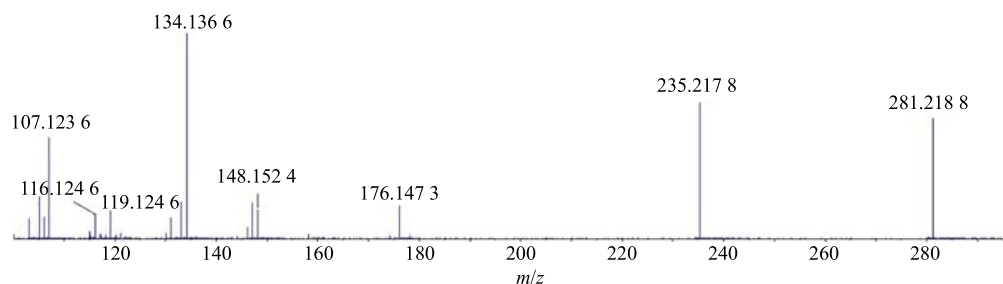


图 6 M4 质谱裂解规律

Fig. 6 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M4

论值分别为 46.004 93、59.072 95、27.994 37、14.015 10、15.010 35、18.010 02、27.010 35，与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点，判定该化合物应为 4-[(2-Methoxy-2-phenylethyl) carbamoyl] amino} butanoic acid。

M5 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$ 的质荷比为 547.309 6，经质谱电离裂解作用分别脱去 17.024 7、45.012 3、186.044 4、245.130 4、262.154 7、301.055 9、345.148 1、388.141 6 生成质荷比为 530.284 9、502.297 3、361.265 2、302.179 2、285.154 9、246.253 7、202.161 5、159.168 0 的碎片离子（图 7）；利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 NH_3 、 CH_3NO 、 $C_{12}H_{14}N_2$ 、 $C_{12}H_{11}N_3O_3$ 、 $C_{15}H_{22}N_2O_2$ 、 $C_{16}H_{19}N_3O_3$ 、 $C_{15}H_{23}N_9O$ 、 $C_{20}H_{20}N_8O$ 的理论值分别为 17.026 00、45.020 92、186.115 15、245.079 49、262.167 58、301.142 09、345.202 01、388.175 46，与脱去碎片的实际值之差均小于 0.1。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点，判定该化合物应为(3*S*,6*S*,9*R*)-6-benzyl-3-methyl-4,7-dioxo-17-[(2-pyridinylmethyl) amino]-2,5,8,14,16,18,19-heptaazabicyclo [13.3.1] nonadeca-1(19),15,17-triene-9-carboxamide。

M6 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$

的质荷比为 679.346 8，经质谱电离裂解作用分别脱去 18.004 3、277.083 0 生成质荷比为 661.342 5、402.263 8 的碎片离子，再由 402.263 8 的离子分别脱去 130.022 7、282.107 6 生成 272.241 1、120.156 2 的碎片离子，由质荷比为 272.241 1 的离子再脱去 17.024 5 生成 255.216 6 的碎片离子（图 8）；利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 $C_{15}H_{19}NO_4$ 、 $C_5H_8O_4$ 、 $C_{15}H_{22}O_5$ 、 NH_3 的理论值分别为 18.010 02、277.130 86、130.026 06、282.146 18、17.026 00，与脱去碎片的实际值之差均小于 0.1。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点，判定该化合物应为 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl [(2*S*,3*S*,5*R*)-5-benzyl-3-hydroxy-6-[(1*S*,2*R*)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl] amino}-6-oxo-1-phenyl-2-hexanyl] carbamate。

M7 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+NH_4]^+$ 的质荷比为 542.348 4，经质谱电离裂解作用分别脱去 43.979 9、121.051 1、221.123 6、312.179 4、415.240 4 生成质荷比为 498.368 5、421.297 3、321.224 8、230.169 0、127.108 0 的碎片离子，再由 498.368 5、421.297 3 的离子分别脱去 18.006 4 生成质荷比为 480.362 1 和 403.290 9 的碎片离子，由 230.169 0 的离子脱去 44.994 2 生成质荷比为 185.174 8 的碎片离子（图 7）；利用 PeakView 软

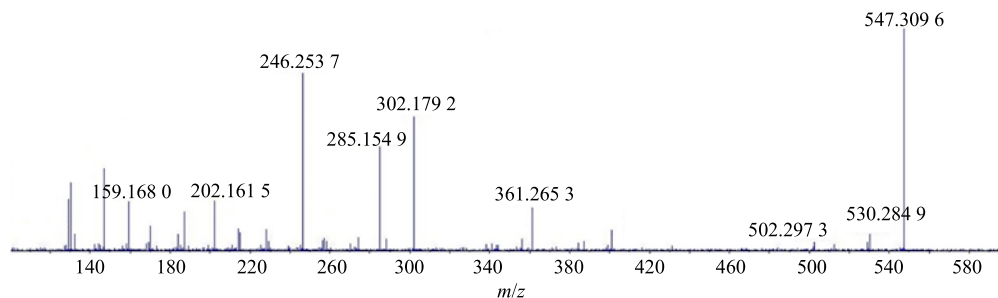


图 7 M5 质谱裂解规律

Fig. 7 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M5

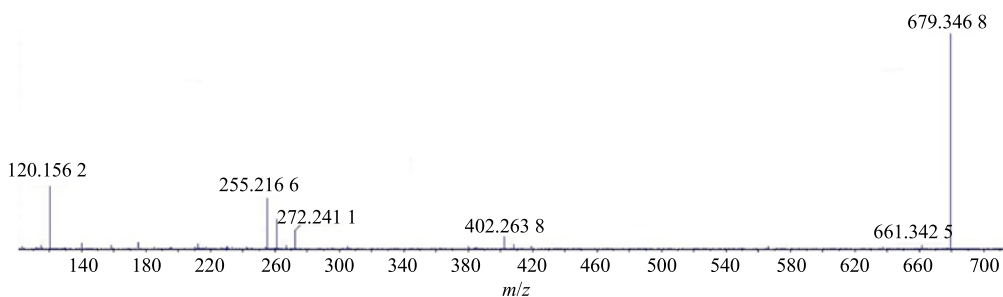


图 8 M6 质谱裂解规律

Fig. 8 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M6

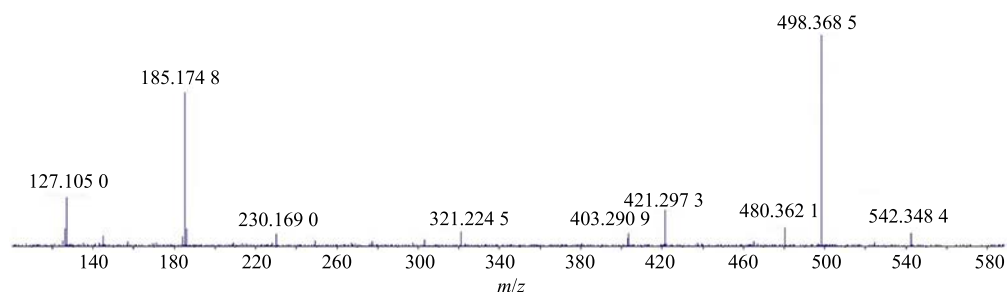


图 9 M7 质谱裂解规律

Fig. 9 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M7

件的 Mass Calculators 功能计算出 CO_2 、 $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$ 、 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ 、 $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6$ 、 H_2O 、 $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ 的理论值分别为 43.989 28、121.052 22、221.104 64、312.179 21、415.242 54、18.010 02、45.057 30, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.1。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 tyr-ser-lys-lys。

M8 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的质荷比为 488.277 9, 经质谱电离裂解作用分别脱去

18.007 6、27.990 3 生成质荷比为 470.270 3、460.287 6 的碎片离子, 再由 460.287 6 的离子脱去 45.998 9 生成质荷比为 442.279 0 的碎片离子 (图 10); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 CO 的理论值分别为 18.010 02、27.994 37, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 4-amino-7-[(diamino-methylene) amino]-2,3-dihydroxy-N-[1-(8-hydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-3-yl)-3-methylbutyl] heptanamide。

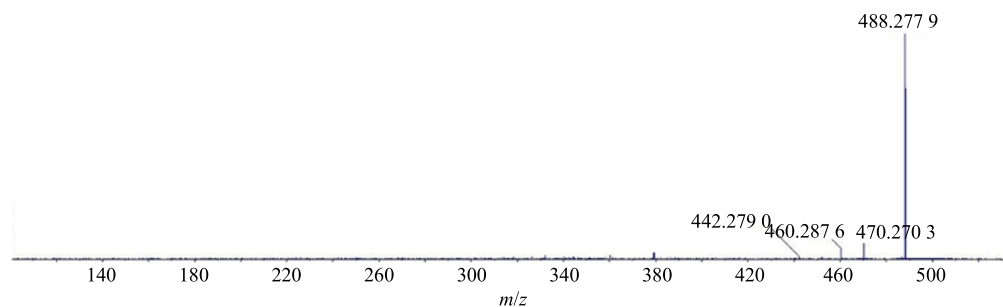


图 10 M8 质谱裂解规律

Fig. 10 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M8

M9 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质荷比为 316.349 1, 经质谱电离裂解作用脱去 18.008 2 生成质荷比为 298.340 9 的碎片离子, 再由 298.340 9 的离子分别脱去 18.008 0、30.007 2 生成质荷比为 280.332 9、268.333 7 的碎片离子, 再由 280.332 9 的离子分别脱去 18.009 2、30.008 0 生成质荷比为 262.323 7、250.324 9 的碎片离子, 最后由 262.323 7 的离子连续脱去 26.013 5、17.023 9 生成 236.310 2 和 219.286 3 的碎片离子 (图 11); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 CH_2O 、 C_2H_2 、 NH_3 的理论值分别为 18.010 02、30.010 02、26.015 10、17.026 00, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据

库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 2-[(2-hydroxyethyl) amino] hexadecanoic acid。

M10 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的质荷比为 430.284 9, 经质谱电离裂解作用分别脱去 18.007 8、45.999 2 生成质荷比为 412.277 1、384.285 7 的碎片离子, 再由 412.277 1 的离子脱去 18.007 7 生成质荷比为 394.269 4 的碎片离子 (图 12); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 CH_2O_2 的理论值分别为 18.010 02、46.004 93, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 Geranylgeranylcysteine。

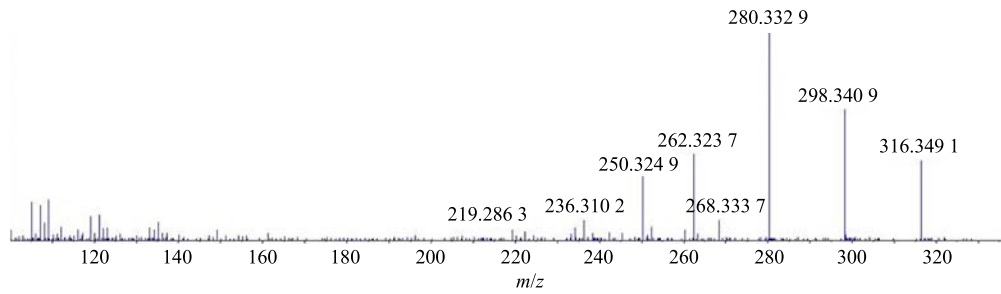


图 11 M9 质谱裂解规律

Fig. 11 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M9

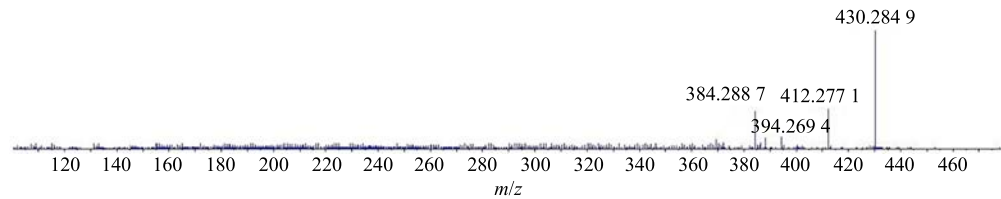


图 12 M10 质谱裂解规律

Fig. 12 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M10

M11 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+Na]^+$ 的质荷比为 418.355 0, 经质谱电离裂解作用分别脱去 18.006 0、262.201 5、45.997 9 生成质荷比为 400.349 0、156.153 5、372.357 1 的碎片离子, 再由 156.153 5 的离子脱去 46.007 7 生成质荷比为 110.145 8 的碎片离子 (图 13); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 $C_{15}H_{24}N_3O$ 、 CH_2O_2 的理论值分别为 18.010 02、262.191 39、46.004 93, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.01。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 11-[(1-butyl-5-sec-butyl-2-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazol-4-yl) amino] undecanoic acid。

M12 在 ESI+Positive 模式中的母离子 $[M+H]^+$ 的质荷比为 520.367 4, 经质谱电离裂解作用分别脱去 18.007 9、77.070 9、183.033 0、262.187 0、336.218 2、395.292 4、416.187 5 生成质荷比为 502.359 5、443.296 5、337.334 4、258.180 4、184.149 2、

125.075 0、104.179 9 的碎片离子, 再由 184.149 2 的离子脱去 18.010 4 生成质荷比为 166.138 8 的碎片离子 (图 14); 利用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H_2O 、 $C_4H_{15}N$ 、 $C_5H_{14}NO_4P$ 、 $C_{18}H_{30}O$ 、 $C_{21}H_{36}O_3$ 、 $C_{18}H_{38}NO_6P$ 、 $C_{21}H_{37}O_6P$ 的理论值分别为 18.010 02、77.119 90、183.065 50、262.229 12、336.265 90、395.243 13、416.232 23, 与脱去碎片的实际值之差均小于 0.1。通过上述对二级碎片裂解规律的分析并结合在线数据库及化合物结构特点, 判定该化合物应为 LysoPC (18:2 (9Z,12Z))。

3 讨论

以往研究证明亚香棒虫草是一种具有提高机体免疫力、促进睡眠、增强记忆力、镇痛等功效的重要中药材, 相较于冬虫夏草具有资源量大、易培育、对环境要求低、繁殖量大等诸多优势, 作为冬虫夏草替代品种在药材市场上已流通多年, 且比例呈逐年增加趋势。但由于化学物质基础、质量评价等相关研究的迟滞, 已经严重影响到亚香棒虫草的进一

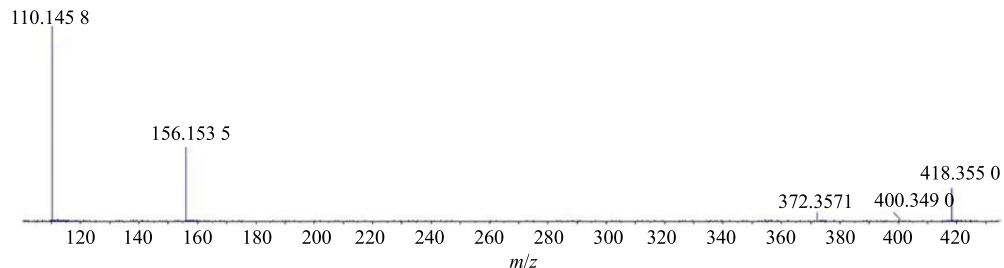


图 13 M11 质谱裂解规律

Fig. 13 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M11

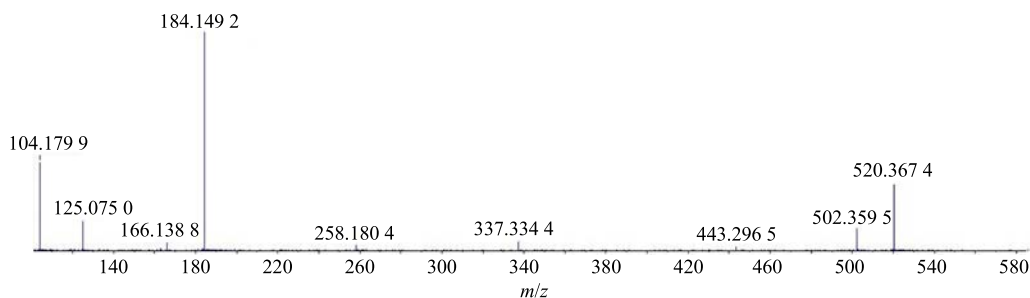


图 14 M12 质谱裂解规律图

Fig. 14 Secondary mass spectrometry pyrolysis regularity of M12

步开发利用。本研究采用高分辨质谱采集数据，并通过 OPLS-DA 研究了不同产地亚香棒虫草与冬虫夏草间的化学差异。通过本实验结果发现亚香棒虫草与冬虫夏草间存在显著差异性成分，但多为氨基酸及其衍生物，该类物质除了为机体提供营养之外，还可用于治疗用于治疗肝病、消化道疾病、脑病等多种病症，课题组后续会对亚香棒虫草进行分离纯化，结合药效、毒理实验来最终确定差异成分的活性。本研究从化学层面证明亚香棒虫草可以作为冬虫夏草的补充资源，该实验结果为亚香棒虫草的物质药效基础、质量控制等提供了科学依据。

参考文献

- [1] 苏燕燕, 李文佳, 杨 俐, 等. 冬虫夏草及虫草类产品 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 1965-1973.
- [2] 秦伟瀚, 刘 飞, 刘 翔, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析江西虫草化学成分 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1339-1344.
- [3] 秦伟瀚, 刘 翔, 阳 勇, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析凉山虫草化学成分 [J]. 分析测试学报, 2017, 36(3): 312-318.
- [4] 秦伟瀚, 刘 飞, 刘 翔, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析亚香棒虫草化学成分 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(2): 159-165.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] Yoshida J, Takamura S, Yamauchi N, et al. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines [J]. *Jpn J Exp Med*, 1989, 59(4): 157-161.
- [7] Zhang G, Huang Y, Bian Y, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(6): 1152-1156.
- [8] Won S Y, Park E H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(3): 555-561.
- [9] Zhang J, Yu Y, Zhang Z, et al. Effect of polysaccharide from cultured *Cordyceps sinensis* on immune function and anti-oxidation activity of mice exposed to ^{60}Co [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(12): 2251-2257.
- [10] Liu Z, Li P, Zhao D, et al. Protective effect of extract of *Cordyceps sinensis* in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats [J]. *Behav Brain Funct*, 2010, 6(6): 61-63.
- [11] 傅德清. 湖南棒蝠蛾成虫形态研究 [J]. 生物学杂志, 1998, 15(3): 16-17.
- [12] 杨明旭, 魏洪义, 吴德龙, 等. 湖南棒蝠蛾形态研究 [J]. 江西农业大学学报, 1997, 19(2): 3-6.
- [13] 江永成, 薛芳森, 吴德龙, 等. 虫草寄主湖南棒蝠蛾生物学特性研究 [J]. 江西农业大学学报, 1997, 19(2): 15-19.
- [14] 吴德龙, 王卫芳, 薛芳森, 等. 亚香棒虫草的研究 [J]. 江西农业大学学报, 1997, 19(2): 33-38.
- [15] 任翔萍. 亚香棒虫草的利用现状与展望 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12748-12749.
- [16] Kadota S, Shima T, Kikuchi T. Steroidal component of "I-Tiam-Hong" and *Cordyceps sinensis*, separation and identification by high-performance liquid chromatograph [J]. *J Pharm Soc Jpn*, 1986, 106(12): 1092-1097.
- [17] Li S P, Yang F Q, Tsim K W. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(5): 1571-1584.
- [18] Gong Y X, Li S P, Li P, et al. Simultaneous determination of six main nucleosides and bases in natural and cultured *Cordyceps* by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1055(1/2): 215-221.
- [19] Ling J Y, Sun Y J, Zhang H, et al. Measurement of cordycepin and adenosine in stroma of *Cordyceps* sp. by capillary zone electrophoresis (CZE) [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(4): 371-374.
- [20] Wu Y, Hu N, Pan Y, et al. Isolation and characterization of a mannooglucan from edible *Cordyceps sinensis* mycelium [J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342(6): 870-875.
- [21] Yu R, Wang L, Zhang H, et al. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(7/8): 662-666.
- [22] Yamada H, Kawaguchi N, Ohmori T, et al. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* [J]. *Carbohydr Res*, 1984, 125(1): 107-115.
- [23] Hattori M, Isomura S, Yokoyama E, et al. Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(6): 631-636.