

---

## 中国被毛孢发酵液中一种镇静催眠活性物质的分离纯化和结构鉴定

丁婷<sup>1,2</sup> 邵颖<sup>1,3</sup> 樊美珍<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>安徽农业大学微生物防治省重点实验室 合肥 230036

<sup>2</sup>安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036

<sup>3</sup>徐州工程学院 徐州 221008

---

**摘要:** 本研究对中国被毛孢*Hirsutella sinensis*菌株RCEF0273发酵液的乙酸乙酯粗提物中的镇静催眠活性物质进行了分析。通过活性指导下的色谱分离,从乙酸乙酯提取物中得到了一种白色晶体化合物,质谱(MS)和核磁共振(NMR)的鉴定结果表明该化合物为茶碱-9-葡萄糖苷。活性试验显示该化合物可抑制小鼠的自发活动,缩短小鼠入睡潜伏期,延长小鼠睡眠持续时间,具有镇静催眠活性。

**关键词:** 活性指导下的分离, 茶碱-9-葡萄糖苷

---

## Isolation and identification of sedative and hypnotic compound from the fermentation broth of *Hirsutella sinensis*

DING Ting<sup>1,2</sup> SHAO Ying<sup>1,3</sup> FAN Mei-Zhen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

<sup>2</sup>School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

<sup>3</sup>Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China

**Abstract:** The acetylacetate extract of the fermentation broth of *Hirsutella sinensis* RCEF0273 having sedative and hypnotic activity was analysed. By means of bioactive guided isolation of column chromatography and high

performance chromatography, a white pure compound was obtained, and the compound was identified as 9-glucopyranosyl theophylline by the methods of mass spectroscopy (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Sedative and hypnotic activity of 9-glucopyranosyl theophylline was traced, and the results showed the compound significantly inhibited the spontaneous activity of rats. Moreover, the compound shortened the sleep latency, and prolonged the duration of sleep of rats.

**Key words:** bioactive guided isolation, 9-glucopyranosyl theophylline

现代社会, 随着人们生活方式及所承受社会压力的不断增加, 睡眠质量成为衡量人们身体健康与否的重要标志。由于睡眠质量下降而导致的失眠、健忘等已严重影响人们的学习、生活。新近多种流行病学调查资料表明, 国外约35.2%的人有不同程度的失眠 (Chase & Roth 1999; Schubert *et al.* 2002; Foley *et al.* 1995; Sukying *et al.* 2003; Chiu *et al.* 1999; Maggi *et al.* 1998); 中国卫生部一项统计资料也显示, 目前国内失眠者已达120-140万人, 失眠率高达10%-20%。随着多种应激因素的加剧, 失眠已成为现代社会的常见病与高发病, 其发病率正在快速攀升。而且由于睡眠质量下降引起的发病人群也由老年人进一步扩展到中年人, 甚至是青少年人群。因此, 解决睡眠质量问题的势在必行。

目前从天然资源中筛选新的药物先导化合物仍是药物研究中的重要指导思想, 大量研究也已表明昆虫病原真菌是最有可能从中发现新型药物先导化合物的类群之一 (Schmidt *et al.* 2003; Hu *et al.* 2002; Jim *et al.* 1999)。冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 作为昆虫病原真菌的一种, 是鳞翅目蝙蝠蛾科蝠蛾属幼虫被中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X. J. Liu *et al.* 寄生后形成的虫菌复合体, 为我国珍贵中药材之一。目前冬虫夏草及其无性型菌株中国被毛孢的药理保健作用已经得到证实 (温元祥和穆殿平 1998; Nakamura *et al.* 1999; Chen *et al.* 1997)。

近年来, 随着人们对冬虫夏草需求的增加和野生冬虫夏草资源的逐渐枯竭, 加之天然冬虫夏草的价格昂贵, 人们开始探索用人工方法培育冬虫夏草。迄今为止, 深层发酵研究已取得了较大的进展, 且生产出的替代品 (菌丝体), 其成分和药效也与天然虫草相似, 都含有粗蛋白、氨基酸、微量元素、多糖、核苷、黄酮和皂甙等多种活性物质。这些活性化合物的存在, 使得冬虫夏草及其菌丝体具有广泛的生理活性, 均具有免疫调节、镇静和抗惊厥作用、抗菌等药理作用。但目前冬虫夏草替代品的利用主要集中于发酵所得的菌丝体, 对于另一发酵产物——发酵液则研究较少, 不但冬虫夏草无性型——中国被毛孢发酵液中的化学成分鲜有研究, 而且其药理方面仅有对其抑菌、补肾壮阳方面的少量报道 (程显好和白毓谦 1995; 尚德静和吕国枫 1996)。鉴于此种情况, 本课题组前期对冬虫夏草无性型菌株——中国被毛孢发酵液进行镇静催眠的药理试验, 结果显示它具有较强的镇静催眠活性且乙酸乙酯粗提物的活性较强。因此, 本研究将中国被毛孢发酵液的乙酸乙酯有机相进行活性指导下的镇静催眠活性物质的成分分离以及结构鉴定, 以期为冬虫夏草无性型菌株——中国被毛孢发酵液的开发应用提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:** 冬虫夏草无性型——中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X. J. Liu, Y. L. Guo, Y. X. Yu & W. Zeng (菌株号为 RCEF0273), 由安徽省微生物防治重点实验室提供。

**1.1.2 仪器和试剂:** 主要仪器: FreeZone12 冷冻干燥系统, 美国 LABCONCO 公司; GY-70C30L-300L 发酵设备, 江苏理工大学; 梅特勒 AE200 型电子天平, 上海分析仪器厂; SENCO R-502B 型旋转蒸发器, 上海申胜生物技术公司; 高效液相色谱仪, 韩国 YOUNGLIN 公司 (SP930D 高压泵、UV730D 检测器、Autochro2000 色谱工作站、SDV30 混合器); 分析柱 ODS<sub>2</sub> C<sub>18</sub> (4.6mm×250mm, 5μm), 美国 Waters 公司; HPLC-MS, ESI 离子源, 美国 Agilent 公司; 核磁共振仪 400MHz, 美国 BRUKER 公司。

主要试剂: 柱层析硅胶 (70-150μm), 中国医药集团上海化学试剂公司; GF<sub>254</sub> 高效薄层硅胶板, 青岛海洋化工厂分厂; 色谱纯甲醇、色谱纯乙腈, 江苏恒安试剂公司; 分析纯乙酸乙酯, 淮南化学试剂厂; 分析纯甲醇, 上海一试剂化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 乙酸乙酯粗提物的制备:** 将培养好的发酵醪经高速离心机 14,000r/min 离心, 取离心后的发酵液 40℃ 真空浓缩至原液的 1/5, 用 3 倍体积 95% 的乙醇醇沉, 4℃ 静置 24h, 过滤取上清液浓缩脱醇。然后将脱醇后的发酵液依次用 3 倍石油醚、乙酸乙酯依次萃取, 并将所得乙酸乙酯有机相低温 (40℃) 真空浓缩蒸干, 得乙酸乙酯粗提物浸膏。

**1.2.2 乙酸乙酯粗提物的分离纯化:** 石油醚溶解薄层层析硅胶 H<sub>60</sub> 进行湿法装柱 (Φ=4.5cm, H=100cm)。将乙酸乙酯组分 (7.2g) 用适量甲醇溶解后, 用薄层层析硅胶 H<sub>60</sub> (15g) 搅拌均匀, 浓缩成干粉, 干法加到硅胶柱的上部。采用石油醚—乙酸乙酯—甲醇洗脱系统进行梯度洗脱。自动分步收集, 逐管点样进行薄层分析 (展开剂为乙酸乙酯: 甲醇=10:1, 显色剂为硫酸-水溶液和碘化铯钾试剂), 合并组成相似的组分, 共得 10 个部分。

**1.2.3 试验动物:** 昆明种小鼠由安徽医科大学实验动物中心提供。体重 18-22g, 雌雄各半。实验前先饲养观察一周。饲养条件: 饲养室光照充足, 通风良好, 室温 20-25℃, 湿度 50%-65%。

**1.2.4 乙酸乙酯粗提物经柱色谱分离所得 10 个组分的镇静催眠活性鉴定:** 对其 10 个流分进行镇静催眠活性跟踪, 观察 10 个组分对小鼠自发活动的影响 (中华人民共和国卫生部药政管理局 1993): 110 只昆明种小鼠, ♀ ♂ 各半, 随机分成 11 组 I、II、III……X、正常对照组, 每组 10 只。各组小鼠静脉 (iv) 给药 5min 后, 将小鼠投入自发活动仪中适应 5min 后, 记录给药后 10min 各组小鼠 5min 内自发活动数。

**1.2.5 活性组分镇静催眠物质的分离纯化:** 将活性组分 IX 低温浓缩, 4℃ 下静止放置 24h, 发现容器底部有大量白色晶体析出, 分析知析出的晶体易溶于水, 微溶于甲醇, 不溶于丙酮和乙酸乙酯, 鉴于此, 将其用甲醇溶液洗涤 4-5 次, 最终得到 46mg 白色晶体, 并将其标记为 IX-1。结合前期薄层层析试验的结果, 本次试验只对白色晶体 IX-1 进行分析, 对析

出白色晶体的母液不作进一步研究。

白色晶体IX-1的分析：采用分析型HPLC对IX-1进行分析。色谱条件为：取白色晶体IX-1配制成约1mg/mL的样品溶液，然后进样5 $\mu$ L以甲醇0%-100%，水100%-0%的梯度进行梯度洗脱，0-10min 甲醇0%-20%，10-20min 甲醇20%-100%，20-30min 100%甲醇洗脱，洗脱速度为1mL/min，洗脱时间40min，色谱柱为Waters ODS<sub>2</sub>C<sub>18</sub>，DAD检测波长为200nm-400nm。

**1.2.6 纯化合物的镇静催眠活性试验：**将化合物进行镇静催眠活性实验，观察该化合物对小鼠镇静催眠作用的有无以及作用强弱。

小鼠自发活动实验：小鼠40只，♀♂各半，随机分成4组，分别为：正常组(NS)、化合物IX-1(0.5、1、2mg/kg)。各组小鼠静脉(iv)给药5min后，将小鼠投入自发活动仪中适应5min后，记录给药后10min、45min 各组小鼠5min内自发活动次数。

小鼠走动时间和举双肢法：小鼠40只，♀♂各半，随机分成4组，分别为：正常组(NS)、化合物IX-1(0.5、1、2mg/kg)。各组小鼠静脉(iv)给药5min后，将小鼠投入底部垫有木屑的箱中适应5min后，记录2min内小鼠走动时间及双前肢向上抬举次数。

小鼠戊巴比妥钠阈下催眠剂量试验：小鼠85只，♀♂各半，分成二大组，第一大组又分成3小组，每组15只，分别腹腔注射戊巴比妥钠20、25和30mg/kg，测得其对小鼠的最大阈下催眠剂量。第二大组随机分成4组，每组10只，分别为：正常组、化合物IX-1(0.5、1、2mg/kg)。静脉注射受试药30min后，各鼠腹腔注射所测得的戊巴比妥钠最大阈下催眠剂量(25mg/kg)，以翻正反射消失为入睡时间，从翻正反射消失至恢复时间为睡眠持续时间。

**1.2.7 试验动物体重及外观形态的观察：**小鼠40只，♀♂各半，随机分成4组，每组10只，每天通过静脉注射饲喂受试药。第1、2、3组注射的受试药浓度分别为0.5mg/kg(低剂量组)、1mg/kg(中剂量组)、2mg/kg(高剂量组)，第4组以清水作对照。试验30d后对小鼠的外观形态及体重进行综合分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙酸乙酯萃取物的分离纯化

本研究利用常压硅胶柱色谱对乙酸乙酯萃取物进行分离，然后应用高效液相色谱法进行纯化和制备。

**2.1.1 活性组分的初步分离：**将10个部分进行小鼠自发活动的镇静催眠试验，试验结果表明组分IX的活性较强，在1.215mg/kg的剂量浓度下对小鼠自发活动的抑制率为8.1%。

**2.1.2 活性组分的进一步纯化：**色谱分析发现白色晶体IX-1仅有一个主峰，进一步的HPTLC和HPLC的分析表明该主峰为一纯的化合物，将该主峰主要部分制备收集，脱溶后真空冷冻干燥得到白色粉末38mg。

### 2.2 结构鉴定

**2.2.1 质谱分析：**取纯化后的冻干粉配制成0.1mg/mL的甲醇溶液进HPLC-MS分析。结果显示：阴离子模式(NEG ION Mode) M/Z: 341.1108[M-H]、683.2273[2M-H]两个峰。可

知IX-1化合物的分子量为342，可能分子式为 $C_{13}H_{18}N_4O_7$ 。

用分子量(342)在Chapman & Hall天然产物数据库中检索，发现目前报道的茶碱-9-葡萄糖苷(9-glucopyranosyl theophylline)的分子量恰好是342，与本研究的MS分析结果一致；此外，9-glucopyranosyl theophylline为白色粉末状化合物，此与本研究得到的化合物一致。因此，可初步推断本研究的纯化合物可能为茶碱-9-葡萄糖苷。

**2.2.2 核磁共振波谱分析(NMR)：**为进一步证实前面的推断，本研究继续用NMR进行分析。取纯化后的白色粉末10mg溶于氘代水中进行测试，结果显示此化合物的 $^1H$ 图谱上仅在位移值为3.3和3.4ppm处有两组独立甲基，它们恰好与茶碱-9-葡萄糖苷两个氮原子上的两个甲基的质子一致，位移值为5.9ppm的氢则应为茶碱-9-葡萄糖苷连接在成苷的端基碳上的质子。而在此化合物的 $^{13}C$ 图谱上，可观察到有13个碳的信号，其中位移值在60-80ppm之间的五个碳应是接杂原子的碳，为糖上的碳；位移值为107ppm的碳则是糖的端基碳，由于此碳的信号偏向低场，应接有苷元；而位移值119ppm和160ppm之间还存在五个不饱和碳，且由于此化合物的分子式为 $C_{13}H_{18}N_4O_7$ ，进一步得知位移值为156ppm和153ppm的碳应是接氮原子的羰基碳。因此，结合此化合物的质谱、氢谱以及碳谱，可知此化合物为茶碱-9-葡萄糖苷(见图1)。

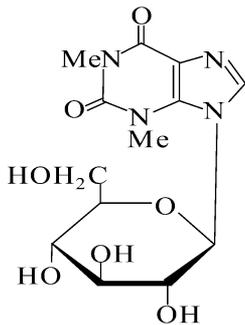


图1 茶碱-9-葡萄糖苷结构图

Fig.1 Structure of 9-glucopyranosyl theophylline.

## 2.3 纯化合物的镇静催眠活性试验

**2.3.1 受试药对小鼠自发活动的影响：**静脉内(iv)给药45min时，1.0、2.0mg/kg的化合物可显著减少小鼠自发活动的次数(表1)。

表1 受试药对小鼠自发活动的影响( $\bar{X} \pm S$ , n=10)

Table 1 Spontaneity of rats treated with 9-glucopyranosyl theophylline

组别 Group	剂量(mg/kg) Dose (mg/kg)	10min		45min	
		活动数/5min Spontaneous activity frequency/5min	抑制率/% Inhibition rate/%	活动数/5min Spontaneous activity frequency/5min	抑制率/% Inhibition rate/%
正常组 Control	—	114±13	—	144±25	—
化合物 Treatment	0.5	119±20	-4.3	128±18	11.1
	1	118±19	-3.5	122±17*	15.3
	2	115±18	-0.9	108±13**	25.0

注：\*与对照组差异显著 P<0.05；\*\*与对照组差异显著 P<0.01。

Note: \*Significantly differ from the control P<0.05; \*\*Significantly differ from the control P<0.01.

**2.3.2 受试药对小鼠走动时间和前肢向上抬举次数的影响:** 表 2 结果表明, 受试药 (0.5、1.0、2.0mg/kg) 可减少小鼠走动时间, 且受试药 (1.0、2.0mg/kg) 使前肢向上抬举次数减少, 提示受试药对小鼠的自发活动有一定的抑制作用。

表2 受试药对小鼠走动时间及前肢向上抬举次数的影响 ( $\bar{X} \pm S$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Walking time and frequency of forefoot heavings of rats treated with 9-glucopyranosyl theophylline

组别	剂量 (mg/kg)	走动时间 (s)	前肢向上抬举次数 (次)
Group	Dose (mg/kg)	Walking time (s)	Frequency of forefoot heavings (times)
对照	-	44.45 ± 14.38	17.75 ± 5.92
Control			
化合物	0.5	29.22 ± 11.43*	13.35 ± 4.88
Treatment	1.0	24.95 ± 13.16**	11.90 ± 5.98*
	2.0	20.89 ± 7.97**	9.90 ± 3.55**

注: \*与对照组差异显著  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组差异显著  $P < 0.01$ .

Note: \*Significantly differ from the control  $P < 0.05$ ; \*\* Significantly differ from the control  $P < 0.01$ .

**2.3.3 受试药对阈下剂量的戊巴比妥钠催眠的影响:** 与对照比较, 2.0mg/kg 的化合物可显著促进阈下剂量的戊巴比妥钠催眠作用, 缩短小鼠入睡时间, 延长睡眠持续时间 (表 3)。

表3 化合物对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠时间的影响 ( $\bar{X} \pm S$ ,  $n = 10$ )

Table 3 Sleep latency and sleep duration of rats treated with 9-glucopyranosyl theophylline solution under the induction of pentobarbital sodium

组别	剂量 (mg/kg)	入睡时间 (s)	睡眠持续时间 (min)
Group	Dose (mg/kg)	Sleep latency (s)	Sleep duration (min)
正常组	-	225.6 ± 54.6	79.4 ± 21.6
Control			
化合物	0.5	187.6 ± 43.1	91.4 ± 30.7
Treatment	1.0	173.9 ± 19.3*	105.1 ± 22.6*
	2.0	162.1 ± 30.8**	117.4 ± 21.0**

注: \*与对照组差异显著  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组差异显著  $P < 0.01$ .

Note: \*Significantly differ from the control  $P < 0.05$ ; \*\* Significantly differ from the control  $P < 0.01$ .

## 2.4 试验动物体重及外观形态的观察结果

观察结果表明各组小鼠行为活跃, 精神、食欲好, 口、鼻、眼无异常分泌物, 体重增加, 与对照组相比均无显著性差异 (图2)。

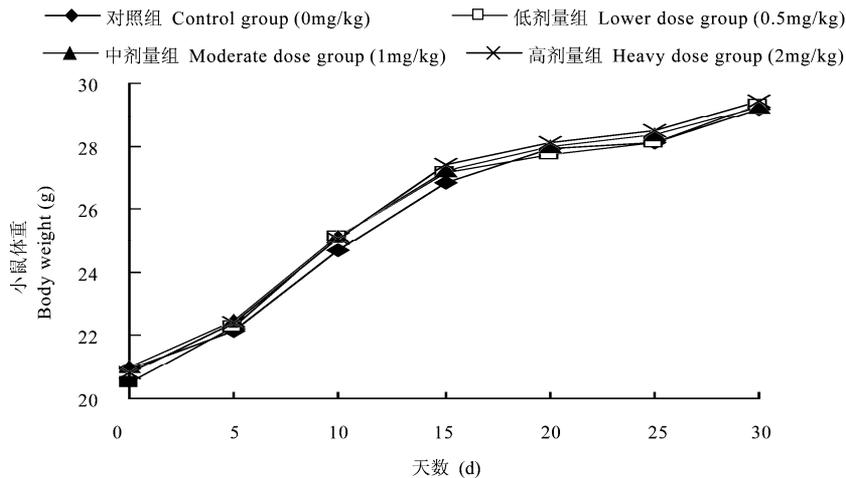


图 2 小鼠 30 天体重变化曲线

Fig. 2 Curves of body weight of rats in 30 days treated with different dose of 9-glucopyranosyl theophylline.

### 3 讨论

从中国被毛孢菌株次生代谢产物（发酵液）的乙酸乙酯提取物得到了具有镇静催眠活性的化合物茶碱-9-葡萄糖苷（9-glucopyranosyl theophylline）。此化合物虽为已知化合物，但在冬虫夏草无性型菌株——中国被毛孢的发酵液中分离得到尚属首次，其具有的镇静催眠药理作用也属首次发现。

对茶碱-9-葡萄糖苷进行镇静催眠活性试验发现其对小鼠具有镇静催眠活性，产生这一现象的原因是否是因为茶碱-9-葡萄糖苷进入小鼠体内后与某一特定受体接合生成新物质尚不清楚。这种新物质能够激活睡眠调节中枢，并抑制觉醒调节中枢，产生镇静催眠作用；茶碱-9-葡萄糖苷进入小鼠体内后，可能在某些分解型酶类的作用下分解为葡萄糖和嘌呤碱，其中嘌呤碱在小鼠体内通过特定的代谢合成途径，降低脑内谷氨酸的含量，抑制由谷氨酸受体介导的神经细胞信号转导，从而降低了小鼠细胞的兴奋性，表现出镇静催眠作用。这一现象有待于采用神经电生理技术对其作进一步的研究证明。

体重是反映动物生长状态的重要指标，本试验中将化合物茶碱-9-葡萄糖苷静脉注射到小鼠体内，对其进行长时间观察，发现实验动物的精神状态和饮食正常，体重增加，从而反映动物发育正常，且体重增加量未表现出相应的剂量-效应关系。

近年来，随着失眠人群人数的直线上升，镇静催眠的药物研究普遍引起药理及临床工作者的重视。现代医学领域，治疗失眠的主要手段依然是药物治疗。然而长期服用安眠药物如咪唑安定、艾司唑仑等易产生依赖性、耐药性、毒性，而且药物不能从根本上改善睡眠质量（陈树林 1998）。因此，越来越多的人倾向于使用无毒害、无副作用的天然药物治疗失眠，从而达到“标本兼治”的目的。

本试验表明中国被毛孢菌株的次生代谢产物中含有具有镇静催眠活性的化合物茶碱-9-葡萄糖苷，且动物试验结果显示此化合物不影响动物的正常发育。在后续研究中，将对此化合物做进一步的毒理试验，研究多次重复给药条件下小鼠血液中各种生化指标（白细胞、红细胞、血红蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶等）的含量变化，观察试验动物长期服用该化合物对其骨髓造血机能及肾脏代谢功能的影响，从而为冬虫夏草无性型菌株中国

被毛孢发酵液的开发应用提供重要的毒理学依据。

## [REFERENCES]

- Anon., 1993. Guide of western medicine and new drug studies. Pharmacy, pharmacology, toxicology. Edited by Bureau of Drug Administration, Ministry of Health, P. R. China. 47-49 (in Chinese)
- Chase M, Roth T, 1999. Insomnia. Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California, Los Angeles. 12-34
- Chen SL, 1998. The non-drug treatment of insomnia. *Chinese Journal of Clinical Psychology*, **6**(2): 129-130 (in Chinese)
- Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY, 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human eukemic U937 cells. *Life Sciences*, **60**(25): 2349-2359
- Chen XH, Bai MQ, 1995. Studies of the antibacterial substance produced by the mycelia and the fermentation broth of *Cordyceps sinensis*. *Edible Fungi of China*, **14**(3): 37-38 (in Chinese)
- Chiu HF, Leung T, Lam LC, Wing YK, Chung DW, Li SW, Chi I, Law WT, Boey KW, 1999. Sleep problems in Chinese elderly in Hong Kong. *Sleep*, **22**(6): 717-726
- Foley DJ, Monjan AA, Brown SL, Brow SL, Simonsick EM, Wallace RB, Blazer DG, 1995. Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities. *Sleep*, **18**(6): 425-432
- Hu FL, Schmidt K, Stoyanova S, Li ZZ, Grafe U, Hamburger M, 2002. Radical scavengers from the entomogenous deuteromycete *Beauveria amorpha*. *Planta Medica*, **68**: 64-66
- Jim WB, Leonard L, Jeff C, 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, **51**: 891-898
- Maggi S, Langlois JA, Minicuci N, Grigoletto F, Pavan M, Foley DJ, Enzi G, 1998. Sleep complaints in community-dwelling older persons: prevalence associated factors and reported causes. *Journal of the American Geriatrics Society*, **46**(2): 161-168
- Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M, 1999. Activation of *in vivo* kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, **79**(4): 505-508
- Schubert CR, Cruickshanks KJ, Dalton DS, Klein B, Klein R, Nondahl DM, 2002. Prevalence of sleep problems and quality of life in an older population. *Sleep*, **25**(8): 889-893
- Schmidt K, Riese U, Li ZZ, Hamburger M, 2003. Novel tetramic acids and pyridone alkaloids, militarinones B, C, and D, from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces militaris*. *Journal of Natural Products*, **66**(3): 378-383
- Shang DJ, Lu GF, 1996. Effect of *Cordyceps sinensis* broth and medicinal preparation on improvent of kidney and sexual function. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **27**(9): 134-137 (in Chinese)
- Sukying C, Bhokakul V, Udomsubpayakul U, 2003. An epidemiological study on insomnia in an elderly Thai population. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **86**(4): 316-324
- Wen YX, Mu DP, 1998. Pharmacological effect and clinical application of *Cordyceps sinensis*. *Tianjin Pharmacy*, **10**(1): 47-50 (in Chinese)

## [附中文参考文献]

- 陈树林, 1998. 失眠的非药物治疗. 中国临床心理学杂志, **6**(2): 129-130
- 程显好, 白毓谦, 1995. 冬虫夏草菌丝体及发酵液中抗菌活性物质的初步研究. 中国食用菌, **14**(3): 37-38
- 尚德静, 吕国枫, 1996. 冬虫夏草发酵液及冬虫夏草制剂的补肾壮阳作用的研究. 中草药, **27**(9): 134-137
- 温元祥, 穆殿平, 1998. 冬虫夏草的药理作用及临床应用. 天津药学, **10**(1): 47-50
- 中华人民共和国卫生部药政管理局, 1993. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学·毒理学). 47-49