

基于 GC-MS 代谢组学技术比较冬虫夏草与蝉花的质量

张剑霜^{1,2}, 喻浩^{2,3}, 钟欣², 张古忍², 刘昕^{2*}

(1. 贵州师范大学生命科学院, 贵阳 550025; 2. 中山大学生命科学院, 广州 510275;
3. 贵州师范学院化学与生命科学院, 贵阳 550018)

[摘要] 目的: 基于气相色谱-质谱(GC-MS)代谢组学分析方法探究冬虫夏草和蝉花的代谢物组成特征, 为冬虫夏草的品质评价提供理论依据。方法: 采用GC-MS测定冬虫夏草和蝉花的50%甲醇提取物, 结合NIST和GMD数据库进行代谢物结构鉴定, 分别采用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)考察样品分类情况、筛选差异代谢物。结果: 从冬虫夏草和蝉花中共鉴定得到64种代谢物, 主要包括氨基酸及其衍生物类、糖醇类、有机酸类和脂肪酸类等。PCA结果显示冬虫夏草与蝉花样品根据代谢物特征完全区分, 表明二者化学组成差异较大; 采用PLS-DA筛选获得导致2种样品区分的差异代谢物共21种, 其中冬虫夏草含有更多的D-甘露醇、海藻糖、脯氨酸、焦谷氨酸等, 而蝉花中肌醇和γ-氨基丁酸、鸟氨酸、苏氨酸等代谢物的含量更高。结论: 冬虫夏草和蝉花的化学成分差异较大, 蝉花不适合替代冬虫夏草使用。

[关键词] 冬虫夏草; 蝉花; 气相色谱-质谱; 代谢组学; 氨基酸; 主成分分析; D-甘露醇

[中图分类号] R22; R969.1; R282; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0023-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181707

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180613.1202.002.html>

[网络出版时间] 2018-06-13 17:16

Comparison of Quality of *Ophiocordyceps sinensis* and *Isaria cicadae* Based on GC-MS Metabonomics

ZHANG Jian-shuang^{1,2}, YU Hao^{2,3}, ZHONG Xin², ZHANG Gu-ren², LIU Xin^{2*}

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. College of Chemistry and Life Sciences, Guizhou Education University, Guiyang 550018, China)

[Abstract] **Objective:** To explore composition of metabolites of *Ophiocordyceps sinensis* and *Isaria cicadae* by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabonomics, in order to provide scientific basis for quality control of *O. sinensis*. **Method:** Samples were extracted by 50% methanol and then were subjected to GC-MS analysis. Metabolites were identified by NIST and GMD databases. Principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were applied to explore sample classification and screen metabolites which contributed to discrimination, respectively. **Result:** A total of 64 metabolites were identified from all samples, mainly including amino acids and their derivatives, sugars alcohols, organic acids, fatty acids and others. PCA results showed clear separation of *O. sinensis* and *I. cicadae*, indicating that the metabolic characterization between those two samples was significantly different. Furthermore, 21 metabolites responsible for discrimination were screened out. The contents of D-mannitol, trehalose, proline and pyroglutamic acid were

[收稿日期] 20180131(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31300427, 31702006); 广东省自然科学基金项目(2014A030313121); 广东省省级科技计划项目(2015A020210047)

[第一作者] 张剑霜, 博士, 讲师, 从事微生物药物资源开发利用与质量评价研究, Tel: 0851-83227351, E-mail: assassin1986@126.com

[通信作者] *刘昕, 教授, 博士生导师, 从事微生物药物工程与生物技术研究, Tel: 020-84114495, E-mail: lsslx@mail.sysu.edu.cn

significant higher in *O. sinensis*. Whereas, other compounds, including *myo*-inositol, γ -aminobutyric acid, ornithine and threonine showed higher values in *I. cicadae*. **Conclusion:** The chemical composition of *O. sinensis* and *I. cicadae* differs greatly, which suggesting that *I. cicadae* can not be used as alternative of *O. sinensis*.

[Key words] *Ophiocordyceps sinensis*; *Isaria cicadae*; gas chromatography-mass spectrometry; metabolomics; amino acids; principal component analysis; *D*-mannitol

冬虫夏草是一种虫生子囊真菌寄生于钩蝠蛾属昆虫幼虫后所形成的虫菌复合体^[1],为青藏高原地区特色名贵滋补中药材。现代药理学研究结果显示,冬虫夏草具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎症、抗高血糖、抗凋亡、抗氧化、缓解肾衰竭、调节肝脏功能和治疗心血管疾病等多方面的药理功效^[2-3]。蝉花俗称金蝉花,是一种寄生在蝉科昆虫若虫的虫生真菌^[4]。在甄权所著《药性论》与李时珍所著《本草纲目》中均记载了蝉花的药性功效,称其“味甘寒,无毒。主小儿天吊,惊痫,夜啼心悸”。时至今日,蝉花仍然被广泛应用于医疗保健方面,是许多中药方剂或滋补药膳中的常见药材,用于强身健体、防治疾病。现代药理学研究表明,蝉花在免疫调节、改善肾功能、抗肿瘤、抗疲劳、抗衰老、解热镇痛和镇静催眠等方面作用显著^[5-6]。

冬虫夏草和蝉花均是我国传统名贵中药材,由于近年来冬虫夏草资源的过度采挖以及市场价格不断飙升,研究者提出可用蝉花作为冬虫夏草替代品用于疾病治疗,尤其是在治疗慢性肾功能衰竭方面,蝉花具有与冬虫夏草相似的功效^[7-8]。目前已从冬虫夏草中发现多种具有药理活性的化合物,如核苷类、甾醇类、多糖类成分^[9-10],但关于冬虫夏草药效指标物质尚无定论。迄今为止,冬虫夏草质量评价多采用2015年版《中国药典》(一部)中规定的腺苷测定法^[11]。然而,大量研究结果表明,腺苷广泛存在于多种虫草属真菌^[12-14],因此以该物质作为冬虫夏草指标性成分仍值得商榷。由于冬虫夏草所含化学成分复杂和药效成分不明确等特点,采用单个或多个指标成分测定法均不足以全面评价该药材质量。代谢组学技术是一种基于高分辨率和高通量检测平台对样本中化学组成进行全面分析的方法,该技术为中药质量控制提供了一种新思路^[15],目前已用于人参^[16]、黄芪^[17]、玄参^[18]等多种中药材的质量评价研究。本实验采用GC-MS代谢组学技术对冬虫夏草和蝉花的化学成分特征进行全面比较,以期从整体代谢物层面分析这2种药材的相似性和差异性,为这2种药材能否在临床中替代使用提供理论依据。

1 材料

7890A-5975C型气相色谱质谱联用仪(美国Agilent公司),Simplicity型超纯水系统(美国Millipore公司),DC-12H型氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司),5415R型冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司),DK-8D型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),BP211D型精密电子分析天平(德国Sartorius公司)。

核糖醇对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号BCDJ6567V,纯度>99.0%),*N*,*O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA,美国Supelco公司),甲醇、正己烷和吡啶为色谱纯,其他试剂均为分析纯。冬虫夏草收集自西藏自治区那曲市比如县,蝉花购自广州市中药材市场(产地为浙江省天目山),2种药材均经中山大学青藏高原研究团队刘昕教授和张古忍教授鉴定分别为线虫草科真菌冬虫夏草*Ophiocordyceps sinensis*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、虫草科真菌蝉花*Isaria cicadae*寄生在蝉科幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件 DB-5MS毛细管柱(0.25 mm×30 m,0.25 μ m),载气为氦气,流速1 mL·min⁻¹。气相色谱升温程序为起始85 $^{\circ}$ C(保持3 min),以5 $^{\circ}$ C·min⁻¹的速度至285 $^{\circ}$ C,以20 $^{\circ}$ C·min⁻¹的速度至310 $^{\circ}$ C(保持7 min)。进样量1 μ L,离子源温度250 $^{\circ}$ C,溶剂延迟5.3 min,质荷比检测范围*m/z* 33~550,检测器电压1.7 kV,电离方式为电子轰击电离(EI),电子能量70 eV。

2.2 供试品溶液的制备 取冬虫夏草和蝉花样品,快速研磨成粉末状(过50目筛),称量样品粉末50 mg于10 mL具塞玻璃试管中,加入0.4 g·L⁻¹内标核糖醇100 μ L,加入50%甲醇2 mL,短暂涡旋混匀后超声辅助提取60 min,3 500 r·min⁻¹离心10 min,吸取上清液至5 mL具塞玻璃管中,-20 $^{\circ}$ C保存备用,所有样本重复6次。精密吸取样品200 μ L,于氮吹仪上50 $^{\circ}$ C吹干溶剂,加入20 g·L⁻¹甲氧胺盐酸盐80 μ L,于温度37 $^{\circ}$ C,转速

100 r·min⁻¹ 反应 120 min; 加入 BSTFA 50 μL, 于 37 °C, 100 r·min⁻¹ 下反应 60 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 精密吸取 100 μL 用于 GC-MS 分析。

2.3 数据处理与分析 原始数据经 MSD ChemStation 软件进行峰平滑、去噪和基线校正处理, 导入 AMDIS 软件进行重叠峰识别和解卷积分析(参数设置为 component width = 12, adjacent peak subtraction = 1, medium shape requirement, 分辨率中, 灵敏度中), 处理完成后生成后缀名为 ELU 和 FIN 的 2 个文件, 将 ELU 格式文件导入至在线分析平台 SpectConnect(<http://spectconnect.mit.edu>) 进行峰滤噪、峰对齐与峰特征提取运算, 完成后获得由峰序列号(与保留时间、质荷比相对应), 检测样本及峰强度组成的三维矩阵, 数据经内标归一化后用于多元统计分析^[19]。将代谢物质谱图与美国国家标准与技术研究院(NIST)11 版数据库(NIST MS Search 2.0)和格勒姆代谢组数据库(GMD, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) 搜索匹配, 进行化合物的结构鉴定, 匹配度 > 800 和匹配概率 > 80% 时推断为目标化合物。

将预处理后的数据导入 SIMCA-P 13.0 软件进行多元统计分析, 采用中心化换算法进行数据标度换算, 以减小样品间浓度差异。采用主成分分析(PCA)对数据进行降维处理, 初步观察样品聚集离散情况; 采用偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)筛选导致样品聚集或离散的差异性变量; 采用 Statistica 10.0 软件进行曼-惠特尼 *U* 检验(Mann-Whitney *U* test), 以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性影响。

2.4 冬虫夏草与蝉花中的代谢物指认 冬虫夏草与蝉花的 50% 甲醇提取物 GC-MS 总离子色谱图见图 1, 出峰时间集中在 7 ~ 32 min 和 38 ~ 45 min。直观比较发现, 2 种药材主要色谱峰构成相似, 蝉花色谱峰总数较冬虫夏草更多, 但主要色谱峰强度与冬虫夏草有所区别。以保留时间和质谱数据为参照对所有样品色谱图进行峰对齐处理, 通过将化合物质谱数据与数据库匹配共指认出 64 种代谢物, 见表 1。冬虫夏草和蝉花代谢物种类分别为 47 种和 60 种, 二者共有成分为 43 种。表明冬虫夏草与蝉花中主要代谢物种类组成较一致。已鉴定的共有成分主要为初级代谢产物, 包括氨基酸及其衍生物类、糖醇类、有机酸类和脂肪酸等。对已定性的 64 种代谢物含量进行单因素统计检验结果显示, 其中 57 种成分的含量在组间差异显著(*P* < 0.05)。冬虫夏草中含有更多的 *D*-甘露醇、海藻糖、焦谷氨酸、脯氨

酸、苯丙氨酸等, 而蝉花中丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、鸟氨酸、肌醇和 γ -氨基丁酸等成分含量更高。

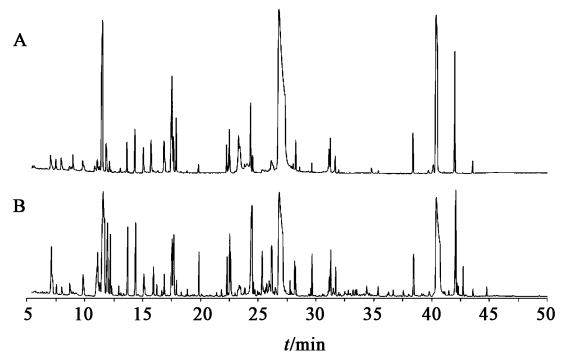


图 1 冬虫夏草(A)和蝉花(B)提取物的 GC-MS 总离子流
Fig. 1 GC-MS total ion currents of extracts of *Ophiocordyceps sinensis* (A) and *Isaria cicadae* (B)

2.5 冬虫夏草与蝉花差异代谢物分析 PCA 得分图显示冬虫夏草与蝉花聚集为两大类, 在第 1 主成分(PC1)轴完全分离, 第 2 主成分(PC2)轴分离趋势较小, 其中 PC1 与 PC2 累积提取总变量信息的 87.5%, 见图 2。PCA 分析结果表明 2 种样品在整体代谢物特征上差异较大, 同一类样品内部之间化合物组成较一致。根据 PCA 载荷散点图可初步观察对样品间区分起重要作用的变量因子, 离中心点越远的变量贡献率越大。为了进一步寻找导致蝉花与冬虫夏草区分的原因, 采用了有监督模式识别的 PLS-DA 以变量重要性为依据进行差异代谢物筛选, PLS-DA 得分图对样品的分类结果与主成分结果一致, 冬虫夏草和蝉花完全区分, 拟合模型对 *X* 矩阵解释率(R^2X), 对 *Y* 矩阵解释率(R^2Y)和预测能力值(Q^2)分别为 0.936, 0.997 与 0.98, 表明模型拟合度和预测能力均较好, 见图 2。以变量重要性投影(VIP)值 > 1 和曼-惠特尼 *U* 检验 *P* < 0.05 为条件共筛选获得 21 种差异代谢物, 见表 2, 大部分差异代谢物为氨基酸类和糖醇类, 这些差异代谢物可作为冬虫夏草和蝉花品质鉴别的潜在化学标志物。

3 讨论

本研究采用 GC-MS 代谢组学技术对冬虫夏草和蝉花代谢物整体特征进行分析, 共鉴定得到 64 种化学成分, PCA 和 PLS-DA 结果均能实现 2 种药材的完全区分, 表明二者化学组成差异较大, 提示临床治疗中 2 种药材应区别使用。在前期研究中对冬虫夏草和蝉花的部分活性成分进行了测定, 结果显示 2 种样品均含有腺苷、肌苷、胞苷、多糖等成分, 并且这些活性成分的含量无明显区别, 与前人报道相一致^[20]。然而, 当从全局角度关注代谢物时, 可发现

表 1 冬虫夏草和蝉花提取物的代谢物鉴定

Table 1 Identification of primary metabolites in *O. sinensis* and *I. cicadae* extracts

No.	t_R /min	代谢物	相对质量分数($\bar{x} \pm s, n=6$)/%	
			冬虫夏草	蝉花
1	6.18	乳酸 lactic acid ¹⁾	0.021 ± 0.001	0.015 ± 0.001
2	6.36	己酸 hexanoic acid ¹⁾	-	0.021 ± 0.003
3	7.10	丙氨酸 alanine ¹⁾	0.468 ± 0.033	1.163 ± 0.132
4	9.00	磷酸单甲酯 monomethyl phosphate ¹⁾	0.319 ± 0.033	0.030 ± 0.003
5	9.60	β -氨基异丁酸 β -amino isobutyric acid ¹⁾	0.010 ± 0.006	-
6	9.85	缬氨酸 valine ¹⁾	0.350 ± 0.016	0.585 ± 0.074
7	9.92	2-(异丙基氨基)乙醇 2-(isopropylamino) ethanol ¹⁾	0.153 ± 0.009	-
8	11.05	尿素 urea ¹⁾	-	0.727 ± 0.190
9	11.08	乙醇胺 ethanolamine	0.309 ± 0.018	0.292 ± 0.172
10	11.26	亮氨酸 leucine	0.100 ± 0.008	0.142 ± 0.078
11	11.54	磷酸 phosphoric acid ¹⁾	4.405 ± 0.646	2.290 ± 0.717
12	11.56	丙三醇 glycerol ¹⁾	1.770 ± 0.129	3.991 ± 0.416
13	11.88	脯氨酸 proline ¹⁾	0.567 ± 0.190	0.351 ± 0.124
14	11.93	异亮氨酸 isoleucine ¹⁾	-	0.107 ± 0.033
15	12.21	甘氨酸 glycine ¹⁾	0.231 ± 0.024	1.093 ± 0.076
16	12.31	丁二酸 succinic acid ¹⁾	0.043 ± 0.003	0.132 ± 0.005
17	12.92	甘油酸 glyceric acid ¹⁾	0.019 ± 0.001	0.172 ± 0.009
18	13.00	尿嘧啶 uracil ¹⁾	0.010 ± 0.002	0.015 ± 0.002
19	13.11	延胡索酸 fumaric acid ¹⁾	0.083 ± 0.006	0.052 ± 0.004
20	13.35	壬酸 nonanoic acid ¹⁾	0.019 ± 0.009	0.042 ± 0.009
21	13.70	丝氨酸 serine ¹⁾	0.838 ± 0.058	1.338 ± 0.198
22	14.39	苏氨酸 threonine ¹⁾	0.804 ± 0.020	1.381 ± 0.140
23	15.07	天冬氨酸 aspartic acid	0.996 ± 0.016	0.837 ± 0.266
24	15.17	β -丙氨酸 β -alanine ¹⁾	-	0.083 ± 0.023
25	15.87	高丝氨酸 homoserine ¹⁾	0.003 ± 0.001	0.011 ± 0.003
26	16.36	氨基丙二酸 aminomalonic acid ¹⁾	0.029 ± 0.004	0.010 ± 0.002
27	16.87	苹果酸 malic acid ¹⁾	0.831 ± 0.065	0.378 ± 0.022
28	17.50	哌啶酸 pipercolinic acid ¹⁾	-	0.067 ± 0.008
29	17.57	焦谷氨酸 pyroglutamic acid ¹⁾	2.888 ± 0.252	1.734 ± 0.101
30	17.70	γ -氨基丁酸 γ -aminobutyric acid ¹⁾	0.229 ± 0.023	0.857 ± 0.120
31	17.93	苯丙氨酸 phenylalanine ¹⁾	0.356 ± 0.044	0.168 ± 0.083
32	18.35	苏糖酸 threonic acid ¹⁾	0.014 ± 0.001	0.051 ± 0.003
33	18.83	2-羟基-戊二酸 2-hydroxyglutaric acid ¹⁾	0.030 ± 0.003	-
34	19.82	谷氨酸 glutamic acid	0.048 ± 0.011	0.305 ± 0.237
35	19.83	amino-pentanoate ¹⁾	0.105 ± 0.018	-
36	20.08	4-羟基苯乙酸 4-hydroxyphenylacetic acid ¹⁾	-	0.031 ± 0.001
37	20.54	L-酒石酸 L-tartaric acid ¹⁾	-	0.014 ± 0.001
38	21.39	辛二酸 suberic acid ¹⁾	-	0.042 ± 0.002
39	22.30	腐胺 putrescine	0.577 ± 0.106	0.639 ± 0.079

续表 1

No.	t_R /min	代谢物	相对质量分数/%	
			冬虫夏草	蝉花
40	22.55	鸟氨酸 ornithine ¹⁾	0.032 ± 0.019	0.528 ± 0.187
41	22.68	反式乌头酸 <i>trans</i> -aconitic acid ¹⁾	-	0.064 ± 0.015
42	23.24	phosphoric acid, propyl ester ¹⁾	0.579 ± 0.091	0.089 ± 0.007
43	23.48	壬二酸 nonadioic acid ¹⁾	-	0.117 ± 0.017
44	23.84	<i>D</i> -allofuranose	0.098 ± 0.015	0.110 ± 0.009
45	24.07	原儿茶酸 protocatechuic acid ¹⁾	-	0.010 ± 0.002
46	24.44	柠檬酸 citric acid ¹⁾	2.299 ± 0.213	4.804 ± 0.397
47	25.34	酪氨酸 tyrosine ¹⁾	0.156 ± 0.063	1.104 ± 0.216
48	25.64	<i>D</i> -fructose, <i>O</i> -methyloxime ¹⁾	0.069 ± 0.016	0.144 ± 0.008
49	25.73	葡萄糖酸- δ -内酯 gluconic acid- δ -lactone ¹⁾	-	0.201 ± 0.037
50	26.18	葡萄糖 glucose ¹⁾	0.452 ± 0.051	1.658 ± 0.151
51	26.83	<i>D</i> -甘露醇 <i>D</i> -mannitol ¹⁾	12.160 ± 0.581	8.038 ± 0.475
52	27.76	β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖 β - <i>D</i> -glucopyranose ¹⁾	-	0.125 ± 0.071
53	27.87	棕榈油酸 9-hexadecenoic acid ¹⁾	0.024 ± 0.002	0.042 ± 0.014
54	28.16	葡萄糖酸 gluconic acid ¹⁾	-	0.572 ± 0.041
55	28.25	棕榈酸 palmitic acid	0.530 ± 0.033	0.493 ± 0.034
56	29.54	<i>N</i> -乙酰- <i>D</i> -葡萄糖胺 <i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine ¹⁾	-	0.110 ± 0.014
57	29.66	肌醇 <i>myo</i> -inositol ¹⁾	0.147 ± 0.004	0.705 ± 0.034
58	29.97	十七烷酸 margaric acid ¹⁾	-	0.011 ± 0.002
59	31.13	亚油酸 linoleic acid ¹⁾	0.439 ± 0.019	0.349 ± 0.047
60	31.23	油酸 oleic acid ¹⁾	0.595 ± 0.034	0.917 ± 0.051
61	31.67	硬脂酸 stearic acid ¹⁾	0.423 ± 0.110	0.580 ± 0.041
62	35.38	尿苷 uridine ¹⁾	-	0.161 ± 0.030
63	40.39	海藻糖 trehalose ¹⁾	10.127 ± 1.117	7.049 ± 0.489
64	42.69	麦芽糖醇 maltitol ¹⁾	0.010 ± 0.002	0.510 ± 0.029

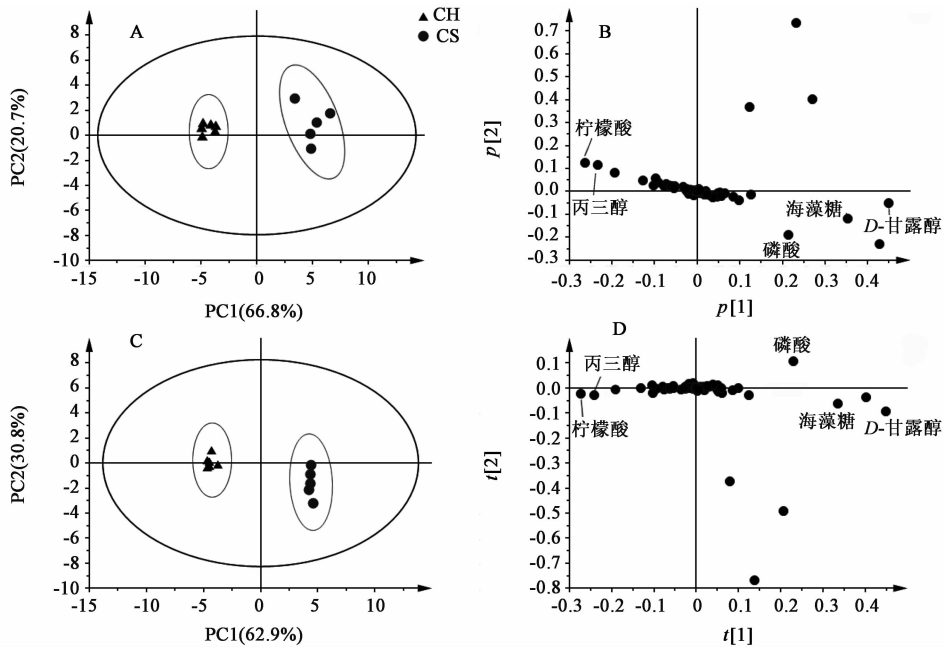
注: ¹⁾曼-惠特尼 *U* 检验 $P < 0.05$ 。

冬虫夏草与蝉花整体代谢物特征的差异,但同样也有许多共同之处,例如二者主要代谢物种类相似,包括 *D*-甘露醇、海藻糖等。冬虫夏草和蝉花同属于虫生真菌,均是由真菌寄生昆虫后并以虫体为营养发育形成的虫菌复合体,具有相似的生活史和形成方式,这可能是两者之间代谢物组成相似性与差异性并存的原因之一。

遗传因素与环境因素共同决定了生物体基因的表达情况,进而最终影响代谢产物的表达^[21]。代谢物是生物体中“基因表达→转录表达→蛋白表达→代谢合成”系列生命活动过程的终端产物,任何一个环节的改变都将导致代谢物的不同。本研究发现蝉花中代谢物种类较冬虫夏草更为丰富,可能是二者基因信息量大小差异所致。根据基因组测序结果

显示,冬虫夏草全基因组大小约 120 Mb (NCBI 登录号 ANOV00000000),蝉花全基因组为 36.9 Mb (NCBI 登录号 AEIW00000000);虽然冬虫夏草的全基因组序列多于蝉花,但其中冗余序列数量庞大,蛋白编码基因数不足蝉花的二分之一,其基因密度(87 个/Mb)也远小于蝉花(438 个/Mb)^[22]。

本研究从冬虫夏草与蝉花中均检测到多种游离氨基酸,包括多种参与蛋白合成的氨基酸(如丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸等)与少数非蛋白质氨基酸(如鸟氨酸、高丝氨酸、氨基丙二酸和 γ -氨基丁酸)。营养学研究表明,氨基酸不仅是构成生物体蛋白质的基础物质之一,还具有滋补强体功效,尤其是一些非合成蛋白类氨酸。如 γ -氨基丁酸是一种重要的神经递质抑制剂,具有降低血压、提高



CS. 冬虫夏草;CH. 蝉花

图 2 冬虫夏草与蝉花提取物的代谢物 PCA 和 PLS-DA 得分(A,C)与相应载荷(B,D)

Fig. 2 Score plots(A,C) and corresponding loading plots(B,D) of PCA and PLS-DA of metabolites of *O. sinensis* and *I. cicadae* extracts

表 2 冬虫夏草与蝉花 GC-MS 分析差异代谢物的 VIP 值

Table 2 VIP values of differential metabolites identified from extracts of *O. sinensis* and *I. cicadae* by GC-MS

代谢物	VIP 值	代谢物	VIP 值
D-甘露醇	10.00	γ-氨基丁酸	1.52
海藻糖	7.47	苏氨酸	1.40
柠檬酸	6.08	葡萄糖酸	1.39
丙三醇	5.39	脯氨酸	1.38
磷酸	5.13	肌醇	1.35
葡萄糖	2.92	丝氨酸	1.21
焦谷氨酸	2.80	麦芽糖醇	1.21
酪氨酸	2.30	鸟氨酸	1.20
甘氨酸	2.10	phosphoric acid,propyl ester	1.19
尿素	1.76	苹果酸	1.10
丙氨酸	1.68		

脑活力与调节心血管疾病等多方面的生理活性,被认为是一种新型功能食品因子^[23];鸟氨酸是参与人体中尿素循环(又称鸟氨酸循环)的重要代谢物,膳食中补充鸟氨酸能够通过促进脂质代谢和刺激尿素循环提高能量消耗效率,达到缓解疲劳的效果^[24]。蝉花中的γ-氨基丁酸、鸟氨酸、甘氨酸、酪氨酸等含量均明显高于冬虫夏草,因此就氨基酸类成分而言,蝉花滋补功效优于冬虫夏草。此外,通过单变量分析结合多元统计所筛选得到的差异代谢物中,D-甘

露醇是对冬虫夏草和蝉花区分贡献最大的化学标志物,该化合物已被证明是冬虫夏草活性成分之一,具有利尿、止咳和抗自由基等功效,有学者建议将其作为冬虫夏草的指标性成分^[25],本研究通过代谢组学分析方法所得结果与上述观点一致。

代谢组学作为一种新的检测分析技术,在中药材鉴别和质量控制方面有着广泛的应用前景,同时也有一定的局限性^[26]。由于冬虫夏草中所含化学物质十分复杂,目前的分析技术尚不能达到化合物全面覆盖水平,而且代谢物的结构鉴定仍有待完善。本研究采用 GC-MS 测得的物质大多为初级代谢物,对次级代谢物的检测能力较弱,后续研究将进一步结合 LC-MS 检测和药效评价法对冬虫夏草药材整体质量进行全面评价。

[致谢] 贵州师范大学博士基金项目对本研究的支持。

[参考文献]

[1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J]. Stud Mycol, 2007, 57 (1): 5-59.
[2] Shashidhar M G, Giridhar P, Udaya Sankar K, et al. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: a potent food supplement-a review [J]. J Funct Foods, 2013, 5 (3):1013-1030.

- [3] YUE K, YE M, ZHOU Z J, et al. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review [J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65 (4) : 474-493.
- [4] 罗靖, 宋捷民. 中药蝉花的本草学考证 [J]. 江西中医学院学报, 2007, 19 (6) : 14-15.
- [5] 陈祝安, 刘广玉, 胡菽英. 蝉花的人工培养及其药理作用研究 [J]. 真菌学报, 1993, 12 (2) : 138-144.
- [6] 王春雷, 芦柏震, 侯桂兰. 中国蝉花的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (4) : 244-247.
- [7] 金周慧, 陈以平. 蝉花汤延缓慢性肾功能衰竭进展的临床观察 [J]. 中医医学刊, 2006, 24 (8) : 1457-1459.
- [8] 杜兰屏, 陈以平, 张春嵩, 等. 金蝉补肾汤治疗慢性间质性肾炎的临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8 (4) : 214-216.
- [9] 陈林琤, 许瑞祥, 郭嘉信. 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 [J]. 分析化学, 2011, 39 (9) : 1380-1386.
- [10] Shashidhar G M, Giridhar P, Manohar B. Functional polysaccharides from medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* as a potent food supplement: extraction, characterization and therapeutic potentials—a systematic review [J]. Rsc Adv, 2015, 5 (21) : 16050-16066.
- [11] 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, 2015: 115.
- [12] 杨钊, 迟少云, 张春辉, 等. 冬虫夏草及其代用品中腺苷和虫草素的 LC-MS-MS 定量分析研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (19) : 2018-2021.
- [13] 陆艳艳, 邱细敏, 蒋诚, 等. 人工冬虫夏草不同部位核苷类成分分析 [J]. 食品科技, 2011, 36 (4) : 250-252.
- [14] 朱丽娜, 高新华, 张忠, 等. 高效液相色谱分析虫草中核苷类成分 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36 (6) : 604-609.
- [15] 苏桃, 陆兔林, 毛春芹, 等. 代谢组学与中医药现代化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (7) : 247-250.
- [16] CHAN P H, ZHENG K Y, Tsim K W, et al. Metabonomic analysis of water extracts from Chinese and American ginsengs by ¹H nuclear magnetic resonance: identification of chemical profile for quality control [J]. Chin Med, 2012, 7 (1) : 25.
- [17] 焦美丽, 李震宇, 张福生, 等. 基于分子标记和代谢组学技术的黄芪与红芪比较研究 [J]. 药科学报, 2015, 50 (12) : 1625-1631.
- [18] 赵洪伟, 刘树民, 张宁, 等. 玄参对脾虚水湿不化大鼠模型的影响及其肝脏代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (20) : 82-89.
- [19] Styczynski M P, Moxley J F, TONG L V, et al. Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery [J]. Anal Chem, 2007, 79 (3) : 966-973.
- [20] 温鲁, 唐玉玲, 张平. 蝉花与有关虫草活性成分检测比较 [J]. 江苏中医药, 2006, 27 (1) : 45-46.
- [21] Keller N P, Turner G, Bennett J W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3 (12) : 937-947.
- [22] HU X, ZHANG Y J, XIAO G H, et al. Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus [J]. Chinese Sci Bull, 2013, 58 (23) : 2846-2854.
- [23] 江波. GABA (γ -氨基丁酸) ——一种新型的功能食品因子 [J]. 中国食品学报, 2008, 8 (2) : 1-4.
- [24] Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, et al. *L*-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism [J]. Nutr Res, 2008, 28 (11) : 738-743.
- [25] DONG C H, YAO Y J. Comparison of some metabolites among cultured mycelia of medicinal fungus, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) from different geographical regions [J]. Int J Med Mushrooms, 2010, 12 (3) : 287-297.
- [26] 郭慧, 崔扬, 王秋红, 等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (1) : 213-219.

[责任编辑 刘德文]