

人工虫草类产品质量比较研究

刘旻虹¹, 韦敏^{2*}, 徐霞², 郑生智², 夏安扣³ (1. 常州市食品药品监督管理局, 江苏常州 213002; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏南京 210014; 3. 溧阳市天目湖农业发展有限公司, 江苏溧阳 213300)

摘要 [目的]对比研究不同人工虫草产品中有效物质含量。[方法]依照《中华人民共和国药典》(2015版)中的方法体系测定了人工虫草类产品的水分、灰分、浸出物含量;利用高碘酸钠比色法测定虫草酸;利用苯酚-硫酸法测定多糖;利用高效液相法测定腺苷、虫草素含量;国标法测定了蛋白、IgG含量,同时以天然冬虫夏草作为对照。[结果]不同人工虫草中虫草酸、虫草素、腺苷及多糖,蛋白质和IgG的含量均不同,其他虫草是否能替代冬虫夏草用于临床用药,还有待于进一步研究验证。[结论]该研究可为开发利用虫草的药用价值提供理论依据。

关键词 虫草;质量控制;替代应用

中图分类号 R282 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)31-0170-03

Quality Comparison Study of *Cordyceps sinensis* Originated from Different Cultivars

LIU Min-hong², WEI Min², XU Xia² et al (1. Changzhou Food and Drug Administration, Changzhou, Jiangsu 213002; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract [Objective] Comparative study on the content of effective substances of *Cordyceps sinensis* originated from different cultivars. [Method] Determination of moisture, ash and extract content according to the 2015 version of *China Pharmacopoeia* in the relevant provisions of the system; determination of the content of cordycepic acid by sodium periodate colorimetric method; determination of the content of polysaccharides by phenol sulfuric acid method; determination of the content of adenosine and cordycepin by HPLC; determination of the cordycepic acid content of protein and IgG by national standard method. [Result] The contents of cordycepic acid, polysaccharide, adenosine and cordycepin, protein and IgG in different *Cordyceps sinensis* are different, and whether *Cordyceps sinensis* originated from other cultivars can replace *Cordyceps sinensis* for clinical use remains to be further studied and verified. [Conclusion] The study can provide theoretical basis for the development and utilization of medicinal value of *Cordyceps sinensis*.

Key words *Cordyceps sinensis*; Quality control; Alternative application

冬虫夏草(*cordyceps*)为麦角菌科虫草属真菌冬虫夏草菌[*Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc.]的子座及其寄主蝙蝠蛾科昆虫幼虫上及幼虫尸体的复合体^[1],为我国传统滋补中药材。记载其功效为“补肺益肾,止血化痰”,可用于“久咳虚喘,劳嗽咯血,阳痿遗精,腰膝酸痛”。但由于其生长条件要求高,目前濒于灭绝,被列为国家重点保护野生植物(Ⅱ级),2016年国家食品药品监督管理局印发通知停止冬虫夏草用于保健食品试点工作(食药监食监三〔2016〕21号)。冬虫夏草的创造是一种复杂也是有偶然因素的形成过程,但并非不可取代。

蛹虫草[*Cordyceps militaris*(Lex. Fr) Link]又名北冬虫夏草,隶属于囊菌亚门(Ascomycotina)麦角菌目(Clavicipitales)麦角菌科(Cordyceps)虫草属[*Cordyceps sinensis*(Berkeik) saccardo sp.]。单纯用培养基培养的蛹虫草菌称为虫草花^[2];以蚕蛹作寄主寄生培育,称为北虫草或蛹虫草;以家蚕幼虫为寄主寄生培育,称为蚕虫草,其虫草形态更接近天然虫草^[3]。目前蛹虫草子实体,正式获得国家卫生部“新资源食品”批文[卫食新准字(2006)第0001号],这种新式药材渐渐替换了冬虫夏草,具有优良前景。

目前市场有一定量人工虫草产品的应用,但没有规范的质量控制方法。为了确保人工虫草产品合理有效的应用,使其质量评价有具体的量化指标,笔者按照《中华人民共和国

药典》(2015版)中的方法系统测定了人工虫草产品的水分、灰分、浸出物含量,还进行了人工虫草品质相关指标的测定,特别首次测定了与虫草免疫活力相关的IgG含量,力求提供替代合理性的评价依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。电子天平(EL303),梅特勒-托力多仪器;KQ-2200B 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RE-52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;DZF-6050 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;紫外分光光度计;安捷伦1260 UPLC-DAD-6530 ESI-QTOF MS。

1.1.2 主要试剂。虫草素(Cordycepin,货号C3394)、D-甘露醇(M412),购自美国Sigma公司;腺苷(Adenosine, Amresco 0325),购自美国Amresco公司;五氧化二磷、无水氯化钙、乙醇、高碘酸钠、碘化钾、硫代硫酸钠、甲醇等试剂均为分析纯;乙腈为色谱纯。

1.1.3 供试样品。虫草花:购买于市场。蚕虫草:由江苏省中国科学院植物研究所自我培养,其菌种经江苏省中国科学院植物研究所吕晔研究员鉴定为北虫草菌(*Cordyceps militaris*),冷冻干燥后备用。蛹虫草:由江苏省中国科学院植物研究所自我培养,其菌种经江苏省中国科学院植物研究所吕晔研究员鉴定为北虫草菌(*Cordyceps militaris*),冷冻干燥后备用。

冬虫夏草分别购买自西藏自治区药材公司、南京同仁堂药店、南京大华中药店。

1.2 方法 虫草含有多种活性成分,其中腺苷、虫草素、虫

基金项目 常州市创新人才合作项目(CQ20164004)。
作者简介 刘旻虹(1977—),女,江苏常州人,副主任药师,硕士,从事药物分析研究。*通讯作者,副研究员,博士,从事药用植物方面的研究。
收稿日期 2018-05-31;修回日期 2018-06-07

虫草多糖和虫草蛋白是虫草类的主要活性物质,含量丰富。

1.2.1 样品的处理。分别取虫草花、蛹虫草、蚕虫草和冬虫夏草,60℃烘干,粉碎,过80目筛,混合均匀。每个样品平行制备3份。

1.2.2 水分、灰分、浸出物含量测定。按2015年版《中国药典》一部要求测定水分(附录IX H水分测定法第三法)、总灰分(附录IX H总灰分测定法)、水溶性浸出物(附录XA)。

1.2.3 多糖、蛋白含量测定。参考GB 5009.5—2010食品安全国家标准食品中蛋白质的测定中的第一法测定虫草蛋白的含量;根据GB/T 5009.194—2003保健食品中免疫球蛋白IgG的测定方法检测IgG含量;对不同人工虫草测定结果进行比较。

苯酚-硫酸法测定虫草多糖的含量^[6]。

1.2.4 虫草酸含量测定。高碘酸钠比色法测定甘露醇(虫草酸)的含量^[4]。

1.2.5 腺苷和虫草素含量测定。高效液相法测定虫草素、腺苷^[5],方法学考察如下,按照标准曲线计算不同人工虫草中含量。

1.2.5.1 色谱条件。色谱柱:Knauer Europher - 100 C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相:乙腈 - 0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液(7.5:92.5);流速:1 mL/min;检测波长:

260 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

1.2.5.2 检测波长的选择。精密量取腺苷、虫草素对照品适量,加入甲醇制成含腺苷 0.1 mg/mL、虫草素 0.2 mg/mL 的溶液,紫外扫描后发现腺苷、虫草素均在 259.3 nm 处有最大吸收,所以最终选择波长 260 nm 测定腺苷和虫草素。

1.2.5.3 对照品溶液的制备。精密量取于 105℃干燥至恒重的腺苷、虫草素对照品,放入容量瓶中,加甲醇定容至 10 mL,摇匀。从中吸取 1 mL 于 50 mL 容量瓶,加甲醇定容至刻度,制成每 1 mL 含腺苷 23.2 μg、虫草素 30.0 μg 的溶液,作为对照品溶液。

1.2.5.4 线性关系考察。上述色谱条件分别以对照品溶液 1、5、10、15、20 μL 进样量进行测定,以对照品溶液的进样量 (ng) 为横坐标,峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程。

2 结果与分析

参照《中华人民共和国药典》(2015版)规定的检测内容,对人工虫草药材的质量标准进行了较为全面、系统的研究,不仅有常规的虫草酸、虫草素,还包括了腺苷、多糖、蛋白及 IgG 多项指标,特别是与免疫功能相关的 IgG 含量测定,为人工虫草药材的质量评价提供了试验基础和理论依据,测定结果如表 1 所示。

表 1 不同虫草产品的质量比较研究(n=3)

Table 1 Quality comparison of different Cordyceps products(n=3)

虫草产品 Cordyceps products	水分 Water content %	总灰分 Total ash %	水溶性浸出物 Water soluble extract//%	虫草酸 Cordycepic acid//%	虫草素 Cordycepin %	腺苷 Adenosine %	多糖 Polysaccharide %	蛋白质 Protein %	IgG
冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i>	14.76±1.23	13.37±0.92	24.93±1.62	1.61±0.35	0.004±0.000	0.75±0.01	0.350±0.001	33.2±1.7	0.050±0.003
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	10.93±1.36	6.50±0.68	33.11±1.34	1.66±0.32	0.13±0.01	11.12±0.03	0.605±0.003	52.6±1.5	0.065±0.006
蚕虫草 Silkworm insect grass	9.29±1.07	4.74±0.35	39.14±1.19	1.52±0.31	0.27±0.01	1.61±0.01	0.873±0.005	87.6±1.8	0.245±0.003
虫草花 Cordyceps Flower	14.64±1.54	6.44±0.72	81.71±1.21	1.78±0.32	0.09±0.01	10.91±0.02	2.041±0.011	23.8±1.1	0.188±0.004

2.1 不同虫草产品中水分、灰分、浸出物的含量比较 如表 1 所示,一般市售的虫草类产品水分在 14% 左右,笔者课题组研制的蚕虫草、蛹虫草由于采用冷冻干燥,保存较好,故水分含量低。

生药中灰分其实是生药中的不挥发性无机盐。由表 1 数据可见,冬虫夏草总灰分较高,在 13% 左右,而蛹虫草、虫草花总灰分差异不大,蚕虫草总灰分最少。

虫草中的生物活性成分是核苷、虫草酸、虫草多糖,均易溶于水,故以水为溶剂进行浸出物测定。由表 1 数据可见,虫草花的水溶性浸出物较冬虫夏草、蛹虫草、蚕虫草高很多,超过 80%,而其他 3 个样品在 24%~40%。

2.2 不同虫草产品中多糖、蛋白质含量比较 有关研究表明,蛹虫草含有蛋白质、脂类、糖类、维生素及多种微量元素,18 种氨基酸齐全,而且含有虫草酸、虫草素、虫草多糖和超氧化物歧化酶等生物活性物质,并且含量十分丰富^[7-8]。

虫草多糖在蛹虫草的不同部位含量差异较大,主要存在

于菌丝体中,王奇^[9]的研究表明,虫草多糖含量最多的是大米培养基菌丝体,其后依次是深层发酵菌丝体、以大米为培养基的人工栽培蛹虫草子实体、以蚕蛹为培养基的人工栽培蛹虫草子实体,虫草多糖含量最低的是野生蛹虫草子实体。表 1 结果与文献相符,虫草花的多糖含量最高,原因可能是菌丝体中多糖含量较多,也有可能虫草花产品中带有部分培养基,此结果也可以间接验证虫草花中水溶性浸出物大部分为多糖类成分。虫草花中多糖成分具体为何有待于进行多糖成分测定验证。

石继红等^[10]通过蛋白质含量测定结果表明,天然冬虫夏草与冬虫夏草菌丝体中水溶性蛋白质含量分别占其干重的 2.00% 和 7.24%。表 1 结果表明,蛹虫草及蚕虫草中蛋白质含量高于虫草花及冬虫夏草,此结果与文献不相吻合,可能文献测定的是冬虫夏草菌丝体,而非北虫草菌丝体。

2.3 不同虫草产品中免疫球蛋白 IgG 含量比较 免疫球蛋白 (immunoglobulin) 指具有抗体活性的动物蛋白,主要存在

于血浆中。目前未见虫草类成分中免疫球蛋白含量测定的报道。该试验结果(表1)显示,蚕虫草含有的IgG是最高的。

2.4 不同虫草产品中虫草酸含量比较 虫草酸又被称为D-甘露醇,对抗自由基和机体免疫能力都有很好的提升效果,而且能补肺益肾、抑制病菌,因此其含量的检测对虫草质量具有决定性意义。有关虫草酸的研究证明,不同虫草中虫草酸所占的含量相似而虫草花稍微高一点。江晓路等^[11]检测结果显示,蛹虫草深层发酵菌丝体含有比蛹虫草和冬虫草中都要高得多的虫草酸成分。该结果显示(表1),4种虫草产品中虫草酸含量无显著性差异。

2.5 不同虫草产品中腺苷和虫草素含量比较 腺苷和虫草素是虫草中2种主要核苷类活性成分^[12],虫草素能够抑制mRNA的合成,是虫草抗肿瘤活性成分。腺苷则是心脑血管系统活性成分,具有防止心率失常,抑制神经递质的释放和调节腺苷酸活化酶活性等多重药理作用。因此,对不同虫草中腺苷和虫草素的含量进行比较,具有重要的实际意义,特别其中腺苷含量目前是评价冬虫草质量优劣的一个重要指标,《中华人民共和国药典》2015年版冬虫草项下明确规定其含量不能低于0.010%。

贡成良等^[13]的检测结果表明,人工培育家蚕蛹虫草的化学成分与冬虫草类似,且主要功效成分虫草素高于冬虫草。陆巍杰等^[14]对北冬虫草、冬虫草及食用菌中核苷类功效成分进行比较,发现多糖和腺苷类物质是大多数食用菌都具有的成分,而虫草素是北冬虫草、冬虫草中所特有的物质。表1结果表明,冬虫草、蛹虫草、蚕虫草及虫草花中都含有虫草素,而且蚕虫草中的含量最高,蛹虫草次之;冬虫草中虫草素及腺苷含量都较低,蛹虫草及虫草花中的腺苷含量是冬虫草的十余倍。

3 讨论

目前,由于冬虫草资源日见匮乏^[15],而蛹虫草作为

冬虫草的首选替代品逐渐受到国内外专家的重视。同时人们研究发现,不同虫草产品中虫草酸、虫草素、腺苷及多糖、蛋白质和IgG的含量也不同。虽然人工培养的方法得到的不同虫草产品中各活性有效成分都比天然的冬虫草高,不同虫草产品的成分研究对于解决冬虫草价格昂贵、资源灭绝的问题提供了研究培养不同种虫草的科学依据,但不同虫草是否可以替代用于临床用药还有待于进一步研究验证。

参考文献

- [1] 王林萍,余意,冯成强.冬虫草活性成分及药理作用研究进展[J].中国中医药信息杂志,2014,21(7):132-136.
- [2] 潘中华.蚕虫草的培育研究[J].江苏蚕业,2001,23(4):13-14.
- [3] 顾寅钰,张亚平,娄齐年,等.蚕虫草研究现状[J].现代农业科技,2007(18):154-155.
- [4] 闫文娟,李秦辉,姜子德.比色法测定广东虫草虫草酸含量[J].食用菌,2010(5):73-74.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:115.
- [6] 陈丽华,张清华,欧阳胜,等.虫草发酵液多糖含量的测定[J].时珍国医国药,2015,26(12):2880-2882.
- [7] 桂仲争,朱雅红.蛹虫草的人工培育、有效成分及药理作用研究进展[J].蚕业科学,2008,34(1):178-184.
- [8] 孙月,薛阳,王琦.野生蛹虫草与组培蛹虫草子实体的成分测定与分析[J].辽宁师专学报,1999,1(1):86-87.
- [9] 王奇.蛹虫草功效成分研究进展[J].辽宁师专学报,2011,13(3):103-105.
- [10] 石继红,党化宁,万一,等.冬虫草菌丝体与天然冬虫草蛋白成分的分析比较[J].药物生物技术,2003,10(5):304-307.
- [11] 江晓路,孙月.蛹虫草活性成分的测定[J].食用菌学报,1999,6(1):47-50.
- [12] 杨青,冯立,褚征,等.两种加工方法获得的北虫草粉中有效成分比较[J].时珍国医国药,2008,19(7):1576-1577.
- [13] 贡成良,吴友良,朱军贞,等.家蚕蛹虫草的人工培育及其成份分析[J].中国食用菌,1993,12(4):21-23.
- [14] 陆巍杰,唐龙范,唐亮,等.北冬虫草、冬虫草及食用菌中核苷类功效成分的比较研究[J].中国科技产业,2012(9):54-57.
- [15] 王钢力,金红宇,韩小萍,等.冬虫草药材的质量研究及存在问题[J].中草药,2008,39(1):115-118.

名词解释

扩展被引半衰期:指该期刊在统计当年被引用的全部次数中,较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标,通常不是针对个别文献或某一组文献,而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展H指数:指该期刊在统计当年被引的论文中,至少有h篇论文的被引频次不低于h次。

来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。

平均引文数:指来源期刊每一篇论文平均引用的参考文献数。

平均作者数:指来源期刊每一篇论文平均拥有的作者数,是衡量该期刊科学生产能力的一个指标。

地区分布数:指来源期刊登载论文所涉及的地区数,按全国31个省区市计(不包括港澳台)。这是衡量期刊论文覆盖面和全国影响力大小的一个指标。

机构分布数:指来源期刊论文的作者所涉及的机构数。这是衡量期刊科学生产能力的另一个指标。

海外论文比:指来源期刊中,海外作者发表论文占全部论文的比例。这是衡量期刊国际交流程度的一个指标。

基金论文比:指来源期刊中,各类基金资助的论文占全部论文的比例。这是衡量期刊论文学术质量的重要指标。

引用半衰期:指该期刊引用的全部参考文献中,较新一半是在多长一段时间内发表的。通过这个指标可以反映出作者利用文献的新颖度。