

· 药学基础 ·

基于HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS的冬虫夏草“腥气” 辨识方法建立与应用

谭鹏¹, 朱薇², 包晓明², 耿福能³, 文永盛^{4*}, 张定堃^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 岛津企业管理(中国)有限公司, 成都 610023;

3. 四川好医生攀西药业有限责任公司药用美洲大蠊四川省重点实验室, 成都 615000;

4. 成都市食品药品检验研究院国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 成都 610045)

[摘要] 目的:建立和应用一种基于顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱联用技术的冬虫夏草“腥气”分析方法。方法:采用InertCap Pure-WAX毛细管柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm),进样口温度250℃,分流比5:1,载气为高纯氦气,色谱柱流量1.43 mL·min⁻¹,线速度43.3 cm·s⁻¹,吹扫流量3.0 mL·min⁻¹;程序升温(初始温度50℃,保持5 min,以10℃·min⁻¹升温至250℃,保持10 min;柱平衡时间2.0 min)。离子源为电子轰击离子源(EI),离子源温度200℃,质谱监测模式为多反应监测。结果:收集到7批冬虫夏草正品,其中四川3批,青海3批,西藏1批;6批伪品,其中四川3批,贵州2批,新疆1批。在冬虫夏草中共筛查出81种挥发性成分,按化学结构可分为13类(酯类、酮类、醛类、烯类、酚类、酸类、醇类、苯类、醚类、吡嗪类、烃类、含氮杂环类、含氧杂环类),表明冬虫夏草的“腥气”是复合气味。不同产地冬虫夏草中挥发性成分种类无明显差异,提示西藏(那曲),青海(玉树、果洛)和四川(理塘、壤塘、色达)的冬虫夏草中挥发性物质较为一致,即组成“腥气”的化学成分没有质(种类)的差异。但不同产区冬虫夏草中部分挥发性物质的含量存在较大差异,即组成“腥气”的化学成分有量(含量)的差异。筛选出了16个含量差异较大的化学成分,包括丙二醇甲醚乙酸酯,乙酸己酯,丙位辛内酯,2-辛酮,正辛醛,(E)-2-庚烯醛,癸醛,(E)-壬烯醛,(E,E)-2,4-壬二烯醛,异戊酸,正戊酸,正己酸,庚酸,壬酸,正辛醇,2-乙基吡嗪,可作为该药材产地鉴别的标志物进行研究。冬虫夏草正品与伪品之间挥发性成分存在较大的差异,筛查出了34个化学成分,包括乙酸乙酯,苯乙酮,2-乙基己醇,乙酸己酯,2,3-丁二酮,2-辛酮,2-壬酮,2-苄酮,异佛尔酮,甲基壬基甲酮,2-苯基-1-丙烯,4-乙基-2-甲氧基苯酚,芳樟醇,2-异丙基-5-甲基环己醇,3-烯-2-酮,2-茨醇,二甲基二硫,二甲基三硫,正辛醛,苯甲醛,苯乙醛,香草醛,α-蒎烯,β-蒎烯,双戊烯,苯乙烯,4-甲基苯酚,桉叶油醇,乙二醇单丁醚,2-甲基吡嗪,2-甲基萘,1-甲基萘,丙位癸内酯和5-乙基-2-甲基-吡啶,这些化合物可能是该药材真伪鉴别的标志物。结论:建立的冬虫夏草“腥气”辨识方法具有高灵敏度、准确和简便的特点,可为其他中药材的挥发性成分分析提供参考。

[关键词] 中药; 质量评价; 挥发性成分; 顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱法(HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS); 冬虫夏草; 腥气; 标志物

[中图分类号] R22;R931;R28;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0100-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202149

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200824.1334.001.html>

[网络出版日期] 2020-8-24 14:52

Establishment and Application of Identification Method for Fishy Odor of Cordyceps Based on HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS

TAN Peng¹, ZHU Wei², BAO Xiao-ming², GENG Fu-neng³, WEN Yong-sheng^{4*}, ZHANG Ding-kun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137,

[收稿日期] 20200725(005)

[基金项目] 四川省科技厅项目(2018YJ0640);四川省杰出青年科技人才项目(2019JDJQ0007);成都市科技局技术创新研发项目(2018-YFYF-00060-SN);三勒浆药业-成中医产学研联合实验室项目(2019-YF04-00086-JH)

[第一作者] 谭鹏,博士,副研究员,从事中药质量分析新技术的应用研究,E-mail:410578772@qq.com

[通信作者] *张定堃,博士,副教授,从事中药制剂与品质评价新技术研究,E-mail:465790643@qq.com;

*文永盛,主任中药师,从事中药鉴定和中药质量分析研究,E-mail:1245551207@qq.com

- China; 2. Shimadzu Enterprise Management (China) Co. Ltd. , Chengdu 610023, China;
3. Sichuan Key Laboratory for Medicinal American Cockroach,
Sichuan Good Doctor Panxi Pharmaceutical Co. Ltd. , Chengdu 615000, China;
4. Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of TCM, National Medical Products
Administration, Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

[**Abstract**] **Objective:** To establish and apply a new practical analytical method for identifying the fishy odor of Cordyceps based on headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS) technique. **Method:** The InertCap Pure-WAX capillary column (0.25 mm×30 m, 0.25 μ m) was used for chromatographic separation. The injection port temperature was set at 250 $^{\circ}$ C. The injection mode was split injection with a ratio of 5:1. High purity helium was used as the carrier gas and control mode was set to constant pressure. The column flow rate was 1.43 mL·min⁻¹, the linear velocity was 43.3 cm·s⁻¹, and the purge flow rate was 3.0 mL·min⁻¹. The chromatographic column temperature program as follows: maintained the initial temperature at 50 $^{\circ}$ C for 5 min, and increased the temperature at a rate of 10 $^{\circ}$ C·min⁻¹ to 250 $^{\circ}$ C, held for 10 min. The column equilibrium time was 2.0 min. The ion source of mass spectrographic analysis was electron ionization with ion source temperature of 200 $^{\circ}$ C, and the monitoring mode was set to multiple reaction monitoring. **Result:** Seven batches of Cordyceps samples were collected, including 3 batches from Sichuan, 3 batches from Qinghai and 1 batch from Tibet. There were six batches of counterfeits, including 3 batches from Sichuan, 2 batches from Guizhou and 1 batch in Xinjiang. A total of 81 volatile compounds were screened out in Cordyceps, which could be divided into 13 types (esters, ketones, aldehydes and others) according to the compound structure, indicating that the fishy odor of Cordyceps was a complex odor. There was no significant difference in the types of volatile compounds of Cordyceps from different regions, which suggested that these volatile compounds in Cordyceps produced in Tibet (Naqu), Qinghai (Yushu and Guoluo) and Sichuan (Litang, Rangtang and Seda) were relatively consistent. However, the contents of some volatile compounds in Cordyceps produced in different regions were quite different, and 16 volatile compounds with significant difference were screened out, including 1-methoxy-2-propyl acetate, γ -octalactone, hexyl acetate and others, those compounds maybe could be used as the quality markers for identification of regions of Cordyceps. There was a large difference in volatile compounds between Cordyceps and its counterfeits, and 34 volatile compounds were screened out, including ethyl acetate, acetophenone, 2-ethyl-1-hexanol and others, those compounds maybe could be used as the quality markers for authenticity identification of Cordyceps. **Conclusion:** In summary, the established method for identifying the fishy odor of Cordyceps in this paper has the characteristics of high sensitivity, accuracy and simplicity, which can provide reference for the analysis of volatile compounds in other Chinese herbal medicines.

[**Key words**] Chinese medicines; quality evaluation; volatile components; headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS); Cordyceps; fishy odor; markers

特征嗅气是中药材质量评价的重要内容之一,有的中药材因其独特的嗅气而成为其质量优劣的评价指标^[1]。例如,黄芪有豆腥气^[2]、砂仁有浓烈芳香气^[3]、阿魏有特异蒜臭气^[4]、美洲大蠊和地龙有特殊腥臭气^[5-6]等,传统经验一般认为气浓烈者质优;种子类药材如苦杏仁、柏子仁等出现“哈喇气”则提示酸败质劣^[7]。提示嗅气评价是评判中药质量整体

性的一种手段,但目前中药材的嗅气研究进展相对缓慢,主要原因是缺少快速、准确、简便的分析方法。传统的中药材嗅气评价主要依赖鉴别者的经验,主观性强,难以客观量化^[8]。近几年电子鼻技术开始应用于识别中药材的复杂气味,能在一定程度上数字化、客观化表征中药嗅气^[9-12],但电子鼻技术尚不能精准地对中药特征性嗅气的具体组成成分

进行定性、定量分析,不能进一步阐述中药特征性嗅气与质量优劣之间的相关性。

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[13],是我国传统名贵药材。目前评价冬虫夏草的质量优劣与等级主要采用虫体大小、颜色、气味、子座长短等指标。冬虫夏草散发出一种“腥气”,有经验的药材商贩会根据其散发出来的“腥气”浓烈程度评判其质量优劣。但冬虫夏草散发出来的这种“腥气”到底是来自于子座还是虫体,“腥气”中有哪些化学成分,其“腥气”浓烈程度与其质量优劣是否存在关联性等方面尚无相关研究报道。

顶空固相微萃取法(HS-SPME)是一种样品前处理技术^[14],集提取、富集、解吸和进样等步骤于一身,具有操作简便快速、灵敏度高、避免使用有机溶剂等特点。HS-SPME技术适合分析易挥发性和半挥发性物质,能全面快速地获得样品中挥发性物质的组成信息^[15-17]。本研究拟基于顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱法(HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS)建立一种冬虫夏草的“腥气”快速分析方法,辨识其“腥气”的化学组成成分,探讨不同产地之间冬虫夏草的化学成分差异,以期为冬虫夏草的

质量评价提供客观数据支撑。

1 材料

TQ8050型三重四极杆气质联用仪(日本岛津公司,数据分析软件包含Off-flavor-TQ-MS数据库),PAL加热磁力搅拌模块和SPME Arrow型固相微萃取进样器(1.5 mm×20 mm,120 μm,产品序列号ARR15-DVB/C-WR-120/20CT)均购自瑞士思特斯分析仪器有限公司,XPE26型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

苯乙酮,萘,2,6-二氯苯酚和2,4,6-三氯苯甲酸对照品(美国Sigma公司,质量浓度分别为2,5,2,2 mg·L⁻¹,批号分别为48292,40053,40302,47526-U);4-溴氟苯和1,2-二氯苯-d₄的混合对照品溶液、萘-d₁₀对照品溶液(美国Sigma-Aldrich公司,质量浓度均为2 g·L⁻¹,批号分别为47358-U,48417)。

7批冬虫夏草样品采集于四川、青海、西藏等地,1批全虫体样本和1批全子座样本由采集于青海青珍乡的冬虫夏草分离而得,6批冬虫夏草伪品采集于贵州、四川和新疆等地,样品均经成都市食品药品检验研究院文永盛主任中药师鉴定,具体采样信息见表1,典型的冬虫夏草正品和伪品照片见图1。

表1 冬虫夏草样品及其伪品的采集信息

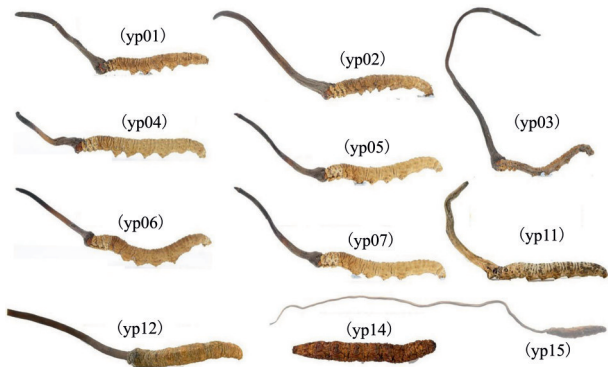
Table 1 Collection information of Cordyceps samples and their counterfeits

编号	采集地	基原鉴定	海拔高度/m	备注
yp01	四川甘孜藏族自治州理塘县	冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i>	4 000	采收期(二期)
yp02	四川甘孜藏族自治州色达县	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	4 400	采收期(二期)
yp03	四川阿坝州壤塘县	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	3 600	采收期(二期)
yp04	西藏那曲	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	5 500	采收期(头期)
yp05	青海玉树藏族自治州	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	4 600	采收期(头期)
yp06	青海果洛州雪山乡	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	5 400	采收期(头期)
yp07	青海果洛州青珍乡	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	4 900	采收期(头期)
yp08	青海果洛州青珍乡	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	4 900	全虫体
yp09	青海果洛州青珍乡	冬虫夏草 <i>C. sinensis</i>	4 900	全子座
yp10	贵州施秉县	亚香棒虫草 <i>C. hawkesii</i>	800	-
yp11	贵州施秉县	亚香棒虫草 <i>C. hawkesii</i>	800	-
yp12	四川省邛崃市	古尼虫草 <i>C. gunnii</i>	600	-
yp13	四川省荷花池市场	冬虫夏草伪品	-	-
yp14	新疆阿尔泰	新疆虫草 <i>Ophiocordyceps gracilis</i>	1 800	-
yp15	四川凉山彝族自治州雷波县	凉山虫草 <i>C. liangshanensis</i>	2 000	-

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以InertCap Pure-WAX毛细管柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm)为色谱柱,进样口温度

250℃,分流比5:1,进样口压力83.5 kPa,载气为高纯氮气,载气控制方式设为恒压力模式,吹扫流量设定3.0 mL·min⁻¹,采用程序升温(初始温度50℃,



图中样品编号同表 1

图 1 冬虫夏草及其伪品的典型样品照片

Fig. 1 Typical sample photographs of Cordyceps and its counterfeits

表 2 153 个化合物(含 3 个内标物)的监测离子对、碰撞电压参数

Table 2 Monitoring ion pairs and collision voltage parameters of 153 compounds (including 3 internal standards)

化合物	名称	CAS 号	定量离子		定性离子 1			定性离子 2		
			<i>m/z</i>	CE/V	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率
1	丙酸	79-09-4	74~56	6	74~46	18	52.34	57~29	9	72.40
2	正戊醛	110-62-3	86~58	3	67~65	9	37.42	71~53	15	4.46
3	3-羟基-2-丁酮	513-86-0	45~43	18	88~45	6	81.53	45~27	18	98.63
4	甲基丙烯酸甲酯	80-62-6	69~41	6	100~69	9	21.06	69~39	21	44.98
5	二甲基二硫	624-92-0	94~79	12	94~61	9	33.58	79~64	15	36.32
6	异丁酸	79-31-2	73~55	12	88~73	6	48.53	73~27	27	29.23
7	乙酸仲丁酯	105-46-4	87~43	3	56~41	9	88.79	56~39	21	29.32
8	正戊醇	71-41-0	70~55	6	55~53	9	4.29	70~53	15	1.71
9	甲苯	108-88-3	91~65	18	91~39	27	52.70	65~39	18	13.47
10	5-己烯-2-酮	109-49-9	98~43	6	83~55	6	80.14	98~83	9	30.65
11	正丁酸	107-92-6	60~42	9	73~55	9	48.32	60~45	15	17.53
12	2-己酮	591-78-6	100~85	3	100~71	6	57.86	85~57	6	50.33
13	4-甲基-3-戊烯-2-酮	141-79-7	98~83	6	83~55	6	97.54	98~55	18	33.35
14	正己醛	66-25-1	56~41	9	82~67	6	25.66	56~39	18	31.46
15	乙酸丁酯	123-86-4	73~43	6	61~43	12	52.86	73~55	6	9.45
16	2-甲基吡嗪	109-08-0	94~67	12	67~40	6	32.62	94~40	18	20.81
17	异戊酸	503-74-2	60~42	12	87~69	9	25.90	60~45	15	17.80
18	2-甲基丁酸乙酯	7452-79-1	102~74	9	115~87	6	16.78	102~56	12	12.55
19	2-甲基丁酸	116-53-0	74~56	9	87~69	9	48.12	87~59	9	32.26
20	乙苯	100-41-4	106~91	12	91~65	18	99.46	106~65	27	17.72
21	丙二醇甲醚乙酸酯	108-65-6	87~43	3	72~57	6	81.33	72~29	18	55.58
22	间二甲苯	108-38-3	106~91	18	91~65	18	94.35	91~39	27	43.48
23	对二甲苯	106-42-3	106~91	15	91~65	18	82.99	91~39	27	44.30
24	正戊酸	109-52-4	60~42	18	73~55	9	59.43	60~45	18	20.70
25	3-庚酮	106-35-4	85~57	6	85~41	12	28.39	114~85	6	13.30
26	2-庚酮	110-43-0	71~43	9	114~85	6	31.99	71~41	18	29.78
27	苯乙烯	100-42-5	104~78	12	78~52	18	29.93	104~52	27	19.76

保持 5 min,以 10 °C · min⁻¹ 升温至 250 °C ,保持 10 min;柱平衡时间 2.0 min)。

2.2 质谱条件 电子轰击离子源(EI),离子化能量 70 eV,离子源温度 200 °C ,质谱传输接口温度 250 °C ,碰撞气为氩气;质谱监测模式为多反应监测(MRM),检测器电压相对于调谐结果+0.3 kV,溶剂延迟时间 1.3 min。各化合物的监测离子(*m/z*)和碰撞电压(CE)参数见表 2。

2.3 HS-SPME 条件 将样品粉碎后过三号筛,准确称取 0.5 g,置于 20 mL 惰性化顶空瓶内,50 °C 平衡 40 min。进样前后,固相萃取头在 270 °C 老化装置中自动老化 3 min,通过聚四氟乙烯隔垫插入顶空

续表2

化合物	名称	CAS号	定量离子		定性离子1			定性离子2		
			<i>m/z</i>	CE/V	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率
28	邻二甲苯	95-47-6	106~91	18	91~65	18	90.17	106~65	27	17.57
29	乙二醇单丁醚	111-76-2	87~57	6	100~72	3	12.88	87~45	9	48.54
30	乙二醇乙醚乙酸酯	111-15-9	72~44	6	88~61	6	16.39	72~42	15	24.97
31	2-乙基吡嗪	13925-00-3	107~79	15	107~52	24	68.15	80~53	9	38.94
32	2,3-二甲基吡嗪	5910-89-4	108~67	12	108~81	6	5.78	108~93	12	2.25
33	二乙基二硫醚	110-81-6	122~94	9	94~66	6	51.83	122~66	18	30.07
34	α -蒎烯	80-56-8	93~77	12	93~51	27	39.91	136~93	12	11.95
35	β -蒎烯	127-91-3	93~91	6	93~77	12	89.00	93~51	24	25.29
36	异己酸	646-07-1	83~55	6	74~56	6	71.21	101~55	12	10.48
37	(<i>E</i>)-2-庚烯醛	18829-55-5	83~55	9	83~53	15	25.06	112~83	6	4.50
38	5-甲基呋喃醛	620-02-0	110~53	27	81~53	6	30.01	110~81	6	29.85
39	苯甲醛	100-52-7	105~77	15	106~77	21	79.95	77~51	15	75.61
40	二甲基三硫	3658-80-8	126~79	15	126~61	9	35.37	79~64	15	28.12
41	正己酸	142-62-1	73~55	9	87~45	9	14.53	73~27	18	32.11
42	苯酚	108-95-2	94~66	9	66~40	12	43.83	94~40	24	41.35
43	2-苯基-1-丙烯	98-83-9	103~77	12	118~91	18	45.69	103~51	27	39.89
44	2-辛酮	111-13-7	128~85	6	128~57	18	45.15	128~72	3	37.81
45	2-氯苯酚	95-57-8	128~64	18	128~92	9	26.18	100~65	9	17.59
46	2-丙基吡啶	622-39-9	93~66	12	106~78	18	72.31	93~78	18	47.55
47	正辛醛	124-13-0	84~55	12	100~82	3	29.73	84~69	6	59.11
48	乙酸己酯	142-92-7	69~41	9	84~55	12	60.99	84~69	3	47.74
49	(<i>E,E</i>)-2,4-庚二烯醛	4313-03-5	110~81	6	81~53	12	98.88	81~27	18	43.91
50	对二氯苯	106-46-7	146~111	18	146~75	27	59.06	111~75	18	54.96
51	5-乙基-2-甲基-吡啶	104-90-5	106~77	15	121~106	12	92.04	106~79	9	59.51
52	2-乙基己醇	104-76-7	83~55	9	98~56	6	17.52	83~41	18	23.05
53	双戊烯	138-86-3	136~93	15	107~91	12	104.64	107~65	24	43.46
54	桉叶油醇	470-82-6	139~43	18	154~139	3	31.03	154~125	6	35.70
55	苯甲醇	100-51-6	108~79	18	79~51	24	65.73	108~77	27	60.11
56	苯乙醛	122-78-1	91~65	18	120~91	18	56.44	91~39	27	46.00
57	2-羟基苯甲醛	90-02-8	122~65	24	122~93	18	69.18	104~76	12	38.22
58	邻甲酚	95-48-7	108~77	27	108~79	18	98.90	90~63	27	22.46
59	苯乙酮	98-86-2	105~77	15	120~105	6	66.09	105~51	24	33.29
60	正辛醇	111-87-5	69~41	9	84~55	9	51.26	84~69	6	36.88
61	2-溴苯酚	95-56-7	172~65	18	174~65	18	96.63	172~93	9	33.12
62	5-壬酮	502-56-7	85~57	6	142~100	6	7.69	85~41	12	26.32
63	庚酸	111-14-8	87~59	9	101~55	12	31.55	87~45	12	77.56
64	4-甲基苯酚	106-44-5	107~77	18	77~51	18	35.41	107~51	27	33.40
65	间甲酚	108-39-4	108~77	27	108~79	18	103.90	108~90	15	49.05
66	2-氯-6-甲基苯酚	87-64-9	107~77	18	142~107	15	62.93	107~79	9	42.30
67	苻硫醇	100-53-8	124~91	6	91~65	12	85.47	91~39	27	48.66
68	邻甲氧基苯酚	90-05-1	124~109	12	109~81	12	137.16	124~81	24	61.86
69	3-乙基-4-甲基吡啶	529-21-5	106~77	15	121~106	12	87.08	106~79	9	81.13

续表2

化合物	名称	CAS号	定量离子		定性离子1			定性离子2		
			<i>m/z</i>	CE/V	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率
70	2-异丙基-3-甲氧基吡嗪	25773-40-4	152~137	9	137~109	9	74.24	152~124	6	42.88
71	2-壬酮	821-55-6	71~43	9	142~99	6	23.82	71~41	12	44.62
72	山梨酸乙酯	2396-84-1	95~67	9	140~97	12	26.80	95~65	12	45.91
73	芳樟醇	78-70-6	93~77	15	121~93	9	15.23	93~51	27	36.53
74	2-壬醇	628-99-9	69~41	9	98~56	9	20.47	69~39	24	29.77
75	苯乙醇	60-12-8	91~65	15	122~92	6	71.67	91~63	24	33.65
76	均四甲苯	95-93-2	119~91	15	134~119	27	32.92	119~77	24	57.65
77	异佛尔酮	78-59-1	82~54	9	138~82	9	46.60	82~39	18	82.11
78	马鞭烯醇	473-67-6	119~91	12	119~117	9	65.43	119~77	21	39.05
79	2-茨酮	76-22-2	95~55	18	152~108	6	70.80	95~67	12	93.95
80	(<i>E</i>)-壬烯醛	18829-56-6	83~55	6	96~81	6	44.56	83~29	15	32.85
81	对乙基苯酚	123-07-9	107~77	15	122~107	12	78.92	107~51	27	29.70
82	正辛酸	124-07-2	101~55	12	115~45	12	33.33	101~45	12	70.41
83	2,4-二氯苯酚	120-83-2	162~98	15	162~126	9	29.81	126~98	6	37.71
84	2,3-二甲基苯酚	526-75-0	122~107	15	107~77	18	102.26	107~79	9	34.45
85	2-甲氧基-3-异丁基吡嗪	24683-00-9	124~94	12	124~81	9	41.34	124~79	21	22.11
86	2-茨醇	507-70-0	95~67	12	139~95	6	20.12	95~55	15	95.08
87	2-异丙基-5-甲基环己醇	89-78-1	95~67	12	138~95	9	46.43	95~55	18	80.82
88	2-溴-4-甲基苯酚	6627-55-0	186~107	18	188~107	18	100.10	186~77	30	31.33
89	萘	91-20-3	128~102	21	128~78	21	79.46	102~76	15	13.64
90	2-甲基异冰片	2371-42-8	95~55	21	95~67	15	101.22	95~41	21	31.52
91	水杨酸甲酯	119-36-8	120~92	12	152~120	9	57.03	120~64	21	50.07
92	α -松油醇	98-55-5	136~121	9	121~93	6	58.91	136~93	12	76.70
93	对二溴苯	106-37-6	236~155	21	236~157	21	67.47	155~76	18	73.20
94	癸醛	112-31-2	112~70	6	112~55	15	96.49	112~83	6	87.59
95	2,6-二氯苯酚	87-65-0	162~63	21	162~98	15	72.12	164~63	21	63.33
96	3-烯-2-酮	1196-01-6	107~91	12	150~107	12	28.04	107~65	21	38.06
97	(<i>E,E</i>)-2,4-壬二烯醛	5910-87-2	81~53	18	138~81	6	42.24	81~27	24	69.88
98	乙二醇苯醚	122-99-6	94~66	12	138~94	9	72.90	94~55	18	15.70
99	苯并噻唑	95-16-9	135~108	18	108~69	21	34.35	135~91	18	32.62
100	苯乙酸	103-82-2	136~91	12	91~65	18	107.71	91~63	27	22.87
101	4-苯基-2-丁酮	2550-26-7	148~105	12	148~133	9	58.88	105~77	18	111.62
102	香叶醇	106-24-1	69~41	9	69~39	21	24.27	123~81	9	4.98
103	丙位辛内酯	104-50-7	85~57	6	100~72	6	4.81	100~58	9	3.64
104	4-丙基苯酚	645-56-7	107~77	18	136~107	9	56.60	107~51	30	24.56
105	1,6-己内酰胺	105-60-2	113~85	6	85~67	6	19.41	113~56	9	46.69
106	壬酸	112-05-0	129~87	9	115~69	9	47.87	115~45	12	54.11
107	反式-2-癸烯醛	3913-81-3	107~79	9	107~91	12	49.91	121~93	9	42.84
108	4,6-二氯甲酚	1570-65-6	141~77	15	176~141	15	62.69	176~77	30	28.26
109	4-乙基-2-甲氧基苯酚	2785-89-9	152~137	15	137~122	12	91.82	137~94	21	91.30
110	2,4-二氯苯甲醚	553-82-2	161~133	12	176~161	12	69.96	176~133	27	57.46
111	甲基壬基甲酮	112-12-9	71~43	9	170~85	15	11.61	71~41	18	39.02

续表 2

化合物	名称	CAS 号	定量离子		定性离子 1			定性离子 2		
			<i>m/z</i>	CE/V	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率	<i>m/z</i>	CE/V	参考比率
112	吡啶	120-72-9	117~90	18	90~63	24	23.83	117~64	27	11.13
113	2-甲基萘	91-57-6	142~115	30	115~89	18	28.36	115~63	27	22.83
114	(<i>E,E</i>)-2,4-癸二烯醛	25152-84-5	81~53	15	152~81	6	21.59	81~79	6	118.42
115	1-甲基萘	90-12-0	142~115	30	115~89	18	28.12	115~65	21	19.05
116	2,4,6-三氯苯甲醚	87-40-1	195~167	15	210~195	15	65.39	210~167	21	39.81
117	丁香酚	97-53-0	164~149	12	164~131	15	53.48	149~121	9	38.91
118	正癸酸	334-48-5	129~87	6	143~87	6	19.87	129~59	18	25.79
119	2,4-二溴苯酚	615-58-7	252~63	27	250~63	27	52.46	250~143	21	58.00
120	2,4,6-三氯苯酚	88-06-2	132~97	12	196~97	27	74.80	196~132	18	57.83
121	1-十一醇	112-42-5	83~55	9	111~69	6	22.40	83~41	18	24.97
122	4,5-环氧-(<i>E</i>)-2-癸烯醛	134454-31-2	81~53	18	152~81	6	18.28	81~79	6	157.23
123	2,6-二溴苯酚	608-33-3	252~63	27	250~143	21	89.00	252~143	21	127.53
124	3-甲基吡啶	83-34-1	130~77	27	130~103	18	46.95	103~77	9	18.24
125	甲基丁香酚	93-15-2	178~107	18	178~163	9	90.14	147~91	15	44.67
126	香草醛	121-33-5	152~123	18	123~108	9	23.59	152~109	15	39.63
127	十二醛	112-54-9	110~67	9	140~70	9	34.81	110~81	9	79.70
128	2,4,6-三氯苯胺	634-93-5	195~124	21	195~159	12	74.86	159~124	9	31.60
129	4-溴-2,6-二甲苯酚	2374-05-2	200~121	15	202~121	12	85.66	202~77	30	44.08
130	α -紫罗兰酮	127-41-3	121~77	18	192~177	6	18.45	121~91	12	55.75
131	二甲萘烷醇	19700-21-1	112~97	12	112~83	12	46.53	112~69	21	24.35
132	3-苯基丙烯酸	621-82-9	147~91	21	103~77	15	79.53	147~103	15	77.03
133	邻氧萘酮	91-64-5	146~118	12	118~90	12	80.75	146~90	24	46.03
134	异丁香酚	97-54-1	164~149	12	164~131	15	54.96	149~121	9	43.04
135	丙位癸内酯	706-14-9	85~57	9	128~95	6	17.87	128~71	9	12.38
136	十二醇	112-53-8	111~69	6	111~55	12	25.52	125~69	9	22.46
137	β -紫罗兰酮	79-77-6	177~162	15	177~147	24	102.77	192~177	9	20.93
138	2,6-二溴-4-甲基苯酚	2432-14-6	266~185	18	264~185	21	67.44	266~187	18	65.12
139	2,6-二叔丁基对甲酚	128-37-0	220~205	12	205~177	9	72.80	205~145	15	59.30
140	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	28588-75-2	226~113	12	113~85	6	42.16	113~45	18	53.35
141	正十二酸	143-07-7	157~87	9	200~87	9	13.29	157~59	21	23.00
142	2,4,6-三溴苯甲醚	607-99-8	344~329	12	344~301	24	43.60	301~141	30	14.10
143	二苯甲酮	119-61-9	105~77	12	182~105	15	29.68	105~51	27	35.26
144	2,4,6-三溴苯酚	118-79-6	332~143	30	330~141	27	114.23	332~222	27	130.63
145	1-十四醇	112-72-1	111~69	9	111~41	24	38.01	168~55	24	5.02
146	丙位十二内酯	2305-05-7	85~57	6	128~95	6	16.77	85~29	12	136.22
147	二苯基二硫醚	150-60-7	91~65	18	246~91	12	23.99	181~166	18	14.89
148	乙酸乙酯	141-78-6	70~55	6	88~61	6	14.32	70~43	18	14.77
149	2,3-丁二酮	431-03-8	86~43	3	43~15	15	47.92	43~14	30	29.29
150	乙酸	64-19-7	60~43	6	60~42	6	63.66	60~45	6	61.60
151	4-溴氟苯	460-00-4	174~95	15	95~75	15	137.81	174~75	27	39.43
152	1,2-二氯苯-d4	2199-69-1	150~115	15	150~78	27	56.89	115~78	12	49.62
153	苊-d10	15067-26-2	164~162	15	162~160	21	86.30	162~134	27	8.47

瓶内,不接触样品,在50℃恒温下萃取吸附10 min,抽出萃取头,迅速插入预运行状态下的GC-MS/MS进样口,于250℃解吸2 min后GC-MS/MS分析。

2.4 供试品定性、定量分析 精密吸取苯乙酮,萘,2,6-二氯苯酚和2,4,6-三氯苯甲醚对照品的混合溶液(在10 mL量瓶中加入甲醇5 mL,用移液器精密吸取4种化合物的对照品溶液各10 μL加入量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得)1 μL进样分析,以评估仪器系统的适用性。分别精密吸取内标物4-溴氟苯,1,2-二氯苯-d4和萘-d10的对照品溶液(在10 mL量瓶中加入甲醇5 mL,用移液器精密吸取4-溴氟苯和1,2-二氯苯-d4的混合对照品溶液、萘-d10对照品溶液各10 μL加入量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,用移液器精密吸取此混合溶液50 μL加入1 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,即得)1 μL进样分析,获得内标物的峰面积。按2.3项下条件测定各样品。目标化合物的定性是根据定性定量离子对确认,目标化合物的定量由岛津TQ8050再解析软件内置150种化合物的标准曲线结合内标物的实测峰面积计算。

2.5 系统适应性评价 系统适应性评价结果显示,苯乙酮,萘,2,6-二氯苯酚和2,4,6-三氯苯甲醚4个化合物的信噪比(S/N)实测值均>100,表明仪器有较高的灵敏度。这4个化合物的拖尾因子实测值均处于0.95~1.05,表明仪器状态较好。

2.6 冬虫夏草“腥气”组成成分分析 从冬虫夏草中共筛查出81种挥发性成分,按化学结构可分为13类,包括酯类、酮类、醛类、烯类、酚类、酸类、醇类、苯类、醚类、吡嗪类、烃类、含氮杂环类、含氧杂环类,表明冬虫夏草的“腥气”至少是由81种挥发性成分组成,其表现出来的不是单一气味,而是复合气味。典型冬虫夏草样品yp04的MRM总离子流图(TIC)见图2,挥发性成分的检测结果见表3。

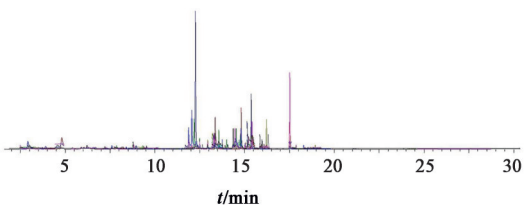


图2 冬虫夏草样品yp04的总离子流
Fig. 2 Total ion chromatogram of sample yp04 of Cordyceps

表3 冬虫夏草及其伪品的挥发性成分筛查与定量分析

Table 3 Screening and quantitative analysis of volatile components in Cordyceps and its counterfeits		ng·g ⁻¹														
类型	化合物	yp01	yp02	yp03	yp04	yp5	yp06	yp07	yp08	yp09	yp10	yp11	yp12	yp13	yp14	yp15
酯类	乙酸乙酯	-	0.120	0.150	0.237	-	0.220	-	-	-	0.960	1.154	1.194	1.107	1.349	0.873
	甲基丙烯酸甲酯	0.071	-	-	0.072	0.037	-	-	-	-	0.082	-	-	0.037	-	-
	丙二醇甲醚乙酸酯	0.073	0.019	0.023	0.097	0.039	0.361	0.120	0.392	0.102	0.069	0.133	0.090	0.079	0.093	0.155
	乙酸己酯	0.010	0.019	0.021	0.001	0.015	0.137	0.057	0.002	0.070	-	-	-	-	-	-
	水杨酸甲酯	0.032	0.031	0.030	0.027	0.030	0.031	0.030	0.016	0.046	0.007	0.015	0.011	0.011	0.013	0.019
	丙位辛内酯	0.644	0.079	0.080	0.473	1.128	6.083	2.526	0.416	1.094	0.127	0.207	0.178	0.271	0.167	0.712
酮类	2,3-丁二酮	1.456	1.566	1.579	1.474	1.196	0.823	1.177	2.441	1.247	-	0.969	-	-	-	-
	4-甲基-3-戊烯-2-酮	0.016	0.014	0.017	0.016	0.015	0.018	0.020	0.072	0.024	-	0.015	-	-	-	0.057
	2-庚酮	0.220	0.129	0.155	0.202	-	-	-	0.309	0.011	0.043	0.068	0.075	-	0.095	-
	2-辛酮	0.425	0.304	0.354	0.453	0.573	1.152	0.627	0.538	0.515	-	0.082	0.077	0.100	0.082	0.373
	2-壬酮	1.147	0.345	0.361	0.469	-	-	1.599	0.365	0.820	0.069	-	-	0.147	0.095	0.387
	2-癸酮	0.615	0.272	0.409	0.377	0.414	-	0.319	0.110	0.684	0.014	0.038	0.030	0.031	0.023	0.043
	异佛尔酮	0.136	0.120	0.127	0.151	0.127	0.161	0.201	0.272	0.225	0.005	-	0.007	0.008	0.007	-
	甲基壬基甲酮	4.750	-	-	1.198	-	1.968	0.943	-	-	-	-	-	-	-	-
	苯乙酮	0.489	0.554	0.558	0.518	0.436	0.451	0.433	0.270	0.722	0.762	1.412	1.100	1.436	1.356	2.476
	二苯甲酮	0.001	0.019	0.006	0.012	0.001	0.006	0.004	0.007	0.014	0.007	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002
醛类	正辛醛	16.415	15.112	15.976	15.626	33.616	150.94	43.006	12.207	29.379	4.867	9.888	9.727	15.293	8.290	37.595
	(E)-2-庚烯醛	2.339	-	2.561	1.843	3.279	4.792	2.820	-	14.528	-	1.207	0.950	1.482	0.962	4.968
	癸醛	0.895	1.244	-	0.490	0.783	3.747	1.334	0.630	2.270	0.251	0.427	0.412	0.530	0.332	1.018

续表 3

类型	化合物	yp01	yp02	yp03	yp04	yp5	yp06	yp07	yp08	yp09	yp10	yp11	yp12	yp13	yp14	yp15
烯类	苯甲醛	4.398	2.750	3.377	4.278	3.296	3.127	3.135	2.183	4.676	0.444	0.874	0.638	0.755	0.659	2.823
	(<i>E</i>)-壬烯醛	0.269	—	—	0.151	0.220	0.317	—	—	0.697	0.132	0.169	0.155	0.170	0.165	0.843
	苯乙醛	2.715	0.811	2.066	3.116	2.328	2.958	3.147	2.879	2.900	0.354	0.560	0.261	0.227	0.245	0.260
	反式-2-癸烯醛	1.359	—	1.347	0.834	0.961	—	0.849	—	1.365	—	—	0.269	0.286	0.355	0.369
	2-羟基苯甲醛	0.064	0.079	—	—	0.047	—	0.057	—	0.132	—	—	—	—	—	0.047
	(<i>E,E</i>)-2,4-壬二烯醛	—	—	0.083	0.046	0.075	0.097	0.061	0.033	0.192	0.025	0.032	0.031	0.030	0.034	0.102
	香草醛	0.027	0.038	0.024	0.018	0.020	0.019	0.019	0.017	0.023	—	—	—	—	—	—
	α -蒎烯	0.410	0.285	0.466	0.365	0.453	0.401	0.389	0.464	0.136	—	0.069	0.063	0.064	—	0.069
	β -蒎烯	0.724	0.585	0.855	0.646	0.805	0.645	0.552	0.004	0.249	—	0.043	—	0.042	0.031	0.046
	双戊烯	3.739	3.981	4.889	4.395	4.569	4.439	4.454	2.270	4.370	0.127	0.228	0.174	0.236	0.186	0.337
酚类	苯乙烯	1.317	0.850	2.453	0.928	1.037	0.986	0.878	0.550	0.448	0.078	0.144	0.089	0.131	0.125	0.173
	2-苯基-1-丙烯	0.014	—	0.017	0.023	—	0.007	0.011	—	0.013	—	—	—	—	—	—
	邻甲氧基苯酚	0.057	0.051	0.022	0.051	0.056	0.062	0.063	0.029	0.128	0.002	0.013	0.011	0.008	0.013	0.038
	邻甲酚	0.215	0.107	0.129	0.273	0.220	0.388	0.342	0.140	0.642	0.103	0.202	0.162	0.235	0.151	0.350
	苯酚	0.307	0.313	0.439	0.231	0.308	0.327	0.280	0.175	0.349	0.313	0.567	0.271	0.354	0.356	0.496
	4-乙基-2-甲氧基苯酚	0.015	0.007	0.005	0.008	0.012	0.011	0.018	0.006	0.031	—	—	—	—	—	—
	4-甲基苯酚	0.046	0.028	0.044	0.007	0.040	0.065	0.061	0.028	0.061	—	—	—	0.007	—	—
	间甲酚	0.051	0.033	0.060	0.032	0.052	0.106	0.072	0.032	0.042	0.016	0.029	0.026	0.029	—	0.069
	对乙基苯酚	0.013	0.005	—	0.008	0.009	0.008	0.015	0.008	0.030	—	0.004	0.004	0.002	0.003	0.003
	乙酸	58.041	37.410	42.233	63.193	35.517	74.839	66.346	91.689	52.002	52.722	64.291	60.346	62.149	62.423	73.839
酸类	丙酸	20.694	12.197	18.609	25.363	17.911	29.424	25.202	23.680	20.670	18.037	22.639	22.010	22.630	21.430	26.961
	异丁酸	7.823	2.457	5.060	8.239	4.554	8.989	7.567	11.012	9.286	3.765	6.579	5.019	5.861	5.757	8.089
	正丁酸	16.632	4.673	11.546	16.166	10.586	13.686	15.081	15.228	18.788	7.865	13.245	10.801	12.062	12.178	19.214
	异戊酸	12.670	2.364	5.969	21.037	12.162	18.920	17.471	15.948	15.866	7.433	15.230	13.016	14.628	13.273	16.031
	正戊酸	13.899	2.850	6.500	16.293	19.886	34.787	25.423	10.407	20.532	18.332	28.217	28.086	33.562	25.386	45.958
	正己酸	25.600	2.831	5.684	29.571	45.003	96.214	62.898	26.886	45.767	43.561	36.705	47.668	59.997	31.866	72.064
	庚酸	2.116	0.796	1.289	1.497	2.103	18.480	6.682	2.708	3.770	2.654	1.856	2.255	2.836	1.548	3.555
	壬酸	0.862	0.414	0.448	0.459	0.739	4.249	1.742	1.253	1.883	0.904	0.593	0.663	0.789	0.459	1.776
	正癸酸	0.506	0.486	0.472	0.438	0.513	0.641	0.442	0.352	0.612	0.364	0.469	0.417	0.409	0.374	0.411
	桉叶油醇	2.261	1.056	2.339	0.886	1.397	0.889	0.984	1.318	0.504	—	—	—	—	—	—
醇类	2-乙基己醇	0.020	—	0.067	0.064	0.094	—	0.172	0.093	4.329	4.505	8.067	9.044	8.916	8.888	50.577
	2-壬醇	0.127	—	—	0.122	0.113	—	0.147	—	0.187	0.025	0.064	—	—	—	—
	芳樟醇	1.792	2.495	2.920	1.137	1.150	1.392	1.337	0.763	2.258	0.136	0.393	0.254	0.195	0.304	0.785
	正辛醇	0.679	0.761	0.434	0.379	1.452	7.043	2.138	0.921	3.068	0.217	0.505	0.578	0.800	0.448	2.234
	2-异丙基-5-甲基环己醇	9.302	11.273	10.409	5.045	8.286	3.960	1.784	1.090	6.910	0.173	0.170	—	0.130	0.138	0.216
	3-烯-2-酮	0.078	2.788	0.779	0.105	0.075	0.294	0.095	—	0.138	—	—	—	—	—	—
	α -松油醇	0.173	0.191	0.142	0.107	0.144	0.105	0.122	0.506	0.319	0.011	0.018	0.127	0.125	0.015	0.056
	2-茨醇	1.414	2.058	0.016	0.628	1.015	0.546	1.005	0.039	0.046	0.040	0.070	0.050	0.053	0.058	0.089
	香叶醇	0.094	0.103	0.091	0.069	0.066	0.036	—	0.037	0.220	—	0.045	0.038	0.059	0.040	—
	苯甲醇	0.387	0.698	0.549	0.771	0.671	1.009	0.879	0.403	1.882	0.108	0.200	0.139	0.136	0.145	0.303
苯类	苯乙醇	0.383	0.268	0.222	0.427	0.466	0.353	0.468	0.178	1.981	0.084	0.124	0.089	0.066	0.096	0.154
	甲苯	1.033	0.731	1.182	1.111	0.987	0.897	0.974	1.088	0.496	—	0.004	1.194	0.005	—	0.005

续表 3

类型	化合物	yp01	yp02	yp03	yp04	yp5	yp06	yp07	yp08	yp09	yp10	yp11	yp12	yp13	yp14	yp15
醚类	乙苯	0.241	0.167	0.338	0.232	0.205	0.193	0.196	0.152	0.098	0.109	0.169	0.115	0.136	0.136	0.160
	对二甲苯	0.302	0.214	0.419	0.299	0.266	0.252	0.251	0.191	0.128	0.137	0.216	0.152	0.178	0.176	0.210
	间二甲苯	0.350	0.262	0.411	0.343	0.319	0.318	0.318	0.243	0.174	0.148	0.261	0.176	0.210	0.220	0.290
	邻二甲苯	0.632	0.504	0.691	0.615	0.552	0.570	0.543	0.443	0.339	0.257	0.461	0.306	0.380	0.357	0.510
	均四甲苯	0.034	0.070	0.041	0.032	0.026	0.025	0.054	0.015	0.032	0.012	-	0.015	0.031	0.031	0.024
	对二氯苯	0.034	0.034	0.045	0.031	0.030	0.034	-	0.014	0.033	0.011	0.027	0.019	0.019	0.023	0.037
	二甲基二硫	0.023	0.009	0.077	0.025	0.009	0.009	0.017	0.036	0.009	-	-	-	-	-	0.013
	二甲基三硫	0.019	0.015	0.058	0.021	0.017	0.016	0.018	0.080	0.013	-	-	-	-	-	-
	乙二醇单丁醚	0.434	0.635	0.570	-	0.386	0.359	0.403	0.205	0.878	0.035	-	0.068	0.064	0.061	-
	乙二醇苯醚	0.037	0.019	0.026	0.027	0.024	0.026	0.026	0.026	0.101	0.024	0.033	0.027	0.029	0.027	0.037
吡嗪类	2-甲基吡嗪	1.116	1.023	1.135	1.094	0.929	0.865	1.029	0.888	3.025	0.226	0.520	0.308	0.581	0.382	2.264
	2-乙基吡嗪	0.020	0.016	0.014	0.028	0.016	0.067	0.020	0.019	0.044	0.007	0.019	0.015	0.030	0.015	0.039
	2-甲氧基-3-异丁基吡嗪	-	-	-	0.027	0.046	-	0.031	0.009	0.012	0.009	-	0.021	-	-	0.039
烃类	萘	0.294	0.288	0.329	0.227	0.229	0.225	0.243	0.153	0.341	0.027	0.054	0.039	0.046	0.044	0.076
	2-甲基萘	0.234	0.355	0.193	0.113	0.176	0.116	0.147	0.078	0.275	-	0.014	0.007	-	0.010	0.018
	1-甲基萘	0.081	0.133	0.079	0.052	0.060	0.050	0.060	0.045	0.112	-	-	-	-	-	0.015
含氮杂环类	5-乙基-2-甲基-吡啶	0.001	0.007	0.004	-	0.001	0.007	0.001	0.007	0.002	-	-	-	-	-	-
	苯并噻唑	0.049	0.044	0.049	0.046	0.036	0.037	0.038	0.026	0.066	0.018	0.027	0.021	0.021	0.020	0.027
	1,6-己内酰胺	0.697	0.456	0.724	0.552	0.484	0.569	0.556	0.856	1.628	0.459	0.527	0.517	0.547	0.509	0.556
含氧杂环类	丙位癸内酯	0.011	0.006	0.001	0.006	0.004	0.015	0.018	-	0.036	-	-	-	-	-	-

2.7 冬虫夏草质量优劣与“腥气”组成成分的关联分析 与产自四川的冬虫夏草虫的外观性状相比, 产自西藏(那曲)和青海(玉树、果洛)的冬虫夏草的虫体更大更饱满,颜色金黄,子座较短;而产自四川的冬虫夏草的虫体偏小偏瘪,颜色偏黑,子座较长,因此传统经验认为西藏(那曲)和青海(玉树、果洛)所产的冬虫夏草的质量要优于四川产冬虫夏草的。由表 3 初步可知,不同产地冬虫夏草中挥发性成分的种类无明显差异,提示西藏(那曲),青海(玉树、果洛)和四川(理塘、壤塘、色达)的冬虫夏草中挥发性成分一致性,即组成“腥气”的化学成分没有质(种类)的差异,但不同产区冬虫夏草中部分挥发性成分的含量存在较大差异,即组成“腥气”的化学成分有量(含量)的差异。为了更直观地比较各成分的含量差异,将 yp04(西藏那曲),yp05(青海玉树藏族自治州)和 yp06(青海果洛州雪山乡)3 种样品归为一类,计算每个化学成分的含量总和;将 yp01(四川甘孜藏族自治州理塘县),yp02(四川甘孜藏族自治州色达县)和 yp03(四川阿坝州壤塘县)归为一类,计算每个化学成分的含量总和,前者除以后者得到含量倍数差异,发现产自西藏和青海地区的冬

虫夏草中 81 种挥发性成分的含量普遍高于产自四川地区的冬虫夏草,但大多数化学成分的含量倍数差异在 0~2 倍,表明这种含量优势并不明显。以含量倍数差异>2 倍计,筛选出含量差异较大的成分有 16 个[包括丙位辛内酯,庚酸,正己酸,正辛醇,丙二醇甲醚乙酸酯,正辛醛,壬酸,乙酸己酯,正戊酸,(E,E)-2,4-壬二烯醛,(E)-壬烯醛,异戊酸,癸醛,2-乙基吡嗪,(E)-2-庚烯醛,2-辛酮;差异倍数依次为 9.57, 5.26, 5.01, 4.74, 4.32, 4.21, 3.16, 3.06, 3.05, 2.63, 2.56, 2.48, 2.35, 2.22, 2.02, 2.01],这些化合物可能可以作为区分西藏、青海与四川产冬虫夏草的产地特征成分。

2.8 冬虫夏草中挥发性成分的气味强度分析 嗅觉阈值是指引起人嗅觉最小刺激的物质质量浓度。阈值越小的物质气味越强,反之,阈值越大的物质气味越弱。冬虫夏草中气味成分的表现不完全受含量高低所支配,是由其含量和嗅觉阈值两方面决定的。若含量虽多但阈值高则其气味成分并不一定处于支配地位;而含量虽微但阈值很低时,反而会呈现强烈的气味。气味成分的气味强弱程度称为气味强度,其与含量、嗅觉阈值的关系为 $U=F/T$,

式中 U, F, T 分别表示成分的气味强度、质量浓度和嗅觉阈值。根据上述分析结果,以样品 yp04 为例,采用 2.7 项下筛选出的 16 个挥发性成分进行气味强

度折算,见表 4。结果发现气味强度相对较高的有丙位辛内酯、癸醛、正己酸等成分,提示这些成分可能是冬虫夏草散发“腥气”气味的化学物质基础。

表 4 冬虫夏草样品 yp04 中 16 种挥发性成分的气味强度
Table 4 Odor intensities of 16 volatile components in sample yp04 of Cordyceps

化合物	气味描述	嗅觉阈值/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	质量浓度/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	气味强度
丙二醇甲醚乙酸酯	甜味,酯类味	100	0.097	0.000 97
乙酸己酯	水果味,草药味	100	0.001	0.000 01
丙位辛内酯	椰子味	1	0.473	0.473 00
2-辛酮	肥皂味,汽油味	10	0.453	0.045 30
正辛醛	脂肪味,肥皂味	100	15.626	0.156 26
(<i>E</i>)-2-庚烯醛	脂肪味,肥皂味	10	1.843	0.184 30
癸醛	肥皂味,橙皮味	1	0.490	0.490 00
(<i>E</i>)-壬烯醛	纸味	1	0.151	0.151 00
(<i>E,E</i>)-2,4-壬二烯醛	脂肪味,蜡味	10	0.046	0.004 60
异戊酸	酸味	100	21.037	0.210 37
正戊酸	酸味,汗味	1 000	16.293	0.016 29
正己酸	酸味,汗味	100	29.571	0.295 71
庚酸	橙皮味,酸味	10	1.497	0.149 70
壬酸	脂肪味	100	0.459	0.004 59
正辛醇	金属味	100	0.379	0.003 79
2-乙基吡嗪	花生酱味	100	0.028	0.000 28

2.9 冬虫夏草虫体与子座“腥气”化学成分差异对比 比较冬虫夏草的全虫体(样品 yp08)和全子座(样品 yp09),结果发现在虫体中检测到的挥发性成分均能够在子座里面检测到,但存在含量高低差异。相反,在子座中能被检测到而在虫体中没有被检测到的挥发性成分有(*E*)-2-庚烯醛,(*E*)-壬烯醛,反式-2-癸烯醛,2-羟基苯甲醛,2-苯基-1-丙烯,2-壬醇,3-烯-2-酮以及丙位癸内酯,提示这些化合物可能由子座产生。由于实验样本数量有限,该结论还需进一步积累样品数据验证。

2.10 冬虫夏草正品与伪品“腥气”组成差异的对比分析 比较冬虫夏草的正品 7 批(yp01~yp07)和伪品 6 批(yp10~yp15),结果发现在正品中含量明显低于伪品的挥发性成分有 3 个(2-乙基己醇、乙酸乙酯和苯乙酮)。而在正品中含量明显高于伪品的挥发性成分有 31 个,包括乙酸己酯,2,3-丁二酮,2-辛酮,2-壬酮,2-苾酮,异佛尔酮,甲基壬基甲酮,2-苯基-1-丙烯,4-乙基-2-甲氧基苯酚,芳樟醇,2-异丙基-5-甲基环己醇,3-烯-2-酮,2-茨醇,二甲基二硫,二甲基三硫,正辛醛,苯甲醛,苯乙醛,香草醛, α -蒎烯, β -蒎烯,双戊烯,苯乙烯,4-甲基苯酚,桉叶油醇,乙二醇

单丁醚,2-甲基吡嗪,2-甲基萘,1-甲基萘,丙位癸内酯和 5-乙基-2-甲基-吡啶。初步表明冬虫夏草正品和伪品之间的挥发性成分存在一定差异。

3 讨论

现有文献报道显示,冬虫夏草的挥发性成分中含有醛类^[18]、醇类^[19]、酯类^[20]等化合物,但只能够定性、定量测定少数几个化合物,不能深层次揭示冬虫夏草中“腥气”(挥发性物质)的构成。本文研究结果显示,在冬虫夏草中筛查出了 81 种挥发性成分,并对筛查出来的挥发性成分进行了定量分析。需要指出的是,由于缺少对照品,本实验采用的是数据库中的标准曲线,对上述 81 种成分的定量只是半定量。传统经验认为,产自西藏和青海地区的冬虫夏草的质量要优于四川地区的冬虫夏草的质量,本文研究结果初步表明,不同产地冬虫夏草中挥发性成分的种类较为一致,仅在含量上存在一定差异。本实验筛选出 16 个含量差异比较明显的化学成分,可作为冬虫夏草产地鉴别的标志物进行研究。本文分析结果初步表明,冬虫夏草正品与伪品的挥发性成分存在较大差异,并筛查出了 34 个含量差异性成分,特别是仅在冬虫夏草正品中能检测到

而在伪品中未检测到的挥发性成分有10个(乙酸己酯,甲基壬基甲酮,2-苯基-1-丙烯,4-乙基-2-甲氧基苯酚,3-烯-2-酮,香草醛,二甲基三硫,桉叶油醇,5-乙基-2-甲基-吡啶,丙位癸内酯),这些成分可考虑作为真伪鉴别的标志性成分。本文的不足之处在于实地采集的样品数量有限,研究结果尚需进一步积累数据进行验证。

客观量化评价中药材的特征嗅气是一个研究难点,主要在于缺少一些实用的分析方法。本文基于HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS建立了一种对中药材中150种挥发性化合物的快速筛查与定量方法,兼顾准确定性和半定量,具有高灵敏度、准确和简便的特点,并选择冬虫夏草“腥气”快速辨识进行了示范应用研究,完善了冬虫夏草的化学成分体系,且建立的分析方法可为其他中药材的特征嗅气分析提供参考。

[参考文献]

- [1] 陈晓旭,徐茂玲.“形、色、气、味”鉴中药[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(3):132-133.
- [2] 谢道生,武滨,孙海峰,等. 浑源黄芪药材豆腥味与品质关联性探讨-脂肪氧合酶提取及影响酶活因素的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2009,11(3):375-381.
- [3] 刘梦楚. 基于“辨状论质”及气、味数字化的砂仁药材质量评价研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [4] 赵雷蕾,周洋,黎茂,等. 基于数据化表达的中药“形色气味”研究进展及思考[J]. 广东药学院学报,2015,31(5):692-695.
- [5] 邓雨娇,许润春,曾陈娟,等. HS-SPME-GC-MS分析美洲大蠊不同炮制品的腥臭味物质[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(24):84-90.
- [6] 刘晓梅,张存艳,刘红梅,等. 基于电子鼻和HS-GC-MS研究地龙腥味物质基础和炮制矫味原理[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(12):154-161.
- [7] 拱健婷,赵丽莹,闫永红,等.“辨状论质”看中药材苦杏仁走油[J]. 中国中药杂志,2016,41(23):4375-4381.

- [8] 许舜军,杨柳,谢培山,等. 中药气味鉴别的研究现状与展望[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(2):228-231.
- [9] 胥敏,杨诗龙,张超,等. 基于气味客观化的黄连及其炮制品鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(1):89-93.
- [10] 徐珍珍,史星星. 基于电子鼻技术的LLE+SMA算法对木香的定性鉴别研究[J]. 中草药,2019,50(24):6114-6119.
- [11] 拱健婷,王佳宇,李莉,等. 基于电子鼻气味指纹图谱与XGBoost算法鉴别姜黄属中药[J]. 中国中药杂志,2019,44(24):5375-5381.
- [12] 黎量,杨诗龙,胥敏,等. 基于电子鼻、电子舌技术的山楂气、味鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):99-102.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:119.
- [14] 马继平,王涵文,关亚凤. 固相微萃取新技术[J]. 色谱,2002,20(1):16-20.
- [15] AISALA H, SOLA J, HOPIA A, et al. Odor-contributing volatile compounds of wild edible Nordic mushrooms analyzed with HS-SPME-GC-MS and HS-SPME-GC-O/FID [J]. Food Chem, 2019, 283: 566-578.
- [16] FIORI J, TURRONI S, CANDELA M, et al. Simultaneous HS-SPME GC-MS determination of short chain fatty acids, trimethylamine and trimethylamine N-oxide for gut microbiota metabolic profile[J]. Talanta,2018,189:573-578.
- [17] 马银宇,卢金清,彭博. HS-SPME-GC-MS分析温郁金不同炮制品的挥发性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(24):136-141.
- [18] 钱正明,李文庆,孙敏甜,等. 冬虫夏草化学成分分析[J]. 菌物学报,2016,35(4):476-490.
- [19] 钱正明,孙敏甜,周妙霞,等. 鲜冬虫夏草化学成分研究[J]. 中药材,2018,41(11):2586-2591.
- [20] 凌建亚,代兰婷,丁晓丽,等. 超临界CO₂萃取冬虫夏草子座挥发性成分的GC-MS研究[J]. 菌物学报,2006,25(1):138-141.

[责任编辑 刘德文]