

★综述★

冬虫夏草液体深层发酵菌丝体相关制剂的研究现状

邹秦文¹, 肖新月^{2*}, 林瑞超²

(1 北京中医药大学, 北京 100102; 2 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 冬虫夏草简称虫草, 是我国的名贵中药材, 具有多种药理活性。但由于其产于高原, 资源有限, 为解决虫草药源紧张问题, 以人工发酵培养的虫草菌丝体代替天然虫草已获得成功, 并有数种产品问世。本文根据现有的虫草研究报道中虫草发酵菌丝体的相关研究进行了归纳总结。

关键词: 虫草制剂; 液体深层发酵; 菌丝体; 化学成分; 质量标准

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0680-08

The research situation of related preparation of submerged fermentation of *Cordyceps sinensis*

ZOU Qin-wen¹, XIAO Xin-yue^{2*}, LIN Rui-chao²

(1. Beijing University of Chinese medicine, Beijing 100102, China)

2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Referred to as Chinese caterpillar fungus *Cordyceps sinensis*, is Chinese valuable medicinal herbs with a variety of pharmacological activities. However, the resources of *Cordyceps sinensis* is finite due to the plateau where it lives. So in order to solve the tension of the source of *Cordyceps sinensis*, it has been successful to use fermentation cultured *Cordyceps* mycelia in place of natural *Cordyceps*, and there has been several products available. This paper summarizes related researches of *Cordyceps mycelia* based on forthcoming reports of researches of *Cordyceps*.

Key words *Cordyceps* preparation; submerged fermentation; mycelia; chemical composition; quality evaluation

冬虫夏草简称虫草, 是麦角菌目 (Clavicipitales)、麦角菌科 (Clavicipitaceae)、虫草属 (*Cordyceps*) 的冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生于昆虫蝙蝠蛾科幼虫体内, 与寄生昆虫形成的虫菌复合体。目前, 国内外文献报道的虫草菌有几十种, 其中具有药用价值的虫草属真菌包括冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.、蛹虫草菌 *C. militaris* (Fr.) Link. 粉被虫草 *Cordyceps pruinosa* Petch. 蝉花菌 *C. cicadae* X. Q. Shing. 古尼虫草菌 *C. gunnii* (Berk.) Berk.、巴西虫草菌 *C. brasiliensis* P. Henn 等^[1,2]。

冬虫夏草具有多种药理功能, 主要生长于西藏、青海、四川、甘肃、云南等地, 以青藏高原产量最多, 长期以来一直被视为珍贵的中药和藏药。由于其特殊的药用价值, 国内外对其需求量与日俱增。但天

然虫草生长环境特殊, 产量有限, 且近年来的过度采挖使其产量逐年下降, 远不能满足市场需求。因此, 人们从人工培养着手, 利用液体深层培养技术进行工业化生产虫草菌丝^[2,3], 希望能解决此问题。现将冬虫夏草菌液体深层发酵菌丝体的工艺、相关产品及其活性成分的测定等综述如下。

1 液体深层发酵冬虫夏草菌丝体

1.1 液体深层发酵工艺^[4]

液体发酵技术属于现代生物技术之一, 是指在生化反应器中, 模仿自然界将食、药用菌在生育过程中所必需的糖类、有机和无机含有氮素的化合物、无机盐等一些微量元素以及其他营养物质溶解在水中作为培养基, 灭菌后接入菌种, 通入无菌空气并加以搅拌, 提供食用菌菌丝呼吸代谢所需要的氧气, 并控制适宜的外界条件, 进行菌丝大量培养繁殖的过程。

* 通讯作者 Tel: (010) 67095432 E-mail: xiaox@nicbp.org.cn

食用菌的液体深层发酵生产主要是采用了抗生素生产的工艺和设备,其工艺大致是:母种 \rightarrow 一级种子 \rightarrow 二级种子 \rightarrow 发酵罐深层发酵。在培养过程中,影响发酵成败的关键因素有2个:第一是菌种,第二是培养基。培养基根据菌种的不同而有所不同,应选择好合适的培养基成分即碳源、氮源、无机盐、微量元素、维生素、生长素和水质等。在发酵罐深层液体发酵时,应参照发酵罐生产的有关参数即物理参数温度、压力、搅拌速度、空气流量、溶解氧、排气中氧及二氧化碳含量等,化学参数 pH、糖、氧及次生代谢产物的含量等,和生物参数菌丝形态、发酵液中菌体含量等来控制生产。

1.2 冬虫夏草液体深层发酵

冬虫夏草菌是一种子囊菌,其生活史中具有分生孢子阶段(无性型)和子囊孢子阶段(有性型)。在人工培养和液体发酵等实际生产中所使用的是冬虫夏草菌的无性阶段^[5]。刘锡璠^[6]从1987年开始对冬虫夏草菌进行分离和培养,并鉴定出冬虫夏草的无性型阶段为中国被毛孢。中国医学科学院药物研究所于1992年首次人工深层发酵培养冬虫夏草菌丝体获得成功^[7]。目前有中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)^[8]、蝙蝠蛾拟青霉菌(*Paezilomyces hqialii*)^[9]、被毛孢属菌(*Mortierella sp.*)^[10]、虫草头孢菌(*Cephalosporium sinensis*)^[11]等真菌被报道是由冬虫夏草菌中分离得到的菌种,并且均可以在液体培养基中培养,其发酵的工艺流程为:保藏菌种 \rightarrow 斜面菌种 \rightarrow 一级摇瓶种子 \rightarrow 二级摇瓶种子 \rightarrow 发酵罐。培养基及培养的最适条件根据分离到的菌株不同而有所差异^[7]。

1.2.1 中国被毛孢 最适的生长温度为15~18℃,在20℃以上菌丝猛涨,25℃以上则抑制生长。最适的pH为5~6,最佳碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,酵母的适量配合,在有硫酸镁、磷酸二氢钾的存在下菌丝体生长旺盛^[8]。

1.2.2 蝙蝠蛾拟青霉菌 冯健^[9]等用从北京中国科学院微生物研究所购进的蝙蝠蛾拟青霉菌进行深层发酵,发现以玉米浆和豆饼粉适量比例的培养基能使菌丝收率较高,且发现菌丝收率随着装瓶量的增加而减少,以10%为宜。最适培养温度为18~20℃,最佳发酵时间72h,但其无具体的培养基配方,也没有对pH进行研究。

1.2.3 被孢霉属菌 郭素萍^[10]采用1984年从四川省文川县采集的新鲜冬虫夏草上分离的一种被毛孢属菌进行实验,发现其最适的培养条件为温度26

℃,发酵时间72h,培养基装瓶量为60mL/250mL,培养基配比:葡萄糖2%;酵母浸汁0.5%;花生饼3%;蝉蛹粉0.5%;奶粉0.2%;磷酸氢二钠0.1%;磷酸氢二钾0.15%;维生素B₁1mg,维生素B₆1mg,磷酸钙0.4%;硫酸镁0.023%。pH为5.5,采用此配比,发酵液的菌丝相对浓度可达54.3%。

1.2.4 虫草头孢菌 于洪飞^[11]通过实验确定了虫草头孢菌的最佳发酵培养基配方为蔗糖4%,豆饼粉4%,磷酸二氢钾0.15%,硫酸镁0.1%,可使菌丝收率达到40.12g·L⁻¹。培养的初始pH为6~7,装液量100mL/500mL,种龄为36h,接种量为5%,温度22~25℃,摇床转速170r·min⁻¹。

由此可见,随着液体深层发酵技术的逐渐成熟,实现了用冬虫夏草菌发酵菌丝体代替天然冬虫夏草使用的产品不断问世。然而,虽然很多单位都对液体深层发酵虫草属真菌进行了研究,但是对液体深层发酵菌丝体的工艺并没有得出一个统一的标准,使得各企业都是按各自的方法进行生产,且其是否为规范生产无法考证。因此,要确定液体深层发酵冬虫夏草菌丝体生产工艺的统一标准,以规范企业的生产,并保证产品质量。

2 相关产品

现代药理及临床研究证明,虫草菌丝体对免疫及血液系统有调节作用,对肾脏、肝脏、心脏损伤有保护和防治,在抗衰老、抗应激和雄性激素样作用等方面均有很好的药理活性,因此在治疗心血管疾病、呼吸系统疾病、性功能障碍、肾功能衰竭、肝脏疾病、肿瘤以及血液、内分泌系统疾病等均具有较好的疗效^[12]。目前市场上,以虫草菌粉为主要原料,已开发的产品有药品、保健品与营养食品等。如百令胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊、金水宝胶囊、心肝宝胶囊、虫草精胶囊、虫草王胶囊、虫草丸、虫草花粉胶囊、虫草蜂胶胶囊、虫草鸡精、虫草洋参口服液、虫草雪莲口服液、灭澳灵胶囊、肾康胶囊、虫草补酒、冬虫夏草健康饮料、虫草茶等虫草制剂。其中,百令胶囊、金水宝胶囊、宁心宝胶囊、心肝宝胶囊、至灵胶囊为药品,收载于《中国药典》或《卫生部药品标准》为心、肝、肾、肿瘤等疾病的临床治疗增添了新的药物品种^[13]。

2.1 金水宝胶囊 金水宝胶囊于1987年问世^[14],是从青海冬虫夏草中分离所得蝙蝠蛾拟青霉Cs-4菌株,经纯化,人工发酵培养加工制成的口服制剂。其性状为浅褐色粉末,有特殊芳香味,与青海天然虫草有类似的化学成分和药理作用,由中国医学科学

院药物所、江西国药厂共同研制成功^[15]。经实验室证明,金水宝对外培养肾小管上皮细胞增殖、对庆大霉素所致大鼠急性肾毒性损伤及庆大霉素血药浓度都有影响,可减轻庆大霉素对肾的损害,使大鼠尿NAG酶的排泄量减少,其保护肾脏的机理主要是促进被损害、坏死的肾小管细胞再生和修复^[16]。临床上,金水宝广泛地应用于肾脏疾病中,如慢性肾功能不全、慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病、血液透析患者、急性间质性肾炎、急性肾功能衰竭等^[17]。还用于慢性乙肝^[16]、中晚期肝癌^[18]、男性更年期综合征^[19]、高血脂^[20]等疾病的治疗,且临床效果好。目前,金水宝胶囊已被收入2005年版《中国药典》。

2.2 百令胶囊 百令胶囊是以沈南英等在1983年从青海湖产的新鲜冬虫夏草子囊孢子、虫体组织、子座和虫体外菌丝中分离出的与金水宝胶囊相同的一种真菌中国被毛孢(又称中华束丝孢(*Synnematium sinense* Yin et Shen sp. nov),冬虫夏草头孢,蝙蝠蛾多毛孢)为菌种生产的冬虫夏草菌丝体干粉^[21]制成的胶囊,其对神经系统有镇静作用,对免疫系统、内分泌系统有双向调节作用,对呼吸系统和血液系统有保护作用,可用于治疗中医虚症,西医诊断的慢性喉炎、慢性气管炎、慢性肝炎和性功能障碍以及免疫性疾病^[22],还具有促进肾小管功能改善,缩短少尿期,加快肾功能恢复的作用^[12]。2005年版《中国药典》记载了百令胶囊。

2.3 至灵胶囊 至灵胶囊是用冬虫夏草分离纯化出来的被孢霉菌(*Mortierella* SP)发酵得到的菌丝体制成的胶囊。1990年编入《山西省药品标准》,1997年正式收入《卫生部药品标准》(中药成方制剂)第12册,且被卫生部批准列入国家二级中药保护品种^[23]。至灵胶囊具有扩张支气管和镇静催眠的功能^[23],可用于治疗慢性支气管炎^[24]、食管癌^[25]、肾虚^[26]和慢性乙肝^[27],具有良好的临床效果。

2.4 宁心宝胶囊 宁心宝胶囊为从新鲜冬虫夏草中分离得到的麦角菌科真菌虫草头孢(*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov),经液体深层发酵所得菌丝体的干燥粉末制成的胶囊。临床上用于提高窦性心律,具有改善窦房结、房室传导功能及心脏功能的作用^[28],可治疗室性早搏^[29]、高脂血症^[30]等。宁心宝胶囊已被收载于《卫生部药品标准》(中药成方制剂)第11册。目前生产宁心宝胶囊的厂家近百家。

2.5 心肝宝胶囊 心肝宝胶囊是河北省保定制药厂于1986年以冬虫夏草新鲜标本中分离出来的虫草头孢菌,经生物工程方法制得的菌丝加工而

成^[31]。其可用于治疗肺癌^[32]、慢性乙型肝炎^[33]、小儿心律失常^[34]等。已被收载于《卫生部药品标准》(中药成方制剂)第12册。但有资料显示,心肝宝胶囊的生产菌是一种真菌寄生菌粉红胶霉[*Glilocladium roseum* (Link) Bai],属肉座菌科(Hypocreaceae)小灿球赤壳菌属(*Spaerobolus*)的无性型粉帚霉属(*Glilocladium*)^[21]。

总之,这些冬虫夏草菌液体深层发酵菌丝体的相关产品在临床上已被广泛地使用,但在对26个企业生产的68批宁心宝胶囊样品的分析^[35]时,观测到某些样品有非菌丝特征的固体成分,并且不同企业甚至同一企业不同批次样品间这些成分的显微特征、数量差别较大。由此可见,有的宁心宝胶囊生产企业生产过程不规范,造成产品的质量参差不齐。

3 活性成分

虫草的子实体、菌核及菌丝体中都含有多种活性成分,如虫草多糖、胆甾醇、真菌甾醇、麦角甾醇、腺嘌呤核苷、腺嘌呤、尿嘧啶、蛋白质、多种氨基酸、硬脂酸、软脂酸、D-甘露醇、维生素、有机酸和微量元素^[12]。

3.1 冬虫夏草多糖 虫草多糖(*Cordyceps Polysaccharide*, CP)是冬虫夏草的主要活性成分之一,具有抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、抗放射、降血糖和降血脂等活性。其检测目前尚无统一的方法,文献报道中对其检测方法可分为两大类。一类是直接测定多糖本身,如高效液相色谱法和酶法,但因其需昂贵的仪器、多糖纯品和特定的酶,且操作繁琐,在应用中受到限制;另一类是用简单、快速的斐林法、苯酚-硫酸法、硫酸-蒽酮法等测定^[36]。斐林法的原理为在碱性溶液中,还原糖(含有自由醛基或酮基等单糖和某些二糖)能将金属离子还原,而糖本身被氧化成各种羟酸类化合物,通过溶液中的氧化还原指示剂的颜色变化,采用滴定法可对糖进行定性定量测定。苯酚-硫酸法是根据苯酚-硫酸试剂可与游离的寡糖、多糖中的己糖、糖醛酸(或甲苯衍生物)起显色反应,己糖在490 nm处(戊糖及糖醛酸在480 nm)有最大吸收,吸收值与糖含量呈线性关系。蒽酮-硫酸法是利用糖类遇浓硫酸脱水生成糖醛或其衍生物,可与蒽酮试剂缩合产生颜色物质,反应后溶液呈蓝绿色,于620 nm处有最大吸收,显色与多糖含量呈线性关系^[7]。目前大多数学者基本上都是用第2类方法检测多糖的含量,且发现虫草粗多糖的含量基本在40%以上。如葛新^[37]用硫酸-蒽酮比色法测得人工虫草(北冬虫夏草菌培养

体)中的粗多糖含量为 50.1%。马成坚^[38]采用硫酸-苯酚法显色,发现百令胶囊含虫草粗多糖量可达 45.48%。

3.2 糖醇、甾醇类 D-甘露醇是虫草中的糖醇,又名虫草酸,是虫草的有效成分之一,也是某些人工发酵虫草的质控指标。在临床上,虫草酸能够进入血液循环,提高血浆渗透压,降低颅内压、减低眼内压、利尿止咳等,对治疗青光眼和心脑血管病也有一定疗效。虫草甘露醇的测定主要有容量法和比色法,前者又称高碘酸氧化法,原理是甘露醇与高碘酸钠硫酸混合溶液反应生成含有醛基的物质,再用硫代硫酸钠滴定,适合于甘露醇含量较高的样品测定,此法最为常见;后者可使糖干扰降至最小,是利用高碘酸钠跟甘露醇反应产生黄色的在 412 nm 处有最大吸收的 3,5-二乙酰-1,4-脱氢二甲基吡啶,其测定具有特异性,且快速简便^[12]。彭科怀^[39]用滴定法测定了 7 家不同厂家的发酵虫草菌粉制品中的甘露醇含量,发现它们的甘露醇含量在 4%~8% 之间,最高可达 7.62%。杨晓东^[40]则用比色法对某制药厂生产的 60 批发酵虫草菌粉进行了测定,得甘露醇的含量在 8.08%~14.50% 之间,且各批次甘露醇含量的波动在 10% 左右。其他菌种,如蛹虫草,还有用气相色谱法测定甘露醇的含量^[41]。

麦角甾醇是真菌类的特征甾醇,是一种重要的维生素 D₂ 源。但在冬虫夏草中的含量并不多。目前,对麦角甾醇含量的测定有薄层扫描法和高效液相色谱法,其中后者较常用^[42]。常泓^[43]用薄层层析法测得香棒虫草和冬虫夏草中含有麦角甾醇,但未测定其含量。段韶军^[42]用高效液相色谱法测得人工虫草中麦角甾醇的含量为 0.687%。Jian-Ping Yuan^[44]用高效液相色谱法同时测定天然冬虫夏草中麦角甾醇及其酯类的含量,得总麦角甾醇的含量在 2 mg·g⁻¹ 左右,最高可达 2.755 mg·g⁻¹,其中含麦角甾醇酯 4%~34.8%。

3.3 核苷类 核苷类物质为冬虫夏草有效成分之一,尤以腺苷和虫草素具有明显的药理作用,如可用于治疗高血糖症、肝脏疾病、肾功能紊乱和肾衰竭。腺苷已被用作冬虫夏草的质控指标^[45]。测定腺苷含量的基本方法有在技术上采用了高压泵、高效固定相和高灵敏检测器的高效液相色谱法,其具有高分离速度、高分离效率和高检测灵敏度的特点,测定结果快速、准确、重现性好;薄层色谱法,分离效率高,成本低,样品用量少,应用广泛,可同时分离许多样品,此方法较为准确,精密度高,且对样品预处理

要求较低,对固定相、展开剂的选择自由度较大;毛细管电泳法,是以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,根据样品各组合之间淌度和分配行为上的差异而实现分离目的,其分辨率高、进样量少、柱容量大、样品预处理简单,此法测定腺苷快速简便、灵敏度高、重现性好^[7]。在文献报道中,最常见的是用高效液相色谱法测定各种产品中虫草的核苷量,如至灵胶囊^[46]、虫草川贝止咳膏^[47]、金水康虫草膏^[48]、虫草杞芝颗粒^[49]、冬仙胶囊^[50]、虫草益肺胶囊^[51]、虫草片^[52]等中核苷的测定。F. Q. Yang^[53]还用超高效液相色谱法快速测定了人工虫草中的 14 种核苷。米莉莉^[54]用薄层扫描法测定了冬虫夏草及人工虫草的核苷类成分。徐健君^[55]用毛细管电泳高频电导法同时测定腺苷与虫草素。侯晓蓉^[56]用毛细管区带电泳法定量分析冬虫夏草及人工发酵虫草菌粉中的核苷。还有用各种方法联用来测定核苷的,如刘畅^[57]用液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法同时测定了蒙山九州虫草和冬虫夏草中核苷类化合物。黄兰芳^[45]用 HPLC-ESI-MS(高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱)法测定了冬虫夏草和蚕蛹虫草中的腺苷和虫草素含量。

在对虫草相关制剂腺苷含量的测定中,发现不同制剂中含有的腺苷含量差别较大,如虫草川贝止咳膏中含有腺苷为 0.43%^[47],金水康虫草膏中则只含有 0.0088%~0.0096%^[48],虫草杞芝颗粒中也平均含量也只有 0.001%^[49],冬仙胶囊为 0.03%~0.06%^[50],虫草益肺胶囊中为 0.01% 左右^[51],而虫草片中则可达 0.2%~0.27%^[52]。由此可见,非常有必要建立虫草相关制剂的质控指标,以控制产品的质量。

3.4 蛋白质和氨基酸 虫草深层发酵菌丝体中氨基酸种类和天然冬虫夏草一致,氨基酸含量约为天然冬虫夏草的 2 倍。冬虫夏草菌丝体含有 18 种氨基酸、人体必需的 8 种氨基酸和婴儿所必需的组氨酸^[12]。对于氨基酸的测定,一般都采用氨基酸自动分析仪。该仪器是利用苯异硫脲法(Ednan 或 PTH 法)的原理,即苯异硫脲在弱碱性环境下与肽链 N-末端作用,形成苯氨基硫甲酰衍生物,除去过量试剂后在酸性溶液中环化得到氨基酸苯乙内酰硫脲衍生物,用乙酸乙酯抽提后可用纸层析或薄层层析进行分析,将氨基酸苯乙内酰硫脲衍生物抽提后的剩余肽链重复此反应,将该方法的所有操作程序全部自动化而设计出来的^[7]。王晨光^[58]用氨基酸自动分析仪对虫草养元精和养元液中的氨基酸含量进行了

测定, 得其总氨基酸含量为 29.32%。也有用其他方法测定的, 如陶巧凤^[59]用高效液相法柱前衍生化测定发酵虫草菌粉中的总氨基酸, 其含量可高达 37%。赵琛^[60]则用人工神经网络-近红外光谱法快速测定了发酵冬虫夏草菌丝体中总氨基酸的含量, 其值也达到了 32.10%。

对于蛋白质成分, 目前的研究工作相对较少, 很多具有生物活性的蛋白质可在实验动物或人体中发挥重要的调节作用。对于其测定, 石继红^[61]则用 Lowry 法, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 以及高效液相色谱法分析了天然与人工冬虫夏草的蛋白质的成分含量, 得天然冬虫夏草与冬虫夏草菌丝体中水溶性蛋白含量分别占其干重的 2.00% 和 7.24%。

3.5 无机元素 无机元素不仅是构成机体骨骼支架的成分, 而且在维持机体的神经肌肉的正常生理功能中起着十分重要的作用, 同时还参与调节体液渗透压和酸碱度, 又是机体多种酶的组成成分之一, 或是某些具有生物活性的大分子物质的组成部分^[62]。有文献表明虫草发酵菌丝体中含有丰富的对人体健康非常重要的 Zn Fe Ca 等矿物质元素, 尤以 Ca 的含量最高, 其中大量元素 Na K Ca Mg P, 微量元素 Fe Zn Cd Si Mn Ba Li Sr Ti Al 的含量高于天然冬虫夏草, 微量元素 Mn 的含量相近^[12]。对无机元素的测定, 文献中大多采用原子吸收光谱法和分光光度法进行测定。张甲生等将虫草硝化后, 用原子荧光仪、光栅光谱仪和高频等离子光亮计等测定了虫草中无机元素的含量^[63]。张冠群^[64]利用原子吸收光谱和分光光度法测定了虫草菌丝体中 Zn Fe Mn Mg 和 Ge 的含量。仲伟鉴^[62]用 PS-6 电感耦合等离子体发射光谱仪测定、分析比较了冬虫夏草及人工虫草菌丝体中无机元素的含量。

4 小结

目前, 人工发酵虫草菌丝体的技术已经成熟, 上市的产品众多, 且多借用或已占用“冬虫夏草菌丝体”之名, 作为药品或保健品。由于生产企业的规模、工艺以及产品的质量标准的不同, 使这些产品存在如下问题。

4.1 虫草制剂原料来源混乱 刘锡珽^[6]将从四川康定采集的 18 批冬虫夏草进行分离培养, 所得分离物中 90% 以上是同一种分生孢子阶段的真菌, 经鉴定其为被毛孢属的中国被毛孢, 并通过其生长特性、菌种特征等与天然冬虫夏草的进行比较, 发现其为

天然冬虫夏草的无性型。莫明和^[65]用微循环产孢法也证明了天然冬虫夏草的无性型为中国被毛孢。魏鑫丽^[21]用 DNA 随机多态型 (RAPD) 分析和 nDNA (ITS) 碱基序列分析等分子生物学方法对冬虫夏草菌、中国被毛孢、中华束丝孢、冬虫夏草头孢、蝙蝠蛾多毛孢、蝙蝠蛾拟青霉等几种菌株进行了研究, 也确定了天然冬虫夏草菌的无性型为中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* X. J Liu et al.); 中华束丝孢 (*Synnematium sinense* X. C. Yin et N. Y. Shen)、冬虫夏草头孢 (*Cephalosporium donghongxiacaonis* N. Y. Shen et al.) 和蝙蝠蛾多毛孢 (*Hirsutella hepiali* C. T. Chen et N. Y. Shen) 为其无性型的同种异名。蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* W. H. Chen et R. Q. Dai Cs-4) 是不同于冬虫夏草菌无性型的另一种真菌。因此, 就产品原料来源上看, 根据现有的研究报告, 只有百令胶囊来源于天然冬虫夏草菌, 而金水宝胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊则于天然冬虫夏草菌无关, 尤其是来源于真菌寄生菌粉红胶霉 [*Gliocladium roseum* (Link) Bain] 的心肝宝胶囊与天然冬虫夏草菌更是相差甚远。

4.2 虫草制剂生产无规范统一标准 对于作为产品原料的冬虫夏草菌粉, 尚未见统一的生产工艺标准。液体深层发酵中, 发酵培养基的配制, 培养条件 (如发酵罐压、泡沫、通气量、搅拌速度及发酵周期等) 都对冬虫夏草菌粉的质量产生影响。因此, 为了保障冬虫夏草菌粉的质量, 就要求液体深层发酵生产冬虫夏草菌丝体有统一的工艺标准。标准的建立, 可通过控制发酵培养基、培养条件、发酵罐生产参数即物理参数、化学参数和生物参数来实现。

4.3 相关药理、药化研究基础薄弱 临床上广泛使用的百令胶囊、金水宝胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊和心肝宝胶囊在肾、肝、免疫系统等疾病中都产生了不错的治疗效果, 但是关于这些制剂中的哪种成分产生了效果、作用机制的报道目前并不多。而且对于这些制剂的原料——通过液体深层发酵产生的冬虫夏草菌粉, 其在发酵过程中是否会产生变异, 使得化学成分发生了变化, 影响其药效, 都有待研究。

4.4 检测标准参差不齐, 专属性差 目前, 用冬虫夏草菌粉所生产的产品, 有的已经上了《中国药典》, 如金水宝胶囊和百令胶囊; 有的被收入药品标准, 如宁心宝胶囊和至灵胶囊; 有的虽已投入生产但还没有明确的国家标准, 如心肝宝胶囊。而且这些产品的质量基本上是通过检测腺苷、甘露醇和氨基酸的含量来控制的, 但是腺苷、甘露醇和氨基酸在其

他菌种的虫草中也同样含有,这就造成了产品的检测指标专属性差。因此,统一冬虫夏草菌粉相关产品的检测标准,和采用专属性好的检测指标,是虫草制剂质量标准研究的重点。

要解决这些问题,我们可以利用现代分析检测技术,研究虫草发酵菌丝体相关制品的原料发酵虫草菌粉中主要活性成分多糖、氨基酸或多肽、甾醇类、核苷类、虫草酸、虫草素等成分,结合药效实验确定质量控制指标成分,建立科学合理的质量标准。并通过控制发酵菌粉生产中的工艺参数,最终规范液体深层发酵菌粉的生产,保证相关制剂的安全有效。

参考文献

- 1 LIANG Zong-qi(梁宗琦). Flora fungorum siniconum. Vol 32, Cordyceps(中国真菌志.第 32 卷,虫草属). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2007. 31- 52
- 2 FU Lan(傅岚), CHEN Zuo-hong(陈作红). Research advances of chemical constituents and pharmacological activities of Cordyceps(虫草属真菌化学成分及药理作用研究进展). Life Sci Res(生命科学杂志), 2004 8(1): 1
- 3 JIN Zhao-xia(靳朝霞), YANG Shao-hui(杨少辉). Recent progress and trend of Cordyceps sinensis(冬虫夏草的研究进展与发展趋势). J Tianjin Med Univ(天津医科大学学报), 2005 11(1): 137
- 4 HONG Zhen(洪震), MAO Xiao-lan(卯晓岚). Experimental technology and production of fermentation for edible fungi and medicinal fungi(食用药用菌实验技术及发酵生产). Beijing(北京): China Agricultural Sciencetech Press(中国农业科技出版社), 1992. 122
- 5 JIANG Yi(蒋毅), YAO Yi-jian(姚一建). Anamorphic fungi related to Cordyceps sinensis(冬虫夏草无性型研究概况). Mycosystema(菌物系统), 2003 22(1): 161
- 6 LU Xi-jin(刘锡璠), GUO Ying-lan(郭英兰), YU Yong-xin(俞永信), et al Isolation and identification of the anamorphic state of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc(冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定). Acta Mycol Sin(真菌学报), 1989 8(1): 35
- 7 TAO Ke(陶科), Wang Zhong-yan(王忠彦), Guo Jin-lin(国锦琳). Study on deep fermentation of Cordyceps sinensis Sacc and determination method of mycelium's active substance(冬虫夏草菌深层发酵及菌丝体活性成分测定方法探讨). Sichuan Food Ferment(四川食品与发酵), 2002 38(3): 34
- 8 WANG Zhong(王忠), MA Qi-long(马启龙), QIAO Zheng-qiang(乔正强). Study on the isolation culture of Cordyceps sinensis (Berkeley) Saccardo in Gansu province(甘肃冬虫夏草菌分离培养研究). Gansu Agric Sci Technol(甘肃农业科技), 2001, (7): 43
- 9 FENG Jian(冯健), WANG Hong-qi(王红旗), ZHANG Hong-jun(张鸿菌). Introduction of the new submerged fermentation experiment of Cordyceps(新引进冬虫夏草菌液体深层发酵试验). J Microbiol(微生物学杂志), 2002 22(3): 55

- 10 GUO Su-ping(郭素萍). Experimental research of Cordyceps mycelia(冬虫夏草菌丝的实验研究). Res Tradit China Med(中医药研究), 1998 14(3): 24
- 11 YU Hong-fei(于洪飞), MENG Xian-zhi(孟宪志). In-depth culture conditions of a Cephalosporium sinensis strain(一种虫草头孢菌深层培养条件的研究). J Microbiol(微生物学杂志), 2006 26(1): 51
- 12 GAO Hong(高红). Chemical constituents and pharmacological activities of Cordyceps mycelia(冬虫夏草菌丝体的化学成分和药理作用). Chin Mag Clin Med Prof Res(中华临床医学研究杂志), 2005 11(12): 1734
- 13 XIANG Min(向敏). Cordyceps sinensis(冬虫夏草). Biol Teach(生物学教学), 2004 29(1): 56
- 14 WENG Chao-ming(翁超明). Medicinal value and clinical application of Jinshuibao(金水宝的药用价值及临床应用). Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2000 7(4): 75
- 15 MIAO Jing-shu(沙静姝), MAO Hong-ku(毛洪奎). Jinshuibao capsule (Cordyceps mycelia) [金水宝胶囊(发酵虫草菌粉)]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1994, 29(4): 245
- 16 XU Fang-yun(徐方云). Study on pharmacological effect of Cordyceps sinensis and Cordyceps mycelia(冬虫夏草及其发酵菌丝体的药理药效学研究). Drug Eval(药品评价), 2005, 2(5): 334
- 17 CHEN Yue-ying(陈月英), QIAN Yue-mei(钱月梅). Application of Jinshuibao capsule on kidney diseases(金水宝胶囊在肾脏疾病中的应用). Guid China Med(中国医药指南), 2007 5(9): 32
- 18 LIANG Gui-wen(梁贵文), TIAN Hua-qin(田华琴), HUANG Zhi-qing(黄志庆), et al Clinical observation of Jinshuibao combined microwave coagulation therapy on advanced hepatoma(金水宝联合微波热凝固治疗中晚期肝癌的临床观察). Cap Med(首都医药), 2007, (8): 16
- 19 LI Huo-jin(李火金), SUN Lian-jie(孙连杰), SHI Ming(史明), et al Clinical study on treatment of climacteric syndrome with Jin Shui Bao capsules in males(金水宝胶囊治疗男性更年期综合症的疗效观察). Chin J Nat Med(中国自然医学杂志), 2006 8(1): 23
- 20 WU Shu-bin(邬暑滨). Curative effect of Jinshuibao on hyperlipemia(金水宝治疗高血脂症疗效观察). Appl J Gen Pract(实用全科医学), 2007, 5(6): 520
- 21 WEI Xin-li(魏鑫丽), YIN Xiang-chu(印象初), GUO Ying-lan(郭英兰), et al Analyses of molecular systematics on Cordyceps sinensis and its related taxa(冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析). Mycosystema(菌物系统), 2006, 25(2): 192
- 22 ZHU Ming(祝明), JIN Zhang-zhao(金樟照), CHEN Yong(陈勇), et al Identification of Bailing capsule by RP-HPLC fingerprint(百令胶囊的指纹图谱鉴别研究). Chin Tradit Pat Med(中成药), 2007, 29(9): 1254
- 23 YANG Guang(杨光), YANG Rong-he(杨荣和), ZHOU Da-xi(周大熙), et al Overview of quantity and curative effect of Zhiling capsule(至灵胶囊品质与疗效综述). Beijing J Tradit Chin Med(北京中医), 1998 (3): 62
- 24 DENG De-hong(邓德宏). Clinical observation of Zhiling capsule

- on chronic bronchitis(至灵胶囊治疗慢性支气管炎临床疗效观察). *Mod Med Health* (现代医药卫生), 2002, 18(2): 124
- 25 PAN Chi(潘池). Clinical observation of Zhiling capsule combined chemotherapy on advanced esophageal carcinoma(至灵胶囊结合化疗治疗晚期食管癌临床观察). *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med* (浙江中西医结合杂志), 2000, 10(12): 745
- 26 XING Chun-qing(邢春清), LI Wen-quan(李文泉), XU Xiaoyun(徐孝云), et al. Curative effect of Zhiling capsule on nephrostenia syndrome(至灵胶囊治疗103例肾虚证临床疗效观察). *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医), 1998(5): 63
- 27 HU Shi-zhao(胡世昭), YAO Yun-xiu(姚云秀), FENG Riguan(冯日官), et al. Curative effect of Zhiling capsule on chronic hepatitis(至灵胶囊治疗慢性乙肝的疗效观察). *Shanxi J Tradit China Med* (山西中医), 1989, 5(6): 20
- 28 ZHANG Jian-yun(张建云), ZENG Ke-xiong(曾克雄). Determination of adenosine in Ningxinbao capsule by HPLC(HPLC法测定宁心宝胶囊中腺苷的含量). *Guangxi Med J* (广西医学), 2006, 28(5): 742
- 29 SUO Zhirong(索志荣), LU Xiaozhen(刘效珍). Clinical observation of Ningxinbao on premature ventricular contraction(宁心宝治疗室性早搏的临床观察). *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis* (中西医结合心脑血管病杂志), 2005, 3(7): 643
- 30 ZHONG Ling(钟灵), ZHONG Yi(钟毅), ZHOU Hong(周红). Clinical research of Ningxinbao capsule on hyperlipemia(宁心宝胶囊治疗高脂血症的临床研究). *Res Tradit Chin Med* (中医药研究), 2000, 16(3): 8
- 31 WANG Jun(王军). Application of Xinganbao capsule on viral hepatitis B(心肝宝胶囊在乙型病毒性肝炎中的应用). *Her Med* (医药导报), 1997, 16(5): 226
- 32 YAN Ru-jie(鄢如杰), LI Yu-zhen(李玉珍), SU Rui-xing(苏瑞星). Treatment of pulmonary carcinoma with *Cordyceps mycelia* preparation Xinganbao capsule(以“心肝宝胶囊”等虫草菌丝制剂为主治疗肺癌50例). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1992, 12(2): 61
- 33 WU Chang-qing(武常青), CAI Li-gui(蔡礼贵). Curative effect of Xinganbao capsule on chronic hepatitis B(心肝宝胶囊治疗慢性乙型肝炎疗效观察). *Shanxi Med J* (山西医药杂志), 1997, 26(6): 552
- 34 YAN Jun-pan(严君藩), BAO Zhong-xian(包忠宪), LI Cai-hong(吕彩虹). Treatment of arrhythmias in children with Xinganbao capsules(心肝宝胶囊治疗小儿心律失常50例). *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 1992, 12(11): 680
- 35 XIAO Xin-yue(肖新月), LI Yuan-ke(李远科), ZHANG Ping(张萍), et al. RP-HPLC determination of nucleosides in Ningxinbao capsules(宁心宝胶囊中5种核苷类成分的RP-HPLC定量分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(10): 1592
- 36 RUAN Pei-chun(阮培春). Determined the content of polysaccharide in cultured *Cordyceps mycelia* (人工虫草菌丝多糖含量测定). *J Baoding Teach Coll* (保定师范专科学校学报), 2005, 18(4): 63
- 37 GE Xin(葛新), LI Yun-kan(李云兰), Bai Xiaohong(白小红), et al. Determination of polysaccharide in cultured *Cordyceps mycelia* by colorimetric method(比色法测定人工虫草菌丝多糖含量). *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2001, 32(5): 418
- 38 MA Cheng-jian(马成坚), GU Ya-ping(顾亚萍), LIU Qing(芦青). Extraction and determination of polysaccharide of *Cordyceps* in Bailing capsules(百令胶囊中虫草多糖的提取和含量测定). *J Zhejiang Coll Tradit China Med* (浙江中医学院学报), 2004, 28(4): 81
- 39 PENG Ke-huai(彭科怀), ZHAO Nian-hua(赵年华). Determination of mannitol in fermented *Cordyceps sinensis* preparation(发酵虫草菌粉制品中甘露醇的测定). *J Occup Health Damage* (职业卫生与病伤), 2005, 20(3): 207
- 40 YANG Xiaodong(杨晓东), CUI Qin-min(崔勤敏), ZHU Miao-qin(朱妙琴), et al. Determination of mannitol in fermented *Cordyceps sinensis* by colorimetric method(发酵虫草菌粉中甘露醇含量的比色法测定). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2006, 23(6): 504
- 41 WANG Bo(王波), XU Zhe(徐哲), JIN Shun-ji(金顺姬), et al. Determination of D-mannitol in *Cordyceps militaris* by gas chromatography(气相色谱法测定蛹虫草中D-甘露醇的含量). *J Changchun Coll Tradit Chin Med* (长春中医学院学报), 2005, 21(2): 37
- 42 DUAN Shao-jun(段韶军), ZHANG Zhong-peng(张志鹏), LI Feifei(李菲菲), et al. Determination of ergosterin in Chinese caterpillar fungus by reversed-phase high-performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定人工虫草中麦角甾醇的含量). *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2006, 37(6): 611
- 43 CHANG Hong(常泓), ZHANG Jie(张婕). Determination of the mannitol and ergosterol of *Cordyceps barnesii thwaites* and *Cordyceps sinensis*(香棒虫草和冬虫夏草中甘露醇和麦角甾醇的测定分析). *J Shanxi Agric Univ* (山西农业大学学报), 2001, 21(1): 63
- 44 Yuan Jian-Ping Wang Jiang-Hai Liu Xin. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosterol esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chem*, 2007, 105: 1755
- 45 HUANG Lan-fang(黄兰芳), GUO Fang-qi(郭方适), LIANG Yi-zeng(梁逸曾), et al. Determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps sinensis* and *C. militaris* with HPLC-ESI-MS(HPLC-ESI-MS测定冬虫夏草和蛹虫草中腺苷和虫草素含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(8): 762
- 46 ZHANG Suo-sheng(张朔生), MA Shuang-cheng(马双成). Determination of adenosine in Zhiling capsule by HPLC(高效液相色谱法测定至灵胶囊中腺苷的含量). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2005, 19(5): 298
- 47 HAI Xue-wu(海学武), LU Hai-long(逯海龙), QIANG Mao(强茂), et al. HPLC determination of adenosine in Chongcao Chuanbei Zhikegao(高效液相色谱法测定虫草川贝止咳膏中腺苷的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24(2): 210
- 48 XIONG Jin-gui(熊金桂). Investigation of quantitative control of adenosine in Jinshu Kang Chongcaogao(金水康虫草膏中腺苷含量测定方法的探讨). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(1): 39

- 49 QI Mei(祁梅), LIU Hui(刘晖). Determination of adenosine in Chongcaoqizhi Granule by HPLC(高效液相色谱法测定虫草杞芝颗粒中腺苷的含量). *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2006 13(4): 46
- 50 JU Jian-ming(鞠建明), QIAN Da-wei(钱大玮), ZHU Ling-ying(朱玲英), et al Determination of cordycepin in Dongxian capsule by HPLC(HPLC测定冬仙胶囊中虫草素的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2005 27(2): 215
- 51 JIN Hu(金晖). Determination of adenosine in Chongcaoqizhi capsule by HPLC(HPLC测定虫草益肺胶囊中腺苷的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2006 28(1): 147
- 52 MA Qiang(马强), ZHOU Yu-xin(周玉新), LEI Hai-min(雷海民), et al Determination of icariin and adenosine in *Cordyceps vigorine* tablet by HPLC(HPLC测定虫草片中淫羊藿和腺苷的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2005 27(6): 648
- 53 Yang FQ, Guan J, Li SP. Fast simultaneous determination of 14 nucleosides and nucleobases in cultured *Cordyceps* using ultra-performance liquid chromatography. *Talanta*, 2007, 73: 269
- 54 MILI-li(米莉莉), ZHANG Su-wen(张素文), SUN Jia-jin(孙家进), et al Study of nucleotides in *Cordyceps* and its mycelia by TLC-scanning(冬虫夏草及人工虫草核苷类成分的 TLCs 研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2003 25(5): 402
- 55 XU Jian-jun(徐健君), ZHAI Hai-yun(翟海云), CHEN Zuan-guang(陈缵光), et al Determination of effective constituents in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection(毛细管电泳高频电导法测定虫草中的有效成份). *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2005 17(5): 644
- 56 HOU Xiao-rong(侯晓蓉), LIAN Lian-jun(栾连军), CHENG Yi-yu(程翼宇). Quantitative analysis of the nucleosides in *Cordyceps sinensis* with capillary zone electrophoresis(冬虫夏草中核苷类成分的毛细管区带电泳定量分析研究). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005 30(6): 447
- 57 CHEN Chang(陈畅), LUO Shan-shan(罗珊珊), SHI Yan-qiu(史艳秋), et al Study on nucleotide in strum of *Cordyceps sp.* by HPLC-MS(液质联用对两种虫草中核苷类成分的研究). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2005 26(5): 260
- 58 WANG Chen-guang(王晨光), WU Xue-min(吴学敏), LIU Yan-ping(刘艳萍), et al Analysis of the amino acid content in *Cordyceps sinensis* (虫草菌丝氨基酸含量分析). *J Jinchou Med Coll*(锦州医学院学报), 1998, 19(5): 13
- 59 TAO Qiao-feng(陶巧凤), ZHANG Yue-ying(章月英), HUANG Zhong-yu(黄宗玉). Analysis of amino acids in fermental *Cordyceps sinensis* powder precolumn derivatization by high performance liquid chromatography(用高效液相色谱法柱前衍生测定发酵虫草菌粉氨基酸成分). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1996, 17(1): 27
- 60 ZHAO Chen(赵琛), QU Hai-bin(瞿海斌), CHENG Yi-yu(程翼宇). A new approach to the fast measurement of content of amino acids in *Cordyceps sinensis* by ANN-NR(虫草氨基酸的人工神经网络-近红外光谱快速测定方法). *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 50
- 61 SHI Ji-hong(石继红), Dang Hua-ning(党化宁), WAN Yi-wan(万一), et al Comparative analysis of proteins from natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* (冬虫夏草菌丝体与天然冬虫夏草蛋白成分的分析比较). *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2003, 10(5): 304
- 62 ZHONG Wei-jian(仲伟鉴), ZHANG Xiao-qiang(张小强), PU Yue-pu(浦跃朴), et al A comparative study of inorganic elements between *Cordyceps sinensis* and mycelium of cultured *Cordyceps sinensis* (冬虫夏草与人工虫草菌丝体无机元素含量的比较). *Chin J Environ Occup Med* (环境与职业医学), 2004 21(4): 330
- 63 WU You-liang(吴友良), GONG Cheng-liang(贡成良). Research on medical contents and pharmacological action of *Cordyceps sinensis* (关于虫草的药用成分和药理作用的研究). *J Changshu Coll*(常熟高专学报), 2003 17(2): 65
- 64 ZHANG Guan-qun(张冠群), LI Yan(李艳), CHEN Hai-zhen(陈海珍), et al Analysis of trace elements in *Ganoderma lucidum* and *Cordyceps mycelia* (灵芝及虫草菌丝体中微量元素含量的分析). *Guangdong Trace Elem Sci* (广东微量元素科学), 2000, 7(4): 49
- 65 MO Ming-he(莫明和), CHI Sheng-qi(迟胜起), Zhang Ke-qin(张克勤). Microcycle condensation of *Cordyceps sinensis* and anamorph isolation (冬虫夏草微循环产孢及其无性型的分离). *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(4): 482

(本文于 2008年 12月 2日收到)