DOI: 10.3724/SP. J.1096.2011.01380

高效液相色谱与液相色谱-质谱分析 冬虫夏草相关产品之麦角固醇与其衍生物

陈林 \mathfrak{P}^1 许瑞祥¹ 郭嘉信^{* 2}

1(台湾大学生命科学院/生化科技学系、台北市 10617) 2(屏东科技大学农学院/食品科学系、屏东县 91201)

摘要采用 HPLC 与 LC-MS 分析西藏冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*, Cs)子实体、Cs 分离的无性世代中国被 毛孢(Hirsutella sinensis)菌丝体(Hsm) RS6-3、市售蛹虫草(*Cordyceps militaris*, Cm)和蝙蝠蛾拟青霉(Paecilomyces hepiali, Cs-4)中所含的麦角固醇与其衍生物。结果表明:Cs子实体子座的麦角固醇比菌核高约3倍, 含量约为0.92 g/L 具该子座含2种 H1-A 衍生物;本实验室所分离的 Hsm RS6-3 含有5种 H1-A 衍生物;但 Cs子实体菌核、Cm和 Cs-4均不含有 H1-A 衍生物。本研究为虫草相关产品的质量检测提供了技术支持。

关键词 冬虫夏草; 中国被毛孢; 蛹虫草; 蝙蝠蛾拟青霉; 麦角固醇衍生物; 高效液相色谱; 液相色谱-质谱

1 引 言

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc., Cs),由僵硬的喜马拉雅鳞翅目蝙蝠蛾科昆虫虫草的蝙 蝠蛾(*Hepialus armoricanus* Oberthur)幼虫的头顶长出菌柄(Stipe)和子座(Stroma),最终形成一个狼牙棒 的子实体^[1~3]。本实验室于 1999 年从 Cs 子实体中分离出来无性世代中国被毛孢菌丝体(*Hirsutella sinensis mycelium*, Hsm),并获分子生物鉴定其基因而确认^[4~6]。

Cs 因可治疗肺与肾脏等疾病而受到关注^[27]。麦角固醇(ergosterols)及其衍生物具有细胞毒素活性、抗病毒与抗心律不整等药理功效^[8],而Cs 特有的麦角固醇衍生物 H1-A 甚至可抑制已活化的人类肾丝球肾膈细胞(Activated human mesangial cells)及改善A 型免疫球蛋白肾病(Immunoglobulin A nephropathy)^[9,10]。

本研究采用 HPLC 分析西藏的 Cs 子实体分离的 Hsm RS6-3、市售蛹虫草(Cordyceps militaris, Cm) 和蝙蝠蛾拟青霉(Paecilomyces hepiali, Cs-4),对甲醇提取液中二次代谢产物进行层析图谱分析,探讨其 LC-MS/MS 的分析条件,寻找虫草甲醇提取液中麦角固醇及其衍生物 H1-A 相关二次代谢产物,为虫草 相关产品的质量检测提供技术支持。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

Cs 子实体(西藏); Cm(台湾万生生技公司) 与 Cs-4 菌丝体粉末(烟台瑞东科技发展公司); 马铃薯 葡萄糖肉汁培养液(PDB) 及其洋菜培养基(PDA) 购自美国 Acumedia 公司; 蛋白胨(美国 Difco 公司)。 麦角固醇标准品(美国 Sigma 公司); 甲醇(HPLC 级 德国 Merck 公司); 实验用水均经过 Milli-Q 的纯水 系统(美国 Millipore 公司) 处理。

2.2 菌株的培养与保存

本研究室从 Cs 子实体中分离出无性世代菌株 Hsm RS6-3^[5],接种于 PDA 的斜面试管中,以(15±0.5)℃进行种菌培养,每隔4~6个月移殖至新鲜 PDA 斜面试管中培养,以此进行菌种的培养与保存。

2.3 实验用菌株的培养准备

以无菌接种钩勾取面积约0.5~1 cm²的菌丝体 移植到含有 PDA 的平板中,并于(15±0.5) ℃培养 2 个月,再以无菌接种钩勾取面积约0.5~1 cm²的菌丝体,移植到含有 150 mL PDB 的 500 mL 摇瓶中,

²⁰¹¹⁻⁰²⁻¹³ 收稿; 2011-05-27 接受

本文系台湾屏东农业生物技术科学园区研究计划(No. 97AS-I3.1.4-PT-F3(1))资助

^{*} E-mail: jhguo@ mail. npust. edu. tw

第9期 陈林琤等: HPLC 与 LC-MS 分析冬虫夏草相关产品之麦角固醇与其衍生物

在转速 80 r/min (15 ±0.5) ℃条件下。摇瓶振荡培养 2 个月。

2.4 HPLC 的分析条件

L-2130 HTA 型 HPLC 系统 配 L-2420 型 UV-visible 检测器(日本 Hitachi 公司); Thermo C-18 Gold 色谱柱(250 mm×4.6 mm i. d., 5 µm, 澳大利亚 Thermo 公司); 柱温 40 ℃; 进样量为 20 µL; 流动相为 甲醇-水(9:1, V/V); 采等度洗脱方式; 流速 0.67 mL/min; 检测波长 280 nm。

2.5 样品的前处理

将 Cs 子实体切割分成子座(Stroma) 与菌核(Sclerotium) 两部份,并冻干以备使用; 培养 2 个月的 Hsm RS6-3 在4 ℃,以 6000 r/min 离心 15 min 获取其菌丝体部份,以超纯水清洗两次并冻干,备用; Cm 与 Cs-4 菌丝体的粉末亦于使用前冻干。

2.6 HPLC 分析样品的总麦角固醇

在 0.1 g 经干燥并研磨成粉末的样品中,加入 10 倍体积的甲醇,并于冰浴中超声振荡 10 min;以 10000 r/min 离心 5 min,收集上清液;其沉淀物再加入 10 倍体积的甲醇重复提取及离心,合并上述上清 液;以 0.22 μm 滤膜(美国 Sigma 公司)过滤;取 20 μL 滤液进行 HPLC 分析。麦角固醇的标准溶液浓度 为 2,5,10,50,100,300,500,800 和 1000 mg/L。上述分析均重复至少 3 次。

2.7 LC-ESI-MS 分析麦角固醇类与其衍生物 H1-A

液相层析部分是使用 Finnigan Surveyor Plus 液态层析系统(美国 Thermo 公司); Thermo C-18 Gold 色谱柱(125 mm×4.6 mm i. d., 5 µm 澳大利亚 Thermo 公司); 柱温 40 ℃; 进样量 20 µL; 流动相为甲 醇-水(9:1, V/V); 采用等度洗脱方式; 流速 80.4 µL/min; 检测波长 280 nm。一级质谱条件使用液态层 析系统串联 Finnigan LCQ DECA 质谱光谱检测仪(美国 Thermo 公司)并配电喷雾离子源(Electrospray ionization; ESI) 与离子阱(Ion trap)的质谱分析仪; ESI 采用正电荷电离模式; 离子进料毛细管温度 350 ℃; 毛细管电压 4.7 kV; 辅助气体(Auxiliary gas) 流速: 3 arbitrary units; 剥除溶剂气体(Sheath gas) 流速: 5 arbitrary units; 全扫描检测模式(Full scan mode) 100 ~ 2000 amu; 扫描宽度(m/z) 0.5; 扫描时间: 0.5 s; 电喷雾电压(Spray voltage): 5.0 kV; 所有的数据撷取与分析皆使用 Xcalibur software, v 2.0.7 软件。 2.8 二级质谱鉴定麦角固醇类与其衍生物 H1-A

使用 MS/MS 监控模式记录所有的 LC-MS/MS 数据。质谱分析仪的离子阱捕捉总离子(Total ion trapping) 和子离子(Daughter ions); 母离子(Parent ion) 选择通道 *m/z* 0.5 span 和离子阱通道开关延迟 0.02 s; 母离子麦角固醇和 H1-A 利用电场达分离; 以常态化碰撞能量(Normalized collision energy) 碰撞 母离子麦角固醇和 H1-A 以碎裂形成子离子; 所有的数据撷取与分析皆使用 Xcalibur software, v 2.0.7 软件; 成分结构与其片段的预测、模拟与分析则皆使用 Massfrontier 和 ChemBioDraw 软件。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 进行提取液中麦角固醇类的定性与定量分析

为建立最佳层析条件,对 HPLC 参数,包括流动相(甲醇-水或乙腈-水)、色谱柱(Hypersil Gold a Q column,(250 mm×4.6 mm,5 μ m); Hypersil GOLD C₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μ m); Hypersil GOLD C₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μ m); Hypersil Gold column(150 mm×4.6 mm,5 μ m); Lichrospher RP-18 endcapped column (250 mm×4.6 mm,5 μ m)、柱 温(30,35 或 40 °C)和流动相流速(0.5 ~ 1.0 mL/min)进行了考察。麦角固醇标准品浓度的线性范围 为2 ~ 1000 mg/L 麦角固醇标准品的 HPLC 保留时间为 24.6 ~ 24.9 min。麦角固醇的线性方程为 y = 29480x + 66130 相关系数(*R*)为0.9987,其中 y 为分析物的平均峰面积 x 是分析物的浓度。

HPLC 结果显示 ,Cs 子实体、Hsm RS6-3,Cm 和 Cs-4 的甲醇提取液中代谢产物的保留时间为 14 ~ 36 min(图1)。Cs 子座、Cs 菌核、Hsm RS6-3、Cm 和 Cs-4 甲醇提取液中麦角固醇的相对含量为 0.92, 0.30,3.60,0.04 和 2.15 g/L(图1);其中 Hsm RS6-3 的甲醇提取液中的麦角固醇含量最高 ,且 Cs 子座的甲醇提取液中的麦角固醇含量比为 Cs 菌核高约 3 倍(图1)。

3.2 甲醇提取液中的 H1-A 与其衍生物的鉴定

在全 LC-MS 扫描模式下 .Cm 和 Cs-4 的甲醇提取液均不含有 m/z 410.3 ±1 信号 .证实 Cm 和 Cs-4

不含 H1-A 及其衍生物; 但 Cs 子实体与 Hsm RS6-3 的甲醇提取液中可见的 H1-A 与其衍生物信号 *m/z* 410.3 ±1(图2)。Cs 子座的甲醇提取液中含有 2 个 H1-A 相关衍生物 JH-I 和 JH-2(即 *m/z* 411.35 和411.32)(表1) LC 保留时间约为 15.87 和 26.42 min(表1)。Hsm RS6-3 则含有 5 个 H1-A 相关衍生物 LC-I, LC-2, LC-3, LC-4和 LC-5(即 *m/z* 410.33, 410.97, 409.32, 410.63和 410.32表1) LC 保留时间约为16.83, 35.58, 40.18, 49.06和 55.67 min。



图 1 麦角固醇标准溶液,冬虫夏草子实体 Cs,中国 被毛孢菌丝体 Hsm RS6-3,蛹虫草 Cm 和蝙蝠娥拟青霉 Cs-4 菌的甲醇提取液成分的 HPLC 层析图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the components in methanol soluble fraction of ergosterol standard , *Cordyceps sinen*sis (Cs) fruiting bodies , *Hirsutella sinensis mycelium* RS6– 3 (Hsm RS6-3) , *C. militaris* (Cm) , and *Paecilomyces* hepialid (Cs-4)





Fig. 2 Total ion chromatograms (TIC) of the components in the methanol soluble fraction of ergosterol standard, stroma of *Cordyceps sinensis* (Cs), sclerotium of Cs, *Hirsutella sinensis mycelium* RS6-3 (Hsm RS6-3), *C. militaris* (Cm), and *Paecilomyces hepialid* (Cs-4)

表1 中国被毛孢菌丝体 Hsm RS6-3 或冬虫夏草 Cs 子座的麦角固醇或 H1-A 衍生物之 LC-MS 和 LC-MS/MS 鉴定 Table 1 Identification of derivatives of ergosterol or H1-A in Hsm RS6-3 or Stroma of Cs using LC-MS and LC-MS/MS

样品 Sample	目标成份 Compound	液相层析的保留时间 LC retention time(min)	一级质谱的母离子 LC-MSparent ion(<i>m/z</i>)	二级质谱的子离子 LC-MS/MS daughter ions(<i>m/z</i>)
麦角固醇 Ergosterol	S	54.55	379.2	364 ^a , 309 , 294 ^b , 239 ^c , 185
	LC-I	16.83	410.3	391, 339, 318, 254, 239°, 227
	LC-2	35.58	411.0	409,393,381,378,364 ^a ,352,328,255, 254,218
中国被毛狗菌丝体 BS6	LC-3	40.18	409.3	393 ,391 ,379 ,378 ,353 ,350 ,348 ,341 , 334 ,320 ,294 ^b ,286 ,254 ,191*
Hsm RS6-3	LC-4	49.06	410.6	392,353,352,342,341,339,299,298, 286,284,260,254,230,201,177,171
	LC-5	55.67	410.3	$395^{\rm d}$,393 ,368 ,364 $^{\rm a}$,362 ,355 ,329 ,328 , 298 ,286 ,284 ,273 ,270 ,258 ,254 ,231 , 217 ,202 ,191 $^{\rm s}$,188 ,178 ,174 ,160 ,159
冬虫夏草子座	JH-1	15.87	411.4	391 365° ,350 ,319
Stroma of Cs	JH-2	26.42	411.3	409 , 394^{d} , 351 , 286 , 256

注(Note): a, b, c: 指麦角固醇衍生物(Ergosterol derivative);*, d: H1-A 衍生物(HI-A derivative)。

麦角固醇标准品在 LC-MS/MS 分析中的保留时间约为 54.55 min(表 1)。在 ESI(+) 电离模式扫描下麦角固醇的母离子均为 $[M + H]^+(m/z 379.2 \pm 1)$,经 35% 常态化碰撞能量碰撞麦角固醇的母离子碎裂成子离子,其相对的麦角固醇子离子为 m/z 364,309,294,239 和 185(表 1、表 2 和图 3),每种成分的结构图见图 3。同样 在 ESI(+) 电离模式扫描下,依据 LC-MS/MS 结果,Cs 子座的甲醇提取液中含有的 2 个 H1-A 相关衍生物 JH-1 和 JH-2(表 1、图 4),二级质谱图显示其具有的主要片段为 $m/z 350 \pm 1$,其相对应的结构为(10R,13R) -17 - ((S,E) - hex -3 - en - 2 - ylium - 5 - yl) -10,13 -dimethyl-7 - oxo-2 3 A, 7 9,10,11,12,13,15,16,17 - dodecahydro -1 H - eyclopenta $[\alpha]$ phenanthren -3 - ylium(表 2、图 4); Hsm RS6-3的甲醇提取液中含有 5 个 H1-A 相关衍生物 LC-4, LC-2, LC-3, LC-4 和 LC-5(表 1,图 5), 二级质谱显示其具有相同的子离子($m/z 254 \pm 1$ 和 393 ± 2),其相对应的结构分别为(13S) -13 -methyl-9,10,11,12,

13 ,15 ,16 ,17-octahydro-1H-cyclopenta [α] phenanthren-7(2H) -one 和(3aR β R) -6-allyl-3-((2R β R ,E) -5 , 6-dimethylhept-3-en-2-yl) -3a β ,7-trimethyl-9-methylene-2 β 3a β ,5 a β ,9-octahydro-1H-cyclopenta [α] naphthalene(表 2, 图 5) 。



图 3 麦角固醇的液相层析二级质谱图与其结构

Fig. 3 LC-MS/MS spectra and structures of ergosterol 麦角固醇的母离子((S), m/z 379.2, $C_{28}H_{43}^{+}$)及其的子离子 (The ergosterol parent ion(S) signal m/z 379.2 ($C_{28}H_{43}^{+}$) and its daughter ions)。



序号 Number	二级质谱的子离子 LC-MS/MS daughter ions (<i>m/z</i>)	化学式 Chemical formula	化学名称 IUPAC name
1	185(100.0%), 186(15.3%), 187(1. 1%)	$C_{14}H_{17}^{3+}$	2-((8aR) -I -Metheylium-8a-methyl-I , 7 , 8 , 8a-tetra- hydronaphthalen-2-yl) ethen-I -ylium
2	239(100.0%),240(19.5%),241(1. 8%)	$C_{18}H_{23}$ +	(10R) –10–Methyl–2 3 A 9 ,10 ,11 ,14 ,15 ,16 ,17-decahydro– 1H-cyclopenta [a]phenanthren-3-ylium
3	294 (100.0%), 295 (24.1%), 296 (2. 8%)	$C_{22}H_{30}$.	(10R, J3R, J7R) -10, J3-Dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl) -2, 7, 9, J0, J1, J2, J3, J5, J6, J7-decahydro-1H-cyclopenta [a] phe- panthrene
4	309(100.0%), 310(25.3%), 311(3. 0%)	$C_{23}H_{33}$ +	(10R, 13R) -17-Allyl-3, 10, 13-trimethyl-2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a] phenan- threne
5	364(100.0%), 365(29.7%), 366(4. 2%)	${\rm C_{27}{H_{40}}^2}^+$	(13R, 17R) -17-((2R, 5R, E) -5, 6-Dimethylhept-3-en-2-yl) - 13-methyl-1, 2, 3, 4, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-dodecahydro- cyclopenta[a]phenanthrene-3, 10-diylium
6	318(100%), 319(24.3%), 320(3.0%)	$C_{22}H_{38}O$	1-((3R) -6-Isopropyl-3-methyl-3-((2S 5R ,E) -2 ,5 ,6-trime-thylhept-3-enyl) cyclohex-1-enyl) ethanone
7	350(100%),351(27.0%),352(3.8%)	$\rm C_{25}H_{34}O^{2+}$	(10R ,13R ,17R) -17-((R ,E) -Hex-3-en-2-ylium-5-yl) -10 , 13-dimethyl-7-oxo-2 3 A ,7 9 ,10 ,11 ,12 ,13 ,15 ,16 ,17-Do- decahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-3-ylium
8	365(100%), 366(29.2%), 367(4.2%)	C ₂₇ H ₄₁ O ⁺	2-((3R , 3aR) -3-((2R ,5R ,E) -5 ,6-Dimethylhept-3-en-2- yl) -3a ,7-dimethyl-9-methylene-2 ,3 ,3a ,4 ,5 ,5a ,6 ,9-octa- hydro-1 H-cyclopenta [a] naphthalen-6-yl) ethan-1-ylium
9	391(100%), 392(31.9%), 393(4.7%)	C ₂₉ H ₄₃ O ⁺	3-((3R 3aR 6R) -3-((2R 5R E) -5 6-Dimethylhept-3-en- 2-yl) -3a 6 7-trimethyl-9-methylene-2 3 3a 4 5 5a 6 9-oc- tahydro-1H-cyclopenta [a] naphthalen-6-yl) prop-1-en-1-ylium
10	254(100%),255(19.8%),256(2.0%)	$C_{18}H_{22}O$	(13S) –13-methyl-9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-Octahydro-1 H– cyclopenta [a] phenanthren-7 (2H) -one
11	286(100%),287(20.9%),288(2.5%)	$C_{19}H_{26}O_2$	(35,10R,135) -3-hydroxy-10,13-Dimethyl-3,4,9,10,11, 12,13,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7 (2H) – one
12	394(100%), 395(30.8%), 396(4.8%)	$C_{28}H_{42}O$	(10R , 13R , 17R) -10 , 13-Dimethyl-7-methylene-17-((2R , 5R ,E) -5-methylhept-3-en-2-yl) -2 ,3 ,4 ,7 ,9 ,10 ,11 ,12 ,13 , 15 ,16 ,17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a]phenant hren-3-ol
13	409(100%),410(30.4%),411(4.6%)	$C_{28}H_{41}O_2$ +	(2R, E) -2-((10R, 13R, 17R) -3-Hydroxy-10, 13-dimethyl-7- oxo-2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-ey- clopenta [a] phenanthren-17-yl) -5, 6-dimethylhept-4-en-3-yli- um
14	339(100%), 340(25.3%), 341(3.5%)	$C_{23}H_{31}O_2$ +	(3R) -3-((13R, 17R) -3-Hydroxy-10, 13-dimethyl-7-oxo-2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-Dodecahydro-1H-eyclopenta [a]phenanthren-17-yl) but-1-en-1-ylium
15	218(100.0%),219(15.2%),220(1. 1%)	$C_{14}H_{18}O_2^{2+}$	(Z) -2-((8aR) -6-Hydroxy-1 -metheylium-8a-methyl-3-oxo-6, 7 & &a-tetrahydronaphthalen-2(1H 3H 5H) -ylidene) ethan- 1-ylium
16	327 (100.0%), 328 (24.2%), 329 (3. 2%)	$C_{22}H_{31}O_2$ +	(3S,10R,13R,17R) -3-Hydroxy-17-isopropyl-10,13-dimeth- yl-3,4,9,10,11,12,13,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta [a]phenanthren-7(2H) - one

续表1(Continued to Table 1)

序号 Number	二级质谱的子离子 LC-MS/MS daughter ions (<i>m/z</i>)	化学式 Chemical formula	化学名称 IUPAC name
17	350(100.0%), 351(27.0%), 352(3. 8%)	$C_{25}H_{34}O^{2+}$	(10R, 13R, 17R) -17-((R, E) -Hex-3-en-2-ylium-5-yl) -10, 13-dimethyl-7-oxo-2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-do- decahydro-1H-cyclopenta [a]phenanthren-3-ylium
18	:381(100.0%),382(29.7%),383(4. 3%)	C ₂₇ H ₄₁ O ⁺	2-((3aR ,6R) -3-((2R ,5R ,E) -5 ,6-Dimethylhept-3-en-2- yl) -3a 6 ,7-trimethyl-9-oxo-2 ,3 ,3a ,4 ,5 ,5a ,6 ,9-Octahydro- 1H-cyclopenta [a] naphthalen-6-yl) ethan-1-ylium
19	409(100.0%),410(30.4%),411(4. 6%)	$C_{28}H_{41}O_2$ +	(2R, E) -2-((10R, 13R, 17R) -3-Hydroxy-10, 13-dimethyl-7- oxo-2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cy- clopenta [a] phenanthren-17-yl) -5, 6-dimethylhept-4-en-3-yli- um
20	191 (100.0%), 192 (13.2%), 193 (1. 2%)	$C_{12}H_{15}O_2^{+}$	(6S &aR) -6-hydroxy-8a-methyl-1-methylene-3-oxo-1 2 3 A , 6 7 8 &a-octahydronaphthalen-2-ylium
21	294 (100. 0%) , 295 (24. 1%) , 296 (2. 8%)	$C_{22}H_{30}$	(10R ,13R ,17R) +0 ,13-Dimethyl+17-(prop-1-en-2-yl) -2 ,7 , 9 ,10 ,11 ,12 ,13 ,15 ,16 ,17-decahydro-1 H-cyclopenta [a] phe- nanthrene
22	341(100.0%), 342(25.3%), 343(3.4%)	$C_{23}H_{33}O_2$ +	(3R) -3-((10R , 13R , 17R) -3-Hydroxy-40 , 13-dimethyl-7- oxo-2 ,3 ,4 ,7 ,9 ,10 ,11 ,12 ,13 ,15 ,16 ,17-Dodecahydro-1 H- cyclopenta [a] phenanthren-17-yl) butan-1-ylium
23	379(100%), 380(30.8%), 381(4.4%)	$C_{28}H_{43}$ +	(10R, 13R, 17R) –17-((2R, 5R, E) –5, 6-Dimethylhept-3-en- 2-yl) –10, 13-dimethyl-2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17- dodecahydro-1H-cyclopenta [a]phenanthren-3-ylium
24	171(100.0%), 172(14.2%)	C ₁₃ H ₁₅ +	(R) -2-(8a-Methyl-I ,7 ,8 ,8a-tetrahydronaphthalen-2-yl) ethen-I -ylium
25	230(100.0%) , $231(18.7%)$, $232(1.6%)$	$C_{17} H_{26}$	($8aR$) –1–Isopentyl-8a-methyl-3–methylene–1 $\ ,2$,3 ,7 ,8 ,8a–hexahydronaphthalene
26	260 (100. 0%) , 261 (20. 5%) , 262 (2. 1%)	$C_{19}H_{32}$	(3R 3aR) -3-((2R 5S E) -5 6-Dimethylhept-3-en-2-yl) -3a- methyl-2 3 3a 4 5 6-hexahydro-1 H-indene
27	299 (100.0%) ,300 (23.1%) ,301 (2.7%)	C ₂₁ H ₃₁ O ⁺	1-((10R, 13R, 17S) -3-Hydroxy-10, 13-dimethyl-2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-H-cyclopenta [a] phenanthren-17-yl) ethan-1-ylium
28	188(100.0%),189(14.1%)	$C_{13}H_{16}O$	(E) -3-Propylidene-4 ,4a ,5 ,6-tetrahydronaphthalen-2 (3H) -
29	190(100.0%),191(15.4%),192(1.1%)	$\mathrm{C}_{14}\mathrm{H}_{22}$	(*8aR) -8a-Methyl-2-propyl-1 2 3 ,7 8 8a-hexahydronaphtha- lene
30	270(100.0%), 271(20.9%), 272(2. 1%)	$C_{19}H_{26}O^{2+}$	(38,10R,138)-3-Hydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,7,9,10, 11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenan- threne-7,17-diylium
31	354(100.0%), 355(27.5%), 356(3. 8%)	$C_{25}H_{38}O$	(3R 3aR) -3-((E) -5 β -Dimethylhept-4-en-2-yl) -3a $\beta \beta$ -trimethyl-3 3a β 5 5a β -hexahydro-1 H-cyclopenta [a] naphtha-len-9(2H) -one
32	368 (100.0%), 369 (28.6%), 370 (4. 0%)	$C_{26}H_{40}O$	(3R ,3aR ,6S) -3-((E) -5 ,6-Dimethylhept-3-en-2-yl) -6-eth- yl-3a ,6-dimethyl-3 ,3a ,4 ,5 ,5a ,6-hexahydro-1H-cyclopenta [a] naphthalen-9(2H) -one



图 4 冬虫夏草 Cs 子座的 JH-1(A) 和 JH-2(B) 的液相层析二级质谱图与其结构

Fig. 4 LC-MS/MS spectra and structures of JH-1(A) and JH-2(B) obtaining from stroma of Cs A: H1-A 衍生物 JH-1 的母离子 m/z 411. 35($C_{28}H_{42}O_2$) 的子离子; B: H1-A 衍生物 JH-2 的母离子 m/z 411. 32($C_{28}H_{42}O_2$) 的子离子。A: JH-1 parent ion (m/z 411. 35, $C_{28}H_{42}O_2$) and its daughter ions can be obtained; B: JH-2 parent ion (m/z 411. 32, $C_{28}H_{42}O_2$) and its daughter ions.



图 5 中国被毛孢 Hsm RS6-3 的 LC-1 (A), LC-2 (B), LC-3 (C), LC-4 (D) 和 LC-5 (E) 的液相层析二 级质谱图与其结构

Fig. 5 LC-MS/MS spectra and the structures of LC-1 (A) , LC-2 (B) , LC-3 (C) , LC-4 (D) and LC-5 (E) obtaining from Hsm RS6-3

A: H1-A 衍生物 LC-1 的母离子(m/z 410.33 ±1 C_{28} H₄₂O₂)及其子离子; B: H1-A 衍生物 LC-2 的母离子(m/z 410.97, C_{28} H₄₂O₂)及其子离子; C: H1-A 衍生物 LC-3 的母离子(m/z 409.32, C_{28} H₄₁O₂⁺)及其子离子; D: H1-A 衍生物 LC-4 的母离子(m/z 410.63, C_{17} H₂₆)及其子离子; E: H1-A 衍生物 LC-5 的母离子(m/z 410.32, C_{28} H₃₈O)及其子离子。A: LC-4 parent ion (m/z 410.33, C_{28} H₄₂O₂) and its daughter ions; B: LC-2 parent ion (m/z 410.97, C_{28} H₄₂O₂) and its daughter ions; C: LC-3 parent ion (m/z 409.32, C_{28} H₄₁O₂⁺) and its daughter ions; C: LC-4 parent ion (m/z 410.63, C_{17} H₂₆) and its daughter ions; E: LC-5 parent ion (m/z 410.32, C_{28} H₄₁O₂⁺) and its daughter ions.

4 结 论

本研究表明。Cm和Cs-4的甲醇提取液均不含有H1-A相关衍生物,但Cs子实体与本实验室所分离的HsmRS6-3甲醇提取液含有7个分子量相似的H1-A相关衍生物,它们的母离子为m/z410±1;二级质谱显示,HsmRS6-3甲醇提取液中含有H1-A相关衍生物LC-3和LC-5,具有与麦角固醇标准品相同的子离子(m/z294和364)外,彼此具有相同的子离子(m/z191和395),且子离子m/z191和395已经文献^[9,10]鉴定证实为H1-A的子离子,因此证实LC-3和LC-5可以是麦角固醇与H1-A的相关衍生物。其它成分,如LC-4和LC-2也具有与H1-A相同的母离子与分子量(m/z410±1),且具有与麦角固醇标准品相同的子离子(m/z239和364)因此证实LC-4和LC-2也可以是麦角固醇与H1-A的相关衍生物。

建立了 HPLC 和 LC-MS/MS 分析 Cs 及 Hsm RS6-3 的二次代谢物的方法,可用于评估虫草相关产品 的真伪及质量。此外,由于 LC-MS/MS 比较分析结果和 Massfrontier 及 ChemBioDraw 软件的仿真片段吻 合较好,发现了7种 H1-A 相关衍生物,将对这些化合物进行纯化与分析,以了解它们化学结构及药理 特性。

致谢 屏东科技大学活性天然物技术研发中心(Research Center for Bioactive Products, National Pingtung University of Science and Technology) 提供 HPLC 和 LC-ESI-MS/MS 仪器协助研究。

References

- 1 Kingjo N , Zang M. Mycoscience , 2001 , 42(6): 567 ~ 574
- 2 Li S P , Yang F Q , Tsim K W. J. Pharm. Biomed. Anal. , 2006 , 41(5): 1571 ~ 1584
- 3 ZANG Mu KINJO Noriko(臧穆, 金城典子). Acta Botanica Yunnanica(云南植物研究), 1996, 18(2): 205~208
- 4 CHENChih-Shang, HSEU Ruey-Shyang(陈志升, 许瑞祥). J. Chin. Agric. Chem. Soc. (中国农业化学杂志), 1999, 37(4): 533~545
- 5 Hseu R S , Chen C S. U. S. Patent , 6251606 , 2001
- 6 CHEN Chih-Shang, HSEU Ruey-Shyang(陈志升,许瑞祥). Taiwanese J. Agric. Chem. Food Sci. (台湾农业化学与食品科学), 2002, 40(4): 219~225
- 7 DENG Yue-Yi, CHEN Yi-Ping, HE Xue-Lin, LI Li(邓跃毅,陈以平,贺学林,李莉). Chinese J. Integr. Tradit. West Nephrol. (中国中西医结合肾病杂志), 2001, 2(7): 381~383
- 8 Ng T B , Wang H X. J. Pharm. Pharmacol. , 2005 , 57(12): 1509 ~ 1519
- 9 Lin C Y , Ku F M , Kuo Y C , Chen C F , Chen W P , Chen A , Shiao M S. J. Lab Clin. Med. , 1999 , 133(1): 55 ~63
- 10 Yang L Y , Chen A , Kuo Y C , Lin C Y. J. Lab. Clin. Med. , 1999 , 134(5): 492 ~ 500

Determination of Ergosterol and Its Derivatives in *Cordyceps Sinensis*associated Products by High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

CHEN Lin-Cheng¹, HSEU Ruey-Shyang¹, GUO Jia-Hsin^{* 2}

¹ (Department of Biochemical Science and Technology, College of Life Science, Taiwan University, Taipei 10617) ² (Department of Food Science, College of Agriculture,

Pingtung University of Science & Technology, Pingtung 91201)

Abstract Current research uses HPLC and LC-MS to investigate ergosterol and its derivatives contained in a *Cordyceps sinensis* (Cs) fruiting body obtained from Tibet , an anamorphic *Hirsutella sinensis mycelium* (Hsm) strain RS6-3 isolated from Cs by our laboratory , and some Cs-associated products , such as *Cordyceps militaris* (Cm) and *Paecilomyces hepialid* (Cs-4). Results indicated that the ergosterol in the Cs stroma was approx. 0.92 g/L , or about 3 times higher than that found in the sclerotium. The Cs stroma contained 2 kinds of H1-A derivatives , while the Hsm RS6-3 contained 5 kinds of H1-A derivatives , which were different from those found in the Cs sclerotium. No H1-A derivative was found in Cs sclerotium , Cm or Cs-4. The results of this investigation may provide a technical foundation for assessing the quality of Cs-associated products. **Keywords** *Cordyceps sinensis*; *Hirsutella sinensis*; *Cordyceps militaris*; *Paecilomyces hepiali*;

Ergosterol derivatives; High performance liquid chromatography; Liquid chromatography-mass spectrometry (Received 13 February 2011; accepted 27 May 2011)