

天然虫草与人工虫草菌粉的显微和薄层定性鉴别研究

李琼¹ 季巧遇²

(1 江西中医药大学 南昌 330004; 2 江中药业股份有限公司 江西南昌 330006)

摘要:目的:建立区分人工虫草菌粉与天然虫草的显微鉴别和薄层鉴别两种定性鉴别方法。方法:收集江西国药厂生产的人工虫草菌粉“蝙蝠蛾拟青霉菌 CS-4”及天然虫草,制作虫草菌粉的水合氯醛加热透化片、天然虫草的石蜡切片及对照品大豆的显微装片进行显微观察;取样品溶液、对照品溶液各 2 μl 点于硅胶 G 薄层板上,以正乙烷:乙酸乙酯(7:3)为展开剂制作薄层色谱。结果:显微鉴别中大豆渣和虫草菌粉显微装片中看见了亚棱形细胞及油室,而天然虫草中则未观察到这些特征;薄层鉴别中大豆异黄酮混合对照品的色谱中出现两个特征斑点,人工虫草菌粉样品色谱在相应位置有对应的斑点出现,而天然虫草色谱中则未显现此特征斑点。结论:这两种方法可有效区分粉碎或加工成制剂的人工虫草菌粉与天然虫草,为鉴别人工虫草菌粉和天然冬虫夏草提供了一种辅助手段。

关键词:天然虫草;虫草菌粉;鉴别;大豆异黄酮

中图分类号:R965

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.11.050

人工培养的虫草菌粉是从天然冬虫夏草中分离出的虫草真菌,经培养、发酵而得到的菌丝。人工发酵虫草的深入研究和开发利用,为拓宽天然冬虫夏草的资源开辟了有效的途径。人工虫草菌粉发酵中离不开的养料是培养基,查阅文献可知^[1]常用的天然培养基有:蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、黄豆饼粉培养基、玉米粉培养基等。根据文献报道人工虫草菌粉培养基营养物质的来源可能会选用黄豆饼粉培养基。因此本研究从大豆培养基组成的角度入手,探讨鉴别天然虫草与人工虫草菌粉的新思路和新方法,通过显微、TLC 建立鉴别天然虫草与人工虫草菌粉的方法,此方法可有效区分粉碎或加工成制剂的人工虫草菌粉与天然虫草。

1 药材来源

冬虫夏草中的真菌是一种子囊菌,在其生活史中有分生孢子阶段(无性型)和子囊孢子阶段(有性型)。在人工培养发酵等实际生产中使用的都是冬虫夏草无性型菌种。经过文献调查总结与冬虫夏草有关的无性型菌种报道有 22 个学名,涉及 13 个属,如中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao & Shi)、虫草头孢菌(*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov)、中国被毛孢(*Hirsutella Liu, Guo, Yu&Zeng*)、中国弯颈霉(*Tolypocladium sinense* Li)、蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepialid* Chen & Dai)等。目前,这些人工虫草菌粉制成的制剂,在临床应用较为广泛,并取得了一定的治疗效果。比如:“金水宝胶囊、金水宝片”是蝙蝠蛾拟青霉菌制剂^[2]，“百令胶囊”是中国被毛孢菌制剂^[3],这两个药品已被列入《中国药典 2010》的成分制剂和单味制剂目录。本文收集了 1 个产地的天然冬虫夏草及 11 个批次的江西国药厂

生产的人工虫草菌粉“蝙蝠蛾拟青霉菌 CS-4”(以下简称“虫草菌粉”)进行研究。

2 显微鉴别

查阅关于天然冬虫夏草的鉴别研究文献资料有一些报道,如:李文佳等^[4]从性状鉴别、显微鉴别、分子生物学鉴别和化学鉴别(理化鉴别、光谱鉴别、色谱鉴别和色谱-光谱联用鉴别)四个方面,对近 10 年来国内外冬虫夏草真伪鉴别方法研究文献进行了概括和总结;徐红等^[5]采用性状、显微鉴别方法与 RAPD-SCAR 标记对中药冬虫夏草进行鉴别研究。结果在性状鉴别的基础上,详细描述了中药冬虫夏草的横切面结构与粉末特征,提供了直观、真实的药材性状及显微鉴别数码成像图谱;戎海东^[6]对冬虫夏草及常见伪品(伪虫草地蚕、分枝虫草、新疆虫草、凉山虫草、伪虫草僵蚕、亚香棒虫草、模型压制伪虫草)从来源、形态、性状、颜色、显微、质地、气味等方面进行了鉴别阐述。但这些都是单独对冬虫夏草本身,或与伪品冬虫夏草之间的鉴别。而人工虫草菌粉的显微鉴别无文献报道,关于区分人工虫草菌粉与天然冬虫夏草在运用显微鉴别这方面还是空白。

2.1 材料与试剂 对照品:大豆(市场购买);药材:天然虫草、11 个批次的虫草菌粉;试剂:石蜡,酒精,福尔马林,冰醋酸,1%番红,0.5%固绿,蒸馏水,水合氯醛、甘油、乙醇、二甲苯均为分析纯。载玻片、盖玻片、刀片、剪刀、吸水纸、擦镜纸、水合氯醛、稀甘油、稀碘液、蒸馏水。

2.2 试验方法

2.2.1 对照品大豆显微装片制备 取用接种棒挑取大豆粉末少许、用水制作临时装片,镜下观察。

2.2.2 人工虫草菌粉显微装片制备 用接种棒挑

取菌粉,放在滴有纯化水的载玻片上,轻轻将菌粉展开,制作 1-11 号人工虫草菌粉样品的水合氯醛加热透化片。

2.2.3 天然冬虫夏草石蜡切片制备 按石蜡切片法制作冬虫夏草石蜡切片。制作步骤:固定→脱气→脱水→透明→浸蜡→包埋→切片→粘片→烤片→染色→脱水→透明→封片→干燥→拍照。

2.3 实验结果

2.3.1 菌丝的观察 取天然冬虫夏草石蜡切片在显微镜下观察天然虫草子座的横切面,可看见发达的菌丝,紧密结合成一定的形状。而所有人工虫草菌粉的水合氯醛透化装片在在显微镜下则看见其单独的菌丝,且多为淡黄色。见图 1、图 2。

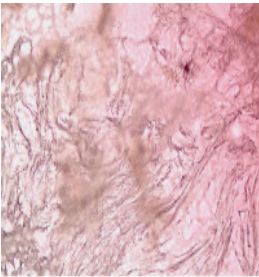


图 1 冬虫夏草石蜡切片

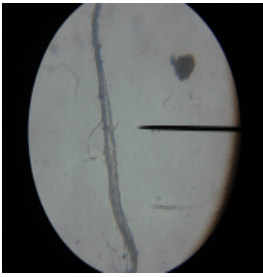


图 2 人工虫草菌粉水合氯醛装片

2.3.2 大豆显微结构特征的观察 据文献报道,大豆的显微特征有亚棱形细胞及油室。因此本实验对大豆渣、天然虫草及 11 个批次的虫草菌粉样品的显微装片进行了观察,在大豆渣和 11 个批次的虫草菌粉显微装片中看见了亚棱形细胞及油室。而天然虫草中则未观察到这些特征。结果表明虫草菌粉的培养基组成中含有大豆。

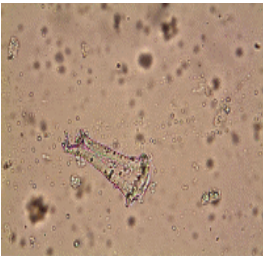


图 3 对照品(大豆渣):亚棱形细胞

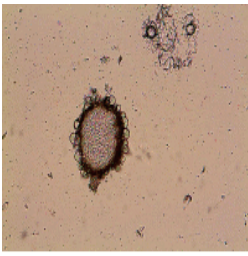


图 4 对照品(大豆渣):油室

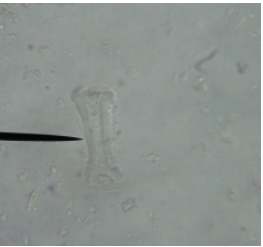


图 5 人工虫草菌粉:亚棱形细胞

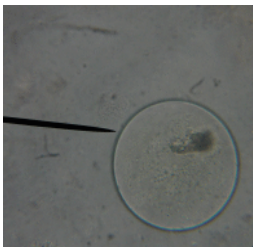


图 6 6 人工虫草菌粉:油滴

2.4 讨论 虫草菌粉中观察到了到亚棱形细胞及油室,通过对大豆显微装片进行同样的观察比较,认为这些是大豆的显微特征结构。表明该虫草菌粉样品在培养过程使用的是黄豆饼粉培养基。由此得出结论:可利用大豆显微特征亚棱形细胞及油室来区别由黄豆饼粉培养基培养的虫草菌粉与天然虫草和其它培养基培养的人工虫草菌粉。

3 薄层鉴别

查阅关于冬虫夏草与人工虫草菌粉运用薄层色谱扫描法(TLCS)比较的文献,大多是关于腺苷类的薄层图谱,且大多文献中的薄层图谱都表明天然虫草与人工虫草菌粉有类似的化学成分。如胡侃等^[6]采用薄层色谱法比较冬虫夏草与固体发酵虫草在化学成分上的相似性,结果表明固体发酵虫草斑点位置同冬虫夏草基本一致,只是大小有所差别;童应凯等^[7]运用 TLCS 法比较了糖醇成分、游离氨基酸、生物碱、甾醇类、核苷类成分,结果表明发酵虫草菌丝体与天然冬虫夏草的斑点基本相同。本文主要根据上述显微鉴别结果,对黄豆饼粉培养基中的有效成分大豆异黄酮进行了薄层色谱研究,建立鉴别虫草菌粉与天然虫草的薄层色谱鉴别方法,以此区分虫草菌粉与天然虫草。

3.1 仪器与试剂

3.1.1 仪器与设备 薄层制板器(重庆南岸贝尔德仪器技术厂制作);智能恒温电热套(巩义市予华仪器有限公司);CAMAG Linomat 5 半自动点样仪(瑞士 CAMAG);REPR-OSTAR 3 薄层色谱摄影仪(瑞士 CAMAG);SCANNER 3 薄层色谱扫描仪(瑞士 CAMAG);AEL-200 电子天平(Xiangxi Banlance factory);METTLER AE240 电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司);AB204-N 分析天平(梅特勒托利多仪器有限公司);恒温水浴锅(国华电器有限公司);AB204-N 型精密分析天平(METTLER TOLE 上海衡器有限公司);939 薄层制板仪(重庆南岸贝尔德仪器技术厂);60 型粉碎机(哈尔滨纳诺医药化工设备有限公司);自动双重纯水蒸馏器(上海申生科技有限公司)。

3.1.2 药材与试剂 对照品:大豆异黄酮标准品(中国药品生物制品检定所);大豆甙(Daidzin)、染料木甙(Genistin)、大豆素(Daidzein)、染料木素(Genistein);药材:天然虫草、11 个批次的虫草菌粉;试剂:无水乙醇,95%乙醇,甲醇,乙酸乙酯,正己烷、硫酸均为分析纯,水为双蒸水。高效硅胶 G 预制板(10 cm× 20 cm,5 cm× 10 cm)。

3.2 试验方法

3.2.1 对照品溶液的制备 取大豆异黄酮混合对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,配制成每 1 ml 约含大豆苷、大豆素、染料木苷、染料木素各 1 mg 的溶液。

3.2.2 供试品溶液的制备 取各样品 1 g,精密称定。加 95%乙醇溶液 10 ml,超声 50 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 ml 使溶解,即得。

3.2.3 展开剂的筛选 展开剂 I:苯:乙酸乙酯:甲醇:异丙醇:浓氨液(6:3:1.5:1.5:0.5);展开剂 II:氯仿:乙酸乙酯:异丙醇:水(8:2:6:0.5);展开剂 III:环己烷:乙酸乙酯(9:1);展开剂 IV:正乙烷:乙酸乙酯(7:2);展开剂 V:正乙烷:乙酸乙酯(7:3)。对以上展开系统进行考察,最后确定以展开剂 V 正乙烷:乙酸乙酯(7:3)系统分离效果最佳。

3.2.4 点样、展开和显色 取供试品溶液、对照品溶液各 2 μl 点于硅胶 G 薄层板上,以展开剂 V 正乙烷:乙酸乙酯(7:3)为展开剂,置层析缸内,展开,取出,挥干溶剂,喷以 10%硫酸乙醇溶液,105 ℃加热 3~5 min,立即在紫外灯(365 nm)下观察。

3.3 试验结果

3.3.1 大豆异黄酮成分薄层色谱实验结果 取 0 号天然虫草,1 号虫草菌粉样品,大豆异黄酮混合对照品按上述方法点样、展开和显色,在紫外灯(365 nm)下观察。结果表明,大豆异黄酮混合对照品的色谱中出现两个特征斑点,虫草菌粉样品色谱在相应位置有对应的斑点出现,而天然虫草色谱中则未显现此特征斑点。见图 7。

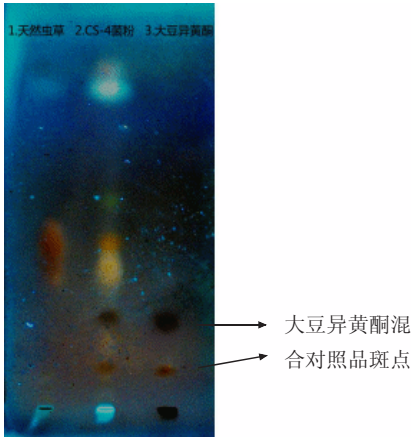


图 7 天然虫草、CS-4 菌粉、大豆异黄酮对照品薄层色谱图

3.4 讨论 本实验通过 5 种不同的展开系统进行了比较实验。结果以展开剂正乙烷:乙酸乙酯(7:

3)系统分离效果最佳。此系统能较好地分离出大豆异黄酮成分。建立了区分天然虫草与黄豆饼粉培养基发酵的人工虫草菌粉鉴别方法,为区分天然虫草及虫草菌粉提供了一个简单易行的鉴别方法。

4 结论

近年来,人工虫草菌粉的药品及功能性保健品不断开发问世,如卫生部批准的人工发酵虫草制剂“宁心宝胶囊”、“金水宝胶囊”、“百令胶囊”。大量研究报道人工发酵培养所获得的虫草菌粉其有效成分、药理作用及临床效果与天然虫草相似。如汪宇等^[8]利用高效液相色谱法测定天然冬虫夏草和蛹虫草及其人工培养物中 3 个核苷类化合物含量,表明天然虫草与人工虫草培养物有相似的核苷类化合物。孟庆繁等^[9]对人工培养蛹虫草与青海产野生冬虫夏草的氨基酸含量进行测定,结果表明:野生冬虫夏草中所含有的各种氨基酸在人工培养虫草的子实体及菌丝体中都有存在。

文献中大多报道人工虫草菌粉与天然虫草有类似的化学成分。无法区分人工虫草菌粉及天然虫草,尤其是粉碎或加工成制剂后的产品。不能有效解决人工虫草菌粉用药混乱这一问题。本文从人工虫草菌粉的发酵培养基角度思考,探讨了鉴别人工虫草菌粉与天然虫草的新思路和新方法,建立了鉴别人工虫草菌粉与天然虫草的显微、TLC 两种定性鉴别方法。这两种方法可有效区分粉碎或加工成制剂的人工虫草菌粉与天然虫草,为鉴别人工虫草菌粉和天然冬虫夏草提供了一种辅助手段。

参考文献

[1]黄年来.中国食用菌百科[M].北京:中国农业出版社,1997.245-250
[2]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,2015.832,1072-1074
[3]李文佳,汪小东,艾中,等.冬虫夏草真伪鉴别方法研究进展[J].中国现代中药,2014,16(11):881-887
[4]徐红,董婷霞,赵奎君,等.中药冬虫夏草的鉴别研究[J].中国药学杂志,2014,49(4):283-286
[5]戎海东.关于冬虫夏草及其几种常见伪品的鉴别[J].内蒙古中医药,2015,34(1):111,134
[6]胡侃,方道硕,唐艳萍,等.TLC 法定性比较冬虫夏草与固体发酵虫草[J].中国药房,2008,19(15):1180-1182
[7]童应凯,邝涛,吴雅欣,等.虫草菌丝体与天然冬虫夏草成分的比较[J].食品研究与开发,1997,18(4):408-409
[8]汪宇,杨光照,康万军,等.高效液相色谱法测定天然冬虫夏草和蛹虫草及其人工培养物中 3 个核苷类化合物含量[J].中国医院药学杂志,2015,35(9):805-808
[9]孟庆繁,林相友,李威,等.人工培养蛹虫草与野生冬虫夏草氨基酸含量的比较[J].氨基酸和生物资源,2005,27(2):33-34

(收稿日期: 2015-09-10)