

蝉花抗真菌活性成分的分离纯化研究

徐红娟^{1,2}, 莫志宏¹, 余佳文¹, 毛先兵^{2*}, 朱华李²¹重庆大学化学化工学院, 重庆 400044; ²重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要: 通过抗真菌实验进行活性跟踪, 采用 NKA 大孔吸附树脂和硅胶两步柱色谱对蝉花中抗真菌活性成分进行分离纯化; 并通过红外、质谱进行结构鉴定。结果表明, 分离得到的抗真菌活性成分为多球壳菌素, 对真菌的最小抑制浓度为 0.02 mg/mL。本研究为进一步研究蝉花及制备医药工业所需的多球壳菌素提供了依据。

关键词: 蝉花; 抗真菌活性; 分离纯化; 大孔吸附树脂; 硅胶柱色谱; 多球壳菌素

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Separation and Purification of Anti-fungal Compound from *Cordyceps cicadae*

XU Hong-juan^{1,2}, MO Zhi-hong¹, YU Jia-wen¹, MAO Xian-bing^{2*}, ZHU Hua-li²¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China²Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract The method of separation and purification anti-fungal component from mycelia of *Cordyceps cicadae* was established. NKA macroporous adsorption resin and silica gel two steps of column chromatograph were used to separate the active component which was screened by antifungal experiment and then the qualitative analysis was conducted by FTIR and MS. The result indicated that myricin was obtained which is the main anti-fungal active component in *C. cicadae*, and showed significant anti-fungal activity with MIC of 0.02 mg/mL. The result provides the valuable basis for better understanding *C. cicadae* and preparing myricin for pharmaceutical industry.

Key words *Cordyceps cicadae*; anti-fungal activity; separation and purification; macroporous adsorption resin; silica gel column chromatography; myricin

蝉花 (*C. cicadae*) 属虫生性药用真菌, 是我国传统的一种名贵中药材。由于蝉花与冬虫夏草同属真菌复合体, 且具有相近的药用价值, 所以医家常将蝉花作为冬虫夏草的代用品^[1]。近年对蝉花化学成分、药理作用进行了不少研究, 发现其具有广泛的生物活性。柴一秋等^[2]从蝉花中提取得到 N₆-(2-羟乙基)腺苷, 该化合物具有镇痛、Ca²⁺拮抗作用和肌肉收缩的活性。Kuo 等从蝉花中分离得到白僵菌酮、白僵菌素甲和白僵菌素乙等多种成分, 药理实验显示此类环肽化合物具有抗肿瘤、抗惊厥、抗心律失常、镇静等作用^[3,4]。还有文献报道蝉花所含化学成分具有免疫调节、抗细菌及抗真菌等多种活性^[5-8]。近年来随着抗生素的迅速发展和广泛应用, 细菌及真菌耐药性增加, 致使一些抗生素的疗效降

低和条件性致病菌增加, 在临床上造成一定的威胁。因而需要不断筛选新结构和新型抗菌作用的抗生素以满足临床需要。目前国内外尚未见对蝉花进行抗真菌活性成分跟踪筛选的报道, 本研究拟采用此方法对蝉花进行研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 包括 2996 DAD 检测器、在线脱气机、自动进样器、柱温箱; FTIR-8000 傅立叶变换红外分光光度计 (日本岛津公司); ABI Q-TRAP 质谱仪 (美国应用生物系统公司)。

蝉花 (*C. cicadae*) 菌种由本实验室分离筛选获得。蝉花菌发酵采用液体发酵法^[7]。指示菌株白色念珠菌 (中国药品生物制品检定所), 酮康唑 (西安杨森制药有限公司), 牛津杯 (本实验室自制)。

NKA 大孔吸附树脂 (天津南开大学化工厂), 柱

收稿日期: 2008-12-05 接受日期: 2009-02-20

基金项目: 重庆市科委科技攻关项目 (8848)

* 通讯作者 Tel: 86-23-89029037; E-mail: maoxianb@ yahoo.com.cn

色谱 200 ~ 300 目硅胶 (青岛海洋化工厂分厂), 琼脂粉 (成都市科龙化工试剂厂, 批号: 070811), 乙腈 (色谱纯, 美国 TED A), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 薄层色谱 (TLC) 条件

将待检测样品溶于甲醇作为点样液, 用内径 0.5 mm 的毛细管在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上点样, 样点干燥后放入密闭的层析缸中展开, 展开剂: 氯仿: 甲醇: 水 (6.5: 3.0: 0.5 V/V)。展开后挥干溶剂用碘蒸汽显色, 茚三酮显色用茚三酮溶液 (质量浓度 2%) 喷雾后于 105 ~ 110 °C 烘箱加热显色。

1.2.2 高效液相色谱 (HPLC) 条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 (GL Sciences Inc., 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈: 水 (75: 25 V/V, 经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤), 进样量: 10 μL, 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 201 nm, 柱温: 35 °C。

1.2.3 抗真菌实验方法 (杯碟法)

将白色念珠菌菌苔刮入无菌水后, 配制成浓度为 10^8 CFU/mL 菌悬液。将灭菌后的培养基分装于平板, 取该菌悬液 200 μL 均匀涂布于 PDA 固体平板培养基上, 用灭过菌的镊子夹取无菌牛津杯放置于平皿菌层上, 定量加入新配制的样品溶液 200 μL 于杯内。最后将平皿放入 35 °C 恒温培养箱中培养 24 h^[8], 同时设置阳性对照 (酮康唑) 和空白对照 (无水乙醇)。

1.2.4 蝉花菌丝体提取液的制备

将培养好的蝉花菌过滤, 所得菌丝体水洗两次后进行干燥处理, 称取干燥菌丝体粉末 5 g 用 95% 乙醇 50 mL 回流提取 3 次, 合并提取液, 过滤后于 60 °C 减压浓缩至干, 再用 5 mL 无水乙醇溶解, 制成质量浓度为 1.0 g/mL 的样品, 离心取上清液以备用。

1.2.5 大孔吸附树脂柱色谱

取经过预处理的 NKA 大孔吸附树脂适量, 采用常规湿法装柱 (Φ15 mm × 400 mm), 在装柱过程中始终保持液面高于树脂层面 5 cm 以上。将蝉花菌丝体提取液用水稀释至乙醇含量为 20%, 以 1 BV/h 的流速流过 NKA 吸附树脂, 使树脂充分吸附平衡。用乙醇水溶液作为洗脱系统, 按极性从大到小的顺序, 选择不同的梯度进行洗脱, 每个梯度为 3 ~ 4 倍柱床体积, 洗脱液用 100 mL 锥形瓶收集, 每瓶 50 mL, 于 60 °C 减压浓缩蒸干后用甲醇溶解, 进行抗真菌实验活性跟踪, 合并抗菌活性较强的馏分, 离心后

低温干燥得粗品。

1.2.6 硅胶柱色谱

取适量 200 ~ 300 目硅胶, 用乙酸乙酯拌匀后装柱 (Φ15 mm × 400 mm), 用洗脱剂淋洗并平衡色谱柱, 备用。大孔吸附树脂粗品用无水乙醇溶解, 搅拌均匀使样品充分吸附于少量预处理过的硅胶上后挥干溶剂上样。洗脱液于 60 °C 减压浓缩蒸干后用甲醇溶解, 进行抗真菌实验活性跟踪, 合并有抗菌活性且薄层色谱显色相同的馏分, 离心后低温干燥得纯化后样品。

2 结果与讨论

2.1 大孔吸附树脂柱色谱

蝉花菌丝体提取液通过杯碟法抑制白色念珠菌实验结果见图 1(a), 从图中可见提取液 (质量浓度为 1.0 g/mL) 抑菌圈直径为 1.8 cm, 而酮康唑 (质量浓度为 2.0 mg/mL) 的抑菌圈直径为 2.8 cm (以上抑菌圈直径均包括牛津杯直径 0.6 cm 在内), 表明蝉花提取液具有抗真菌作用。为了从蝉花中分离抗菌活性成分, 本研究采用 NKA 非极性大孔吸附树脂, 并通过抗真菌实验跟踪活性成分, 用乙醇水溶液梯度洗脱。大孔吸附树脂的 70% 乙醇洗脱液抑制白色念珠菌实验结果见图 1(b), 从图中可见 70% 乙醇洗脱液 (质量浓度为 5.0 mg/mL) 抑菌圈直径为 2.1 cm, 表明 70% 乙醇洗脱液具有较好的抗菌活性; 而上样流出液、20% 乙醇洗脱液及 40% 乙醇洗脱液无抗菌活性。同时发现, 低于 40% 乙醇液却能较好的洗脱糖类、蛋白质及色素等极性较大的水溶性杂质。因而, 采用 20%、40% 和 70% 乙醇溶液顺序梯度洗脱分离抗菌活性成分。

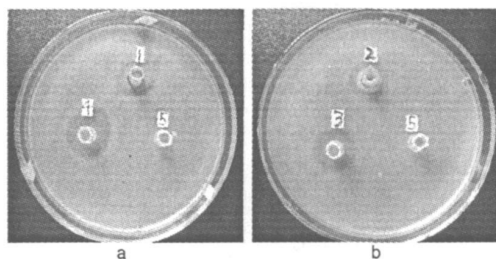


图 1 抗菌效果图

Fig. 1 Oxford cup tests of *C. cicadae*

1 蝉花菌丝体提取液 Extract of *C. cicadae*; 2 70% 乙醇洗脱液 Eluent of 70% ethanol from macroporous adsorption resin; 3. 硅胶洗脱馏分 Eluent from silica gel 4 阳性对照 positive control 5. 阴性对照 blank control

2.2 硅胶柱层析

蝉花菌丝体提取液、大孔吸附树脂 70% 乙醇洗脱液在碘蒸气和茚三酮显色下的薄层色谱图见图 2 可见 70% 乙醇洗脱液和菌丝体提取液有相近的显色斑点, 70% 乙醇洗脱液主要富集了蝉花菌丝体提取液靠近薄层板前端的物质, 特别是在 R_f 为 0.65 处有相同的显色斑点, 而普通显色剂碘蒸气显色较茚三酮显色显示更多的物质斑点。另外, 70% 乙醇洗脱液的薄层色谱抑菌实验显示 70% 乙醇洗脱流出液在 R_f 为 0.65 处具有明显的抑菌圈 (结果未给出), 因而 R_f 为 0.65 处的物质为蝉花的主要抗菌成分。

为了进一步纯化蝉花抗菌活性成分, 本研究选用硅胶柱色谱。用薄层色谱法探索柱层析的分离条件, 尽管三氯甲烷/甲醇/水体系展开效果较好 (图 2), 但考虑到工业放大时此溶剂体系不利于工业化, 故硅胶柱色谱拟选择毒性较小的洗脱体系。筛选了乙酸乙酯/正丁醇、乙酸乙酯/无水乙醇、乙酸乙酯/无水乙醇/甲酸、乙酸乙酯/无水乙醇/乙酸、乙酸乙酯/无水乙醇/氨水等展开体系, 除了乙酸乙酯/无水乙醇/甲酸展开体系, 其余展开体系显色斑点拖尾严重。薄层色谱进一步分析显示乙酸乙酯/无水乙醇/甲酸比例为 7:3:1 和 6:4:1 时, 主要抗菌活性成分的 R_f 分别为 0.57 和 0.66 符合 $0.3 \leq R_f \leq 0.7$ 的条件^[9]。但由于湿法装柱的硅胶柱色谱中, 固定相预先吸附了流动相, 使吸附活性较薄层色谱低, 需选用的流动相极性要小于薄层色谱, 故选用展开剂乙

酸乙酯/无水乙醇/甲酸比例为 7:3:1 作为硅胶柱色谱洗脱系统。

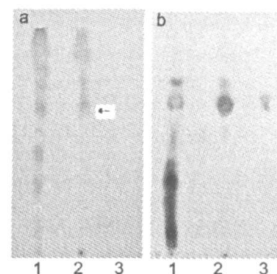


图 2 TLC 图

Fig. 2 TLC chromatogram

1 菌丝体提取液 Extract of *C. cicadae*; 2 70% 乙醇洗脱液 Eluent of 70% ethanol from macroporous adsorption resin; 3 硅胶洗脱馏分 Eluent from silica gel

抗菌活性跟踪硅胶柱色谱洗脱液并收集了活性馏分, 如图 1b, 可见样品 3 (质量浓度为 2.0 mg/mL) 抑菌圈直径为 2.3 cm, 表明其具有更强的抗菌活性。由图 2b 可以看出, 硅胶柱色谱洗脱馏分与大孔吸附树脂 70% 乙醇洗脱液在同一比移值 R_f 为 0.65 处有相同的显色斑点, 且斑点集中, 可能是单一成分。但是碘蒸气显色不如茚三酮灵敏, 当两张薄层板中硅胶洗脱馏分点样量相同的情况下, 图 2 (a) 中样品 3 碘蒸气显色斑点几乎观察不到。

2.3 硅胶柱色谱洗脱活性馏分最小抑菌浓度的测定

测定了蝉花菌丝体硅胶柱色谱洗脱活性馏分不同浓度的抑菌效果, 结果见表 1。

表 1 蝉花菌丝体硅胶洗脱馏分最小抑菌浓度的测定结果

Table 1 Result of MIC for eluent from silica gel in *C. cicadae*

供试菌 Microbial strain	蝉花菌丝体硅胶洗脱馏分 / (mg/mL) Concentration of eluent from silica gel in <i>C. cicadae</i>				
	0.002	0.02	0.2	2	20
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	-	+	++	+++	+++
黑曲霉菌 <i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	++	+++
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-

注: “-”表示未见抑菌圈; “+”表示可见抑菌圈; “++”表示抑菌圈直径不大于 2 cm; “+++”表示抑菌圈直径大于 2 cm; 以上抑菌圈直径均包括牛津杯直径 (0.6 cm)。

Note: “-” inhibitory zone was invisible; “+” inhibitory zone was visible; “++” zone’s diameter was no more than 2 centimeters; “+++” zone’s diameter was more than 2 centimeters. The diameter of Oxford cup (0.6 cm) was included in the zone’s diameter.

由表 1 可看出, 硅胶柱色谱洗脱活性馏分对白色念珠菌和黑曲霉菌的 MIC 均为 0.02 mg/mL, 显示了硅胶柱色谱洗脱活性馏分对真菌具有较强的抗菌活性, 而对细菌没有明显抑制作用。

2.4 高效液相色谱 (HPLC) 分析

取硅胶柱色谱洗脱活性馏分 10 μ L, 按 1.2.2 项下条件注入液相色谱仪, 结果见图 3 可见在保留时间为 10.1 min 出现一个峰, 峰形良好 (保留时间

约 3 min 的峰为溶剂峰)。对此峰用 DAD 检测器进行光谱图分析及用 Waters 色谱工作站软件进行纯度检查(结果未给出), 结果显示该峰是单一峰, 且为末端吸收。

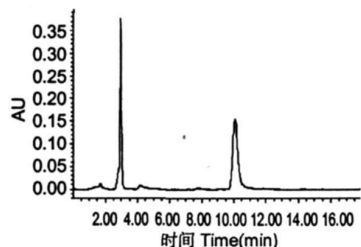


图 3 硅胶柱色谱活性馏分 HPLC 图

Fig 3 HPLC Chromatogram of eluent from silica gel in *C. cicadae*

2.5 红外光谱 (FTIR) 分析

取硅胶柱色谱活性馏分挥发干溶剂后的粉末约 2 mg 在玛瑙研钵中充分研细, 再加入约 200 mg 干燥 KBr 粉末, 继续研磨 2 ~ 5 min, 装入压片机压成透明薄片, 直接放入傅立叶变换红外分光光度计中进行扫描, 扫描范围 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 所得红外光谱图见图 4。由图可见, 在 3440.8 、 2958.6 、 2929.7 、 1666.4 、 1537.2 、 1450.4 、 1384.8 、 1082.0 cm^{-1} 处有较强吸收, 与文献^[6]报道的多球壳菌素相似。

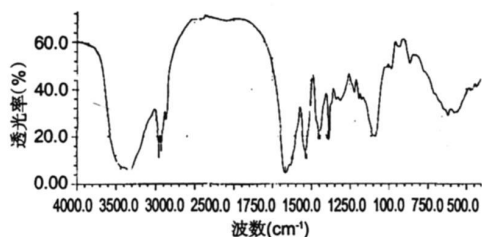


图 4 硅胶柱色谱活性馏分红外图

Fig 4 FTIR of eluent from silica gel in *C. cicadae*

2.6 质谱 (MS) 分析

取硅胶柱色谱活性馏分 2 μL 注入质谱仪进行质谱分析, 扫描范围 m/z 为 $100 \sim 800$ 。在 ESI 负离子全扫描方式下, 主要生成 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 得其 $(M-H)$ 为 400.3 (结果未给出), 分子量为 401, 与文献^[10, 11]报道的多球壳菌素相同。

3 结论

本研究对蝉花中抗真菌活性成分进行了分离纯化并对目标化合物初步进行了结构鉴定。分离纯化流程依次采用 NKA 大孔吸附树脂吸附、硅胶柱色谱

系统。实验证明 NKA 大孔吸附树脂用于初步分离蝉花抗真菌活性成分是可行的, 主要抗菌活性成分在 70% 乙醇洗脱液中; 进一步通过硅胶柱色谱纯化得到单一活性成分。综合上述 TLC、HPLC、FTIR、MS 等数据, 可判定硅胶柱色谱活性馏分为多球壳菌素。多球壳菌素显示了多种显著的药理作用, 特别是具有显著的免疫抑制活性和抗动脉粥样硬化^[7, 12], 值得进一步研究。本实验采取两步柱色谱分离纯化蝉花中的多球壳菌素, 工艺简单, 所用溶剂毒性小、安全, 适合工业生产的要求。

参考文献

- 1 Wang CL (王春雷), Lu BZ (芦柏震), Hou GL (侯桂兰). Advances in studies on *Cordyceps cicadae*. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41: 244-247.
- 2 Chai YQ (柴一秋), Wei ZM (韦忠民), Chen ZA (陈祝安), et al. The method for N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine extraction from *Paecilomyces cicadae* (从蝉拟青霉培养物中提取 N6-(2-羟乙基)腺苷的方法). *CN200610008465.7*, 2006-9-6.
- 3 Kuo YC, Lin LC, Don MJ, et al. Cyclobutylpeptide and dioxanopholine derivatives isolated from the insect body portion of the fungus *Cordyceps cicadae*. *J Chin Med*, 2002, 13: 209-219.
- 4 Lin H, Lee Y, Chen B, et al. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*, 2003, 230: 248-259.
- 5 Duarte N, Ferreira MJ, Martins M, et al. Antibacterial activity of ergosterol peroxide against *Mycobacterium tuberculosis* dependence upon system and medium employed. *Phytother Res*, 2007, 21: 601-604.
- 6 Kluepfel D, Bagli J, Baker H, et al. Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*. *J Antibiot*, 1972, 25: 109-115.
- 7 Fu JJ, Inoue K, Yamamoto S, et al. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot*, 1994, 47: 208-215.
- 8 Chen AH (陈安徽), Li CR (李春如), Fan MZ (樊美珍). Scavenging and antifungal activities of the metabolite of *Paecilomyces cicadae*. *Mycosystema* (菌物学报), 2008, 27: 405-412.
- 9 Zhao HP (赵和平), Gao HW (郜洪文), Hu FL (胡丰林), et al. Isolation and purification of antitumor compounds from submerged fermentation of *Paecilomyces militaris*. *Chin J Biotechnol* (中国生化药物杂志), 2006, 27: 193-197.

(下转第 835 页)

($P_{BC} > 0.05$)。

2.6 回归模型的有效性验证

A、B、C 分别取值为 -1、-1、1 时, 回归模型预测的 DS 值为 2.13。3 次重复试验的 DS 均值为 2.103 ± 0.07, $|t| = 0.4158 < t_{0.05, 2}$, $P > 0.05$, 这表明实际值与理论预测值差异不显著, 说明该模型的预测条件与实际情况较符合。

本试验通过 Box-Behnken 设计建立了当归多糖硫酸酯的平均取代度与反应温度、反应时间、酯化试剂氯磺酸-吡啶比例的三因素的回归模型, 该模型拟合较好, 可以用于量化控制反应条件。三个因素对当归多糖硫酸酯取代度的影响为试剂比例 > 反应温度 = 反应时间, 反应温度和反应时间之间存在极显著的交互作用。

参考文献

- 1 Zhou L (周靓), Meng YW (蒙义文). Studies on antiviral activities of polysaccharides and their derivatives *Chin J Appl Environ Biology* (应用与环境生物学报), 1997, 3(1): 82-90.
- 2 Chen JY (陈景耀), Wu GR (吴国荣), Wang JA (王建安), et al. Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 1: 43-46.
- 3 Wang CY (王长云), Guan HS (管华诗). Advances of researches on antiviral activities of polysaccharides II, antiviral activities of sulfated polysaccharides *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 2000, 20(2): 3-8.
- 4 Thompson DD. Response surface experimentation *Journal of Food Processing and Preservation*, 1982, (6): 155-188.
- 5 Wu DR (吴东儒). Biochemistry of Carbohydrate (糖类的生

物化学), 1st Ed Beijing Higher Education Press (北京高等教育出版社), 1987.

- 6 Zhang LW (张林维), Zhao ZP (赵帜平), Shen YS (沈业寿). Purification and characterization of polysaccharides from *Angelica sinensis* *J Biology* (生物学杂志), 1998, 15(3): 12-14.
- 7 Zhang WJ (张惟杰). Biochemical Techniques Study on Carbohydrate Compound (糖复合物生化研究技术), 2nd Ed Zhejiang University Press, 1992.
- 8 Huang CH (黄才欢). Extraction and Chemical Modification of Pachyman *Jinanjian University* (暨南大学), Master, 2005.
- 9 Huang XY (黄小燕), Kong XF (孔祥峰), Wang DY (王德云), et al. Research progress on sulfating modification of polysaccharides and sulfated polysaccharides *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 4: 328-332.
- 10 Dodgson KS, Price RG. A Note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides *Biochimica*, 1962, 84: 106-110.
- 11 Yang TH (杨铁虹), Jia M (贾敏), Yao XJ (姚秀娟), et al. Sulfation of polysaccharides from *Angelica sinensis* and its effect against L6565 murine retrovirus *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2006, 15: 783-786.
- 12 Huang XY (黄小燕), Hu YL (胡元亮), Lu Y (卢宇), et al. Sulfated modification conditions optimization of *Astragalus* polysaccharide by orthogonal test and anti-IBDV activity determination of the modifiers *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2008, 31: 588-592.
- 13 Yang TH (杨铁虹), Jia M (贾敏), Shang P (商澎), et al. Synthesis of *Angelica sinensis* polysaccharide sulfate and their effects on splenocyte proliferation *in vitro* *J Fourth Military Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22: 432-434.

(上接第 797 页)

- 10 Sasaki S, Hashimoto R, Kiuchi M, et al. Fungal metabolites Part 14. Novel potent immunosuppressants, mycostericins produced by *Mycelia sterilia*. *J Antibiot*, 1994, 47: 420-433.
- 11 Yu JW (余佳文), Mo ZH (莫志宏), Yang MJ (杨明静), et al. Determination of myricetin in *Condyrops cicadae* mycelia

by HPLC with solid-phase extraction *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43: 1191-1193.

- 12 Hojjati MR, Li ZQ, Zhou HW, et al. Effect of myricetin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice *J Biol Chem*, 2005, 280: 10284-10289.