

TripleTOF 5600在冬虫夏草高端保健品打假领域的应用

程海燕¹, 李立军¹, 张九凯², 靳文海¹

¹SCIEX 亚太应用支持中心, 中国; ²中国检验检疫科学院

引言

冬虫夏草, 麦角菌科, 为虫体与菌座相连而成, 它的外形奇特, 冬天是虫子, 夏天却是草, 是我国民间惯用的一种名贵滋补药材, 味甘, 性温, 入肺、肾二经。其营养成分高, 可入药, 也可食用, 是滋补的上乘佳肴, 具有很高的营养价值, 有“软黄金”的美称。

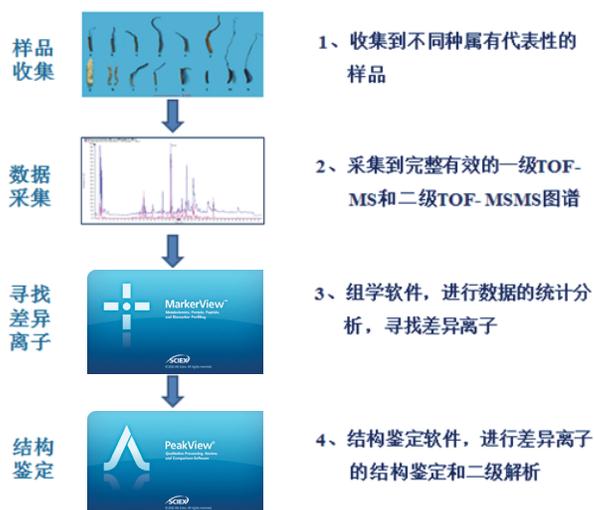
冬虫夏草属于虫草的一种, 在中药上只有冬虫夏草被中药承认, 可入药。由于冬虫夏草的生长要求苛刻, 产地在全国只有5个省份, 分别为西藏, 青海, 四川, 云南, 甘肃。野生虫草属稀缺滋补品, 需求很大, 价格逐年走高, 在2014年10月, 每千克品相较好的野生虫草的价格在17,000 ~ 35,000 \$。供需失衡和经济利益驱使虫草造假愈演愈烈, 屡禁不止, 而且很多粉状或者成品更增加了识别的难度。很多假的冬虫夏草不仅没有药效, 甚至很多还有毒, 不仅起不到滋补效果, 有的还会严重危害身体健康, 因此建立虫草的身份验证关乎经济和大众健康的两大方面, 建立虫草的打假方法迫在眉睫。

本方案采用SCIEX TripleTOF 5600采集数据, MarkerView和MasterView软件进行数据处理, 一次采集数据, 大大提高了数据采集和数据处理效率, 特点如下:

- 1、由于TripleTOF是业内公认的最快扫描速度, 结合SCIEX专利的实时动态背景扣除, 能够实现一针进样, 同时采集复杂样品有效的高分辨一级和高分辨二级质谱数据, 无需在找到标志物后的二次进样, 为实验人员解决了二次进样保留时间对不上, 样品过期重新制备等实际困难。
- 2、MarkerView软件能够快速进行数据的导入和PCA分析, T检验等统计分析, 为实验室人快速找到不同组分的差异离子, 为实验人员解决了海量数据处理的困难。
- 3、MasterView软件自动给出标识物的分子式, 自动连接Chemspider进行结构推断, 并进行二级碎片解析, 为实验人员解决了结构解析的耗时耗力的困难。



实验思路:



收集样品的产地和外观:

实验选用18种虫草样品分别为: 6种冬虫夏草; 6种虫草; 3种人工培养的虫草-虫草花; 3种虫草模仿物-草石蚕。见下表1。样品外观见图1。

表1. 样品详细产地和种属列表。

Cordyceps type	No.	Latin name	Place origin
冬虫夏草 (DCXC)	1	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Yushu, Qinghai
	2	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Naqu, Tibet
	3	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Aba, Sichuan
	4	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Xianggelila, Yunan
	5	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Deqing, Yunan
	6	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	Lanping, Yunnan
虫草 (CC)	7	<i>Metacordyceps litangshanensis</i>	Xichang, Sichuan
	8	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>	Xinjiang
	9	<i>Ophiocordyceps robertsii</i>	Zhaotong Yunan
	10	<i>Cordyceps hawkasii</i>	Hunan
	11	<i>Cordyceps hawkasii</i>	Lanping, Yunnan
	12	<i>Cordyceps gunii</i>	Shiqian, Guizhou
人工培养虫草花 (CCH)	13	<i>Cordyceps militaris</i>	Beijing
	14	<i>Cordyceps militaris</i>	Yunnan
	15	<i>Cordyceps militaris</i>	Guangdong
冬虫夏草模仿物 (CSC)	16	<i>Stachys sieboldii</i>	Guangxi
	17	<i>Stachys sieboldii</i>	Hebei
	18	<i>Stachys sieboldii</i>	Yunnan



图1. 各样本外观图, a-f分别为玉树、那曲、香格里拉、兰坪、德钦和阿坝六个产地的冬虫夏草; g和h分别为草石蚕和虫草花; i-n分别为湖南亚香棒、云南亚香棒、古尼虫草、新疆虫草、凉山虫草和罗伯茨虫草。

样品前处理:

样品冻干24h后粉碎, 取20 mg粉末, 加入1mL的甲醇-水 (v:v, 20:80), 涡旋后室温下超声提取90 min, 提取两次后

合并提取液, 12,000 rpm离心, 过0.222 μ m膜, 稀释4倍进样。

液相条件

液相系统: Shimadzu 20AD XR

色谱柱: Phenomenex C18 2.1 \times 100 mm, 2.6 μ m

流动相: A: H₂O-0.1%甲酸 (含5mM乙酸铵)

B: MeOH-0.1%甲酸 (含5mM乙酸铵)

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40 $^{\circ}$ C;

进样体积: 2 μ L

梯度:

表2. 检测液相梯度条件。

time	A(%)	B(%)
2	98	2
14	5	95
14	5	95
17	5	2
20	98	2

质谱条件:

扫描方式: TOFMS-IDA-15 TOFMSMS

扫描范围: m/z 50-1000

CDS自动校正

DuoSpray离子源参数:

气帘气CUR: 35 psi 喷雾电压: 5500V;

源温度: 550 $^{\circ}$ C 雾化气Gas1: 50 psi;

辅助气Gas2: 50 psi

化合物参数:

解簇电压: 60V

碰撞能量: 35 \pm 15V

四大类虫草样品色谱图:

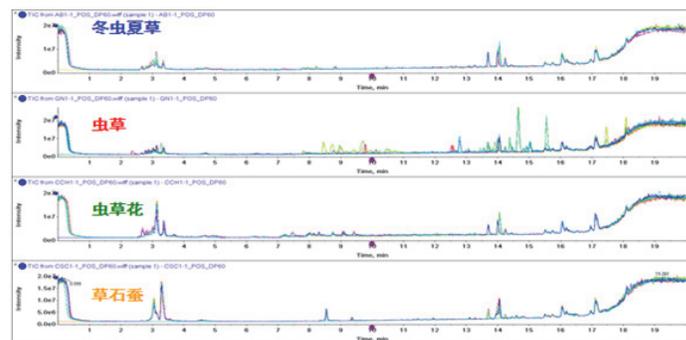


图2. 四大类虫草样品LC-MS总离子流 (TIC) 图-正离子模式^[1]。

数据处理过程和结果:

利用组学处理软件Markerview1.2.1, 导入数据, 滤去同位素峰后, 共检测到2098个峰。对数据进行主成分分析, 对不同来源的虫草样品进行分组, 分组结果如下图3所示^[1]:

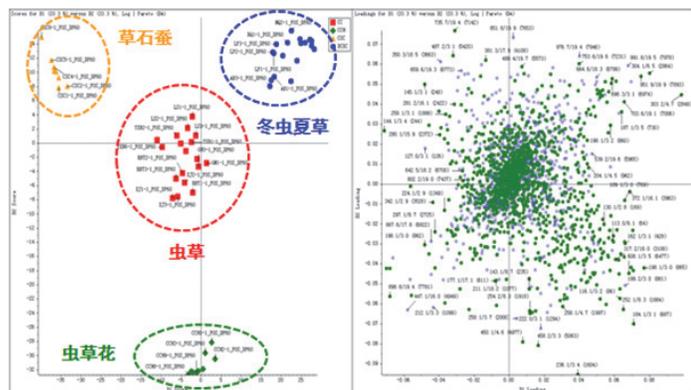


图3. A: 虫草样品PCA的Score Plot; B: 虫草样品PCA的Loading Plot共检测到2098个峰。

数据鉴定结果:

本实验共鉴定出18种特征标记物, 其中4种为冬虫夏草所特有, 3种为虫草特有, 3种虫草花特有, 3种草石蚕特有, 5种同时出现在冬虫夏草和虫草中。具体如下表3所示^[1]:

表3. 4大类虫草样品鉴定的特征离子汇总表

No.	m/z (MS)	RT (min)	Ion	m/z (MS/MS)	Formula	Mass error (ppm)	Tentative identification	Cordyceps Types
1	304.1404	6.42	[M+H] ⁺	286.1299, 268.1193, 258.1349, 188.0907	C14H17N5O3	-2.0	Pipemicic Acid	DCXC
2	303.1550	4.69	[M+H] ⁺	285.1423, 257.1490, 188.0915, 116.0722	C13H22N2O6	-0.2	N,N-(1,9-dioxo-1,9-noradenediylbis)pycine	DCXC
3	276.1192	3.27	[M+H] ⁺	168.0645, 147.0759, 130.0500, 84.0472	C10H17N5O6	0.7	L-γ-Glutamyl-L-glutamine	DCXC
4	330.0552	6.34	[M+H] ⁺	263.0631, 207.0300, 136.0618, 98.9871	C10H12N5O6P	0.4	3',5'-Cyclic AMP	DCXC
5	131.1298	2.80	[M+H] ⁺	114.1029, 97.0766, 72.0853, 60.0614	C5H14N4	5.2	Agmatine	CC
6	398.2907	9.79	[M+NH4] ⁺	339.2172, 311.2224, 283.1546, 154.0979	C23H32N4O	2.7	1-(4-Butyl-2-methylphenyl)-3-(4-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl)urea	CC
7	282.1197	8.90	[M+H] ⁺	136.0620, 129.0516, 119.0442	C11H15N5O4	-0.6	N6-Methyladenosine	CC
8	252.1094	8.30	[M+H] ⁺	136.0623, 119.0367, 261.0367, 243.0249	C10H13N5O3	1.1	Cordycepin-2'-deoxyadenosine	CCH
9	425.0892	2.93	[M+H] ⁺	145.0499, 127.0395, 180.0874, 162.0775, 135.0671, 119.0363	C12H17N5O5	0.8	N6-(2-hydroxyethyl)adenosine	CCH
11	144.1027	3.37	[M+H] ⁺	102.0575, 84.0848, 72.0864, 58.0726	C7H13NO2	5.5	1-Piperidinylacetic acid	CSC
12	542.2074	8.54	[M+NH4] ⁺	165.0544, 147.0446, 137.0607, 119.0510	C18H24N10O9	-0.1	Unknown	CSC
13	487.1663	3.11	[M+H] ⁺	325.1159, 163.0599, 145.0497, 127.0389	C20H22N8O7	-4.4	Unknown	CSC
14	127.0508	8.80	[M+H] ⁺	110.0237, 82.0365, 54.0492	C5H8N2O2	4.7	Thymine	DCXC, CC
15	269.0876	7.90	[M+H] ⁺	137.0460, 119.0355, 200.0842, 141.0123	C10H12N4O5	-1.7	Inosine	DCXC, CC
16	276.1019	7.14	[M+H] ⁺	227.1389, 186.1125, 168.1024, 150.0922	C18H13NO2	-2.2	3,5-Diphenylpyridine-2-carboxylic acid	DCXC, CC
17	245.1491	3.39	[M+H] ⁺	357.1383, 325.1113, 195.0860, 163.0595	C11H20N2O4	2.5	4-Amino-1-Boc-4-piperidincarboxylic acid	DCXC, CC
18	698.2708	3.14	[M+NH4] ⁺		C39H32N6O6	2.7	Unknown	DCXC, CC

以冬虫夏草标志物 m/z 304.1, Rt 6.5 min 为例, 展示 MasterView 软件结构鉴定过程。下图为 m/z 304.1 在不同样品的含量差异图, 如图4所示:

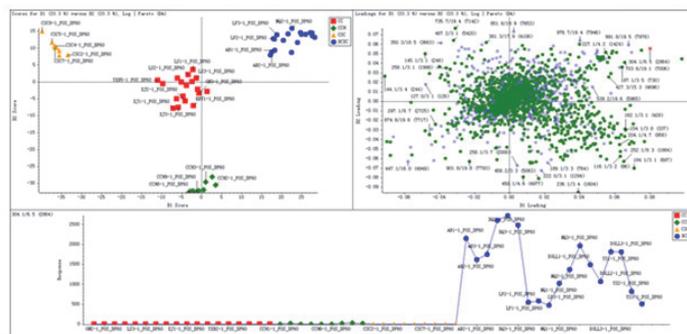


图4. 冬虫夏草Marker: m/z (304.1), Rt (6.5 min)。

冬虫夏草特征标记物 m/z 304.1, 保留时间在 6.5 min, 经结果鉴定为: C₁₄H₁₇N₅O₃, Pipemicic acid, m/z (MS)=304.1404, m/z (MS/MS)=286.1299, 268.1193, 258.1349, 188.0907。鉴定过程如下图5所示:

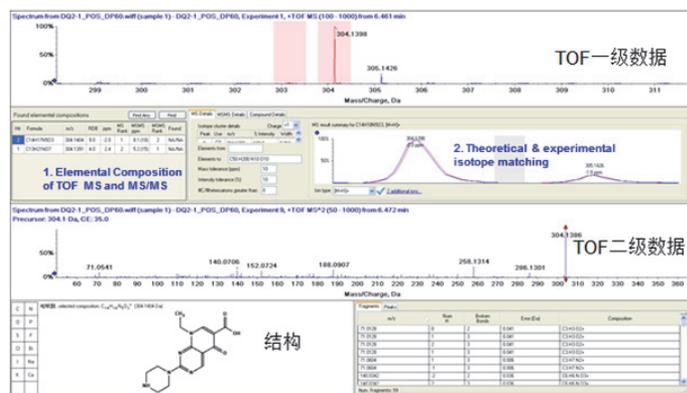


图5. 冬虫夏草Marker: m/z 304.1 结构归属过程。

结论

- 1、本实验共鉴定出18个标志物, 其中4种为冬虫夏草所特有, 3种为虫草特有, 3种虫草花特有, 3种草石蚕特有, 5种同时出现在冬虫夏草和虫草中, 为不同种属的虫草鉴别提供依据, 也为中药冬虫夏草提供了身份验证的标志物质。
- 2、本实验充分体现了TripleTOF5600在组学领域的强大优势, 其超快的扫描速度, 能够实现一次进样, 同时采集到高分辨的一级

和高分辨的二级数据，无需二次进样，解决了组学实验的为得到标志物的二级，二次进样产生的保留时间对不上、样品重新制备以及样品不易得到等多种实际困难，是进行组学研究的利器。

- 3、本实验展示了SCIEX在高端保健品打假和食品组学领域的优势，能够提供高效快捷一体化的解决方案，为客户的科研和食品安全保驾护航。

参考文献

- 1、 Jiukai Zhang, Peng Wang, Xun Wei, et al. A methabolomics approach for authentication of *Ophiocordy ceps sinensis* by liquid chromatography coupled with quardrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Food Research International, 2015, 76(3), 489-497.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。

获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。

© 2016 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-4078-ZH-B



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及中国区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：sciex.com.cn

官方微信：ABSciex-China

广州分公司

地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835