

GC – MS 法分析青海省不同产地冬虫夏草中的脂肪酸

肖远灿 胡风祖* 迟晓峰 董琦 张波

(中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810008)

摘要: 目的 分析比较青海省4个地区7个不同产地的11批冬虫夏草中的脂肪酸类成分。方法 采用一步皂化甲酯化法衍生冬虫夏草中的脂肪酸类成分,GC – MS法和对照品对照定性、定量分析脂肪酸的组成和含量。结果 青海省产的冬虫夏草中主要含有C₁₄ ~ C₂₀的13种脂肪酸,其总量为67.376 ~ 148.494 mg • g⁻¹;其中,棕榈酸、油酸、亚油酸等3种脂肪酸的含量较高,其总含量占13种脂肪酸总量的92.74% ~ 96.23%;同一样品中,不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例为3.08 ~ 7.71;C₁₈和C₁₆的脂肪酸种类最多、含量最高,C₁₈/C₁₆为3.05 ~ 8.18;C₁₈脂肪酸中C_{18:1}/C_{18:2}为1.10 ~ 2.91。结论 青海省不同产地的冬虫夏草样品中13种脂肪酸的组成差异较小,但脂肪酸的含量和比例差异较大。

关键词: 冬虫夏草;青海;不同产地;脂肪酸;气相色谱 – 质谱联用法;定性;定量;对比分析

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 – 0103(2016)05 – 0517 – 04

DOI: 10.13375/j.cnki.wcjs.2016.05.024

Analysis of fatty acids in *Cordyceps sinensis* from the different regions of Qinghai province by GC – MS

XIAO Yuancan, HU Fengzu*, CHI Xiaofeng, DONG Qi, ZHANG Bo

(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810008 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To analyze and compare the fatty acid constitutes of 11 batches of *Cordyceps sinensis* from 7 different origins in 4 regions of Qinghai province. **METHODS** Fatty acid was derivated by one – step esterificating. Then a GC – MS method with reference substances was used to ascertain the composition and content of *C. sinensis* samples. **RESULTS** 13 kinds of fatty acid of 14 carbon – 20 carbon were found in *C. sinensis* from Qinghai province, whose total amount was between 67.376 – 148.494 mg • g⁻¹. Futhermore, palmitic acid, oleic acid and linoleic acid were the highest in the content. And the total content of the above three kinds of fatty acid accounted for 92.74% – 96.23% in all 13 fatty acids. In the same sample, the ratio of UFA/SFA was 3.08 – 7.71. The fatty acids of 18 carbon and 16 carbon were the higher components than the other fatty acids, while the 18 carbon fatty acids were the highest; and the ratio(C₁₈/C₁₆) ranged from 3.05 to 8.18. Additionally, the ratio of C_{18:1}/C_{18:2} was in the range of 1.10 to 2.91. **CONCLUSION** The differences of the composition of the above 13 kinds of fatty acid in *C. sinensis* from the different regions of Qinghai province were small, but large difference was exsited in the content and proportion of fatty acids.

Key words: *Cordyceps sinensis*; Qinghai province; Different Origin; Fatty acid; GC – MS; Qualitative; Quantitative; Comparative analysis

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 – 0103(2016)05 – 0517 – 04

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是中国的名贵滋补中药材和保健品,具有补肺益肾、止咳化痰等功效,民间多用于食疗保健;主产于西藏、青海、四川、云南等省区;具有调节免疫、抗肿瘤、调节内分泌、镇静和抗惊厥、促进造血、抗疲劳、保护肾脏等活性;脂肪酸是冬虫夏草的主要成分之一,具有重要的营养价值和生理功能^[1-3]。目前对冬虫夏草中脂肪酸的研究较少^[4-6]。青海省是冬虫夏草的主产区,有关该地区不同产地冬虫夏草中脂肪酸的分析比较尚未见报道。现采用GC – MS法测定和比较青海省不同产地冬虫夏草中脂肪酸的组成和含量,可为其利用和质量控制提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

7890A/5975C型气相色谱 – 质谱联用仪(美国Agilent)。43种脂肪酸甲酯混合对照品(美国Nuchek);14%三氟化硼甲醇溶液(美国Sigma);甲醇、异辛烷为色谱纯;高纯氦气(北京氮普北分气体工业有限公司);水为超纯水;冬虫夏草样品于2013年5月~8月采集,或产地购买于青海省玉树州、果洛州、黄南州、海南州等4个冬虫夏草主产地,其中,玉树州玉树县样品2个(YS1、YS2)、玉树州称多县2个(YS3、YS4)、玉树州杂多县2个(YS5、YS6)、玉

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2 – EW – J – 26);青海省科技计划应用基础项目(2011 – Z – 716)

作者简介:肖远灿(1980—),男,硕士,工程师,从事食品和药品的分析研究工作。Email: yexiao@nwipb.cas.cn

* 通信作者(Correspondent author), Email: hufz@nwipb.cas.cn

树州治多县 1 个(YS7)、果洛州久治县 2 个(GLI、GL2)、黄南州同仁县 1 个(HuN)、海南州共和县 1 个(HN),经中国科学院西北高原生物研究所研究员杜玉枝老师鉴定,自然风干、粉碎、过 60 目筛。

1.2 方法与结果

1.2.1 GC-MS 条件 采用 Agilent HP-88 色谱柱(88% 氰丙基聚硅氧烷)(60 m × 0.25 mm × 0.2 μm),进样口温度为 220 °C,分流比 2:1,进样量 1 μL。载气为高纯氦气,流速 2.0 mL·min⁻¹,程序升温:起始温度 40 °C,保持 3 min,以 40 °C·min⁻¹升温至 120 °C,再以 8 °C·min⁻¹升温至 160 °C,保持 1 min,以 3 °C·min⁻¹升温至 181 °C,保持 10 min,以 2 °C·min⁻¹升温至 212 °C,保持 5 min;离子源温度 230 °C,四级杆温度 150 °C,接口温度 280 °C,EI 电离源,电子能量 70 eV,Scan 模式,扫描分子量范围: *m/z* 50 ~ 800,溶剂延迟 4.5 min。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取脂肪酸甲酯混合对照品 95.3 mg,用异辛烷溶解并定容至 10 mL,

表 1 各脂肪酸甲酯的方法学考察结果

Table 1 Results of the methodology study of fatty acid methyl esters

Fatty acids	Regression equations	<i>r</i>	Linear ranges/μg·mL ⁻¹	LODs/mg·g ⁻¹	LOQs/mg·g ⁻¹	Recovery/% (<i>n</i> = 9)	RSDs/% (<i>n</i> = 3)
C _{14:0}	$Y = 5.3385X + 7.6637$	0.9998	1.59 - 203.67	0.01	0.03	94.1	1.1
C _{15:0}	$Y = 5.2398X + 8.5044$	0.9997	1.59 - 203.9	0.01	0.03	96.3	1.3
C _{16:0}	$Y = 5.1651X + 16.604$	0.9997	3.20 - 409.93	0.02	0.07	101.3	0.9
C _{16:1n-7}	$Y = 5.1875X + 8.4132$	0.9997	1.60 - 204.7	0.01	0.03	97.2	0.7
C _{16:1}	$Y = 5.1543X + 8.3751$	0.9997	1.60 - 204.7	0.01	0.03	98.2	1.6
C _{17:0}	$Y = 5.1197X + 7.8573$	0.9997	1.60 - 205.3	0.01	0.04	99.7	2.3
C _{18:0}	$Y = 5.1578X + 7.7081$	0.9998	1.61 - 205.8	0.02	0.07	97.4	0.8
C _{18:1}	$Y = 5.1485X + 7.9189$	0.9997	1.61 - 205.8	0.02	0.07	93.9	1.4
C _{18:2}	$Y = 5.1446X + 7.3915$	0.9998	1.61 - 205.7	0.02	0.07	102.7	2.1
C _{20:0}	$Y = 5.0012X + 6.2301$	0.9998	1.62 - 206.9	0.02	0.07	94.5	2.3
C _{18:3α}	$Y = 5.0849X + 7.8387$	0.9997	1.60 - 205.2	0.02	0.07	96.9	2.7
C _{20:1}	$Y = 7.1722X + 7.4294$	0.9998	1.61 - 206.4	0.03	0.10	92.2	1.6
C _{20:2}	$Y = 5.0474X + 5.8326$	0.9998	1.61 - 206.2	0.03	0.11	95.4	1.6

1.2.5 回收率与重复性试验 取 YS3 样品,按“1.2.3”项方法制备供试品溶液,重复进样 3 次,计算各脂肪酸峰面积的 RSD。称取 3 份 YS3 样品,加入高、中、低浓度对照品溶液适量,制备供试品溶液并进样测定,每个样品重复 3 次,根据样品中原有各脂肪酸的含量分别计算平均回收率(表 1)。

1.2.6 不同产地冬虫夏草中脂肪酸的种类分析 取 11 批样品,按“1.2.3”项方法制备供试品溶液,分别进样,进行 GC-MS 分析。采用色谱工作站软件和 NIST 05 标准谱图对各脂肪酸甲酯进行检索,根据标准谱库中碎片离子及其比例、匹配相似度等对脂肪酸的种类进行初步定性。此外,再结合脂肪酸甲酯对照品溶液各色谱峰的保留时间及在相同分析条件下的质谱信息,包括离子碎片和主要离子的比例等,与样品相应的色谱峰进行对照,确定样品中

得 9.53 mg·mL⁻¹混合对照品贮备液,分析时根据样品中各脂肪酸的含量范围配制成对照品溶液使用。

1.2.3 样品脂肪酸的甲酯化 称取样品粉末 0.2 g,置 100 mL 烧瓶中,加入 0.5 mol·L⁻¹氢氧化钾甲醇溶液 5 mL,充入氮气,上接冷凝管,于 70 °C 水浴中回流 10 min;加入 5 mL 三氯化硼甲醇溶液,再回流 10 min,取下,用 10 mL 甲醇淋洗冷凝管内壁,合并淋洗液于烧瓶中;将烧瓶冷却至室温,准确加入 10 mL 异辛烷,充分混匀,加入 5 mL 饱和氯化钠溶液,充分混匀,混合物转移至 50 mL 离心管中,密塞,于 4 × 10³ r·min⁻¹离心 5 min,上层液经无水硫酸钠脱水后,即得供试品溶液。

1.2.4 线性关系、检出限与定量限的考察 采用等倍稀释的方法,将脂肪酸甲酯混合对照品贮备液稀释成适宜浓度的线性溶液,分别进样测定,记录色谱图。以峰面积为纵坐标、各脂肪酸的浓度为横坐标,绘制回归曲线,并根据 S/N = 3 和 S/N = 10 计算各脂肪酸的检出限和定量限(表 1)。

各脂肪酸的种类。由图 1 和表 2 可见:青海省产的冬虫夏草中主要含有肉豆蔻酸、十五碳酸、棕榈酸、棕榈油酸、反式棕榈油酸、十七碳酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、花生酸、11-二十碳一烯酸和二十碳二烯酸等 13 种脂肪酸。

1.2.7 不同产地冬虫夏草中脂肪酸的含量分析 对各脂肪酸的色谱峰进行积分,记录峰面积,采用外标法计算样品中各脂肪酸的含量(表 3)。不同产地的冬虫夏草主要由 C₁₄ ~ C₂₀ 的 13 种脂肪酸组成,其总含量为 67.376 ~ 148.494 mg·g⁻¹。青海不同产地冬虫夏草中棕榈酸、油酸、亚油酸等 3 种脂肪酸的含量最高;反式棕榈油酸、棕榈油酸、硬脂酸、α-亚麻酸等 4 种脂肪酸的含量较高;而月桂酸、十五碳酸、十七碳酸、花生酸、二十碳一烯酸和二十碳二烯酸等 6 种脂肪酸的含量较低(表 3、4)。玉树州和黄南州

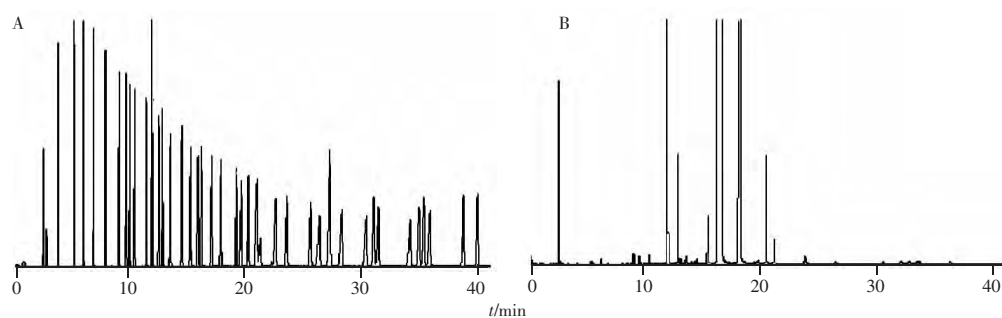


图 1 脂肪酸甲酯混合对照品(A)和YS3样品中脂肪酸甲酯(B)溶液的总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms of mixed fatty acid methyl ester control solution(A) and YS3 sample solution(B)

表 2 青海省产的冬虫夏草中脂肪酸的组成(脂肪酸甲酯)

Table 2 Fatty acid composition of *C. sinensis* from Qinghai province(fatty acid methyl ester)

Peak No.	t_R /min	Molecular formula	Relative molecular weight	Fatty acid carbon chain	Fatty acid methyl ester
1	12.706	$C_{15}H_{30}O_2$	242	$C_{14}:0$	肉豆蔻酸甲酯
2	13.877	$C_{16}H_{32}O_2$	256	$C_{15}:0$	十五碳酸甲酯
3	15.270	$C_{17}H_{34}O_2$	270	$C_{16}:0$	棕榈酸甲酯
4	15.890	$C_{17}H_{32}O_2$	268	$C_{16}:1n5(\Delta_{11})$	反式棕榈油酸甲酯
5	16.028	$C_{17}H_{32}O_2$	268	$C_{16}:1n7(\Delta_9)$	棕榈油酸甲酯
6	16.638	$C_{18}H_{36}O_2$	284	$C_{17}:0$	十七碳酸甲酯
7	18.306	$C_{19}H_{38}O_2$	298	$C_{18}:0$	硬脂酸甲酯
8	19.278	$C_{19}H_{36}O_2$	296	$C_{18}:1n9(\Delta_9)$	油酸甲酯
9	20.696	$C_{19}H_{34}O_2$	294	$C_{18}:2n6(\Delta_9, \Delta_{12})$	亚油酸甲酯
10	22.024	$C_{21}H_{42}O_2$	326	$C_{20}:0$	花生酸甲酯
11	22.673	$C_{19}H_{32}O_2$	292	$C_{18}:3n3(\Delta_9, \Delta_{12}, \Delta_{15})$	α -亚麻酸甲酯
12	23.249	$C_{21}H_{40}O_2$	324	$C_{20}:1n9(\Delta_{11})$	11-二十碳一烯酸甲酯
13	25.552	$C_{21}H_{38}O_2$	322	$C_{20}:2n7(\Delta_{11}, \Delta_{13})$	二十碳二烯酸甲酯

表 3 不同产地冬虫夏草中脂肪酸含量的测定结果($mg \cdot g^{-1}$)

Table 3 Determination of the fatty acids in *C. sinensis* from the different habitats($mg \cdot g^{-1}$)

Fatty acids	YS1	YS2	YS3	YS4	YS5	YS6	YS7	GL1	GL2	HuN	HN
$C_{14}:0$	0.069	0.061	0.106	0.074	0.058	0.073	0.101	-	0.162	0.058	-
$C_{15}:0$	0.068	0.048	0.089	0.060	0.051	0.067	0.079	-	-	0.077	-
$C_{16}:0$	17.136	8.834	21.267	10.053	9.923	12.679	18.545	11.967	35.036	13.876	7.169
$C_{16}:1n$	0.742	0.688	1.158	0.618	0.716	0.762	0.917	0.235	0.741	0.915	0.352
$C_{16}:1$	1.150	0.632	1.438	0.650	0.806	1.161	1.224	0.390	0.883	0.885	0.163
$C_{17}:0$	0.089	0.100	0.115	0.110	0.090	0.103	0.094	0.118	-	0.100	0.123
$C_{18}:0$	0.937	0.842	1.048	0.903	0.717	0.788	0.923	0.918	1.241	0.917	0.827
$C_{18}:1$	65.158	37.385	82.038	40.400	46.711	54.261	71.498	32.807	80.182	64.638	31.127
$C_{18}:2$	22.397	19.099	31.896	23.322	21.949	24.864	27.445	18.948	27.675	26.446	28.246
$C_{20}:0$	0.078	-	-	0.089	-	-	0.072	-	-	0.092	-
$C_{18}:3\alpha$	2.105	1.806	2.670	2.534	1.427	2.236	2.633	1.993	2.574	1.908	2.674
$C_{20}:1$	0.227	0.379	0.344	0.582	0.146	0.221	0.319	-	-	0.265	-
$C_{20}:2$	0.103	0.096	0.130	0.159	0.133	0.112	0.124	-	-	-	-
Total	110.259	69.970	142.299	79.554	82.727	97.327	123.974	67.376	148.494	110.177	70.681

-: 低于定量限

产的冬虫夏草中均含有月桂酸和十五碳酸以及二十碳一烯酸,而果洛州和海南州所产冬虫草中该 4 种脂肪酸的含量极低或未含有。在同一冬虫夏草样品中,油酸的含量最高,其含量为 31.127 ~ 82.038 $mg \cdot g^{-1}$; 亚油酸次之,含量为 18.948 ~ 31.896 $mg \cdot g^{-1}$; 棕榈酸再次之,含量为 7.169 ~ 35.036 $mg \cdot g^{-1}$; 此外,果洛州 GL2 样品中棕榈酸的含量高于亚油酸。同一样品中棕榈酸、油酸和亚油酸 3 种脂肪酸的总含量占 13 种

脂肪酸总量的 92.74% ~ 96.23%。

1.2.8 不同产地冬虫夏草中脂肪酸的组成分析

由表 4 可见:青海省产的冬虫夏草中不饱和脂肪酸(UFA)所占比例远高于饱和脂肪酸(SFA),占 13 种脂肪酸总量的比例为 75.46% ~ 88.51%; UFA/SFA 为 3.08 ~ 7.71; 玉树产冬虫夏草的 UFA/SFA 范围相对集中,为 5.00 ~ 6.63; 海南州的样品中该比值最高,为 7.71; 果洛州的样品 GL2 的 UFA/SFA 最

低,为 3.08。在 UFA 中,单不饱和脂肪酸比例(MUFA)高于多不饱和脂肪酸(PUFA),MUFA 中又以油酸的含量最高,占 13 种脂肪酸总量的 44.04% ~ 59.10%; PUFA 中以亚油酸的含量最高,为 18.64% ~ 39.96%。SFA 中以棕榈酸的含量最高,为 10.14% ~ 23.59%。在青海省产的冬虫夏草样品

中检测到的脂肪酸中, C_{18} 和 C_{16} 脂肪酸的含量最高,种类最多,其中, C_{18} 的脂肪酸含量高于 C_{16} 的脂肪酸,其比值(C_{18}/C_{16})为 3.05 ~ 8.18。 C_{18} 的脂肪酸有硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸,其中,油酸和亚油酸的含量较高, $C_{18:1}/C_{18:2}$ 为 1.10 ~ 2.91。

表 4 不同产地冬虫夏草中 13 种脂肪酸的比例(%)

Table 4 Proportion of 13 kinds of fatty acids in *C. sinensis* from the different habitats(%)

Fatty acids	YS1	YS2	YS3	YS4	YS5	YS6	YS7	GL1	GL2	HuN	HN
$C_{14:0}$	0.06	0.09	0.07	0.09	0.07	0.08	0.08	-	0.11	0.05	-
$C_{15:0}$	0.06	0.07	0.06	0.08	0.06	0.07	0.06	-	-	0.07	-
$C_{16:0}$	15.54	12.63	14.95	12.64	11.99	13.03	14.96	17.76	23.59	12.59	10.14
$C_{16:1T}$	0.67	0.98	0.81	0.78	0.87	0.78	0.74	0.35	0.50	0.83	0.50
$C_{16:1}$	1.04	0.90	1.01	0.82	0.97	1.19	0.99	0.58	0.59	0.80	0.23
$C_{17:0}$	0.08	0.14	0.08	0.14	0.11	0.11	0.08	0.18	-	0.09	0.17
$C_{18:0}$	0.85	1.20	0.74	1.14	0.87	0.81	0.74	1.36	0.84	0.83	1.17
$C_{18:1}$	59.10	53.43	57.65	50.78	56.46	55.75	57.67	48.69	54.00	58.67	44.04
$C_{18:2}$	20.31	27.30	22.41	29.32	26.53	25.55	22.14	28.12	18.64	24.00	39.96
$C_{20:0}$	0.07	-	-	0.11	-	-	0.06	-	-	0.08	-
$C_{18:3\alpha}$	1.91	2.58	1.88	3.19	1.72	2.30	2.12	2.96	1.73	1.73	3.78
$C_{20:1}$	0.21	0.54	0.24	0.73	0.18	0.23	0.26	-	-	0.24	-
$C_{20:2}$	0.09	0.14	0.09	0.20	0.16	0.12	0.10	-	-	-	-
SFA	16.67	14.13	15.90	14.19	13.10	14.09	15.98	19.30	24.54	13.72	11.49
MUFA	61.02	55.86	59.72	53.11	58.48	57.95	59.66	49.62	55.09	60.54	44.77
PUFA	22.32	30.01	24.38	32.70	28.42	27.96	24.36	28.12	20.37	25.73	43.75
UFA	83.33	85.87	84.10	85.81	86.90	85.91	84.02	77.74	75.46	86.28	88.51
UFA/SFA	5.00	6.08	5.29	6.05	6.63	6.10	5.26	4.03	3.08	6.29	7.71
C_{18}/C_{16}	4.76	5.82	4.93	5.93	6.19	5.63	4.95	4.18	3.05	5.99	8.18
$C_{18:1}/C_{18:2}$	2.91	1.96	2.57	1.73	2.13	2.18	2.61	1.73	2.90	2.44	1.10

2 讨论

由于冬虫夏草样品珍贵,所以,文中采用了样品直接甲酯化的方法制备供试品溶液。曾从样品量、粒度、甲酯化反应时间、样品与甲酯化料液比等方面对样品的甲酯化过程进行了优化。结果表明:优化后的方法与传统方法的提取效果相近,但样品用量少,更快速、简便。脂肪酸类成分主要集中在冬虫夏草的“虫体”部位,其含量体现了冬虫夏草的品质。一般来说,脂肪酸总量高说明冬虫夏草的“虫体”部位比例高,虫体饱满。冬虫夏草在不同生长阶段,其“虫体”和“草体”(真菌)间的比例在持续变化,随着“草体”的生长,“虫体”的营养成分逐渐被真菌利用,变得越来越干瘪;与此同时,草体则逐渐长大,直至真菌孢子飞散,在此过程中,脂肪酸的总量逐渐降低。此外,冬虫夏草中各脂肪酸的含量和比例随着储存时间的变化而发生改变,随着储存时间的延长,冬虫夏草中的不饱和脂肪酸类成分会逐渐被氧化而变成饱和脂肪酸,所以通过冬虫夏草中各种脂肪酸比例的分析还能够分辨储存时间的长短。脂肪酸类

成分是冬虫夏草的主要成分,其含量和比例体现了冬虫夏草的品质,值得研究。

参考文献:

- [1] 魏玲,赵应华,郭遂.冬虫夏草活性成分的含量研究概况[J].华西药 学 杂 志,2003,18(5):359-360.
- [2] Zhou XW, Gong ZH, Su Y, et al. *Cordyceps fungi*: Natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(3): 279-291.
- [3] Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57(12): 1509-1519.
- [4] 崔红燕,李泰辉,宋斌,等.广东虫草脂肪酸的 GC-MS 分析[J].食用菌学报,2010,17(2):89-92.
- [5] Guo LX, Xu XM, Wu CF, et al. Fatty acid composition of lipids in wild *Cordyceps sinensis* from major habitats in China[J]. Biomed Prev Nutr, 2012, 2: 42-50.
- [6] Yang FQ, Feng K, Zhao J, et al. Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Ana, 2009, 49: 1172-1178.

收稿日期:2015-03-10