

# 虫草菌 1 号深层培养产物的化学成分\*

吕瑞绵 杨永春 岳德超 王淑芳

樊天觉 霍泽民 王成福 杨云鹏

(中国医学科学院药物研究所,北京)

为解决虫草药源不足和工业化生产虫草菌问题,我们对虫草菌 1 号 (*Cordyceps* sp. NO.1) 深层培养产物的化学成分进行了研究,并与天然冬虫夏草 [*C. Sinensis* (Berk.) Sacc] 和亚香棒虫草 (*C. Hawkesii* Grag) 的化学成分作了比较。从虫草菌 1 号深层培养产物中分离出腺嘌呤、腺嘌呤核苷、尿嘧啶、二十烷、甾糖、甘露醇、麦角甾醇、硬脂酸和 L-丙氨酸九种成分。前 5 种在此菌中尚未见报道。初步证明了虫草菌 1 号深层培养物的一些化学成分与天然虫草类似<sup>[1,2]</sup>。

## 材 料

1. 菌种: 虫草菌 1 号, 自亚香棒虫草保藏菌株分离。

2. CH 培养基(%): 蔗糖 4, 豆饼粉 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, pH6.2。

## 方法和结果

按常规方法分离菌种, 将试管斜面培养的一级种子接种大型摇瓶, 每个摇瓶中盛 1000ml CH 培养基, 24—26℃ 培养 3—5 天。按下述各项进行化学成分的分析。

### 一、二十烷、麦角甾醇、硬脂酸、甘露醇、甾糖的分离和鉴定

虫草菌 1 号菌丝体 500g, 用氯仿-石油醚 (1:1) 回流提取 16 小时, 浓缩得膏 20g, 经硅胶柱层析 (1:50), 用氯仿-己烷-甲醇 (4:0.3:0.2) 为洗脱剂, 共收集 20 份, 每份 150 毫升, 减压浓缩后, 第一部份得淡黄色油状物 0.5g, 硅胶 G 薄层层析检查, 氯仿-丙酮 (3:1) 为展开剂, 0.5% 香荚兰醛浓硫酸显色, 有一紫红色点,  $R_f$  0.85, 质谱  $M/e$  282 ( $M^+$ ), 主要离子裂片峰梯度差

\* 承陈建民、张复文、丛浦珠、侯双州等同志协助进行光谱鉴定, 特此致谢。

14 (—CH<sub>2</sub>—), 分子式 C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>, 红外光谱与烷烃相同。第 3—4 部份得白色结晶 1.8g, m.p. 150—155℃, 质谱 M/e 396 (M<sup>+</sup>), 红外光谱与麦角甾醇光谱一致。第 6—7 部份得白色结晶 70mg, m.p. 69—71℃, 红外光谱与硬脂酸光谱一致。其余部份有待进一步纯化和鉴定。

将上述菌丝体继续用 95% 乙醇回流提取 32 小时, 提取液减压浓缩至一定体积放置, 析出白色针状结晶 2g, 在乙醇中重结晶, m.p. 165—166℃, 元素分析 C 39.78%, H 7.71% (理论计算值 C 39.56%, H 7.69%), 分子式 C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, 红外光谱与甘露醇光谱一致。母液继续放置, 析出白色块状结晶, 用乙醇重结晶得 50mg 结晶, m.p. 137—139℃, 核磁共振谱 (D<sub>2</sub>O) δ 5.17 有一双重峰, δ 3.20—4.05 有多重峰, 核磁共振谱和红外光谱均与鞣糖标准品一致。

## 二、尿嘧啶、腺嘌呤、腺嘌呤核苷、L-丙氨酸的分离和鉴定

将虫草菌 1 号深层培养液 10L 用颗粒活性炭吸附 (1:100), 活性炭风干后用丙酮回流提取 48 小时, 溶液浓缩后析出黄色沉淀 2g (甲)。其菌丝体 200g 用蒸馏水提取 3 次 (50—60℃), 每次 2 小时, 滤液合并, 加入阳离子交换树脂 (734 型) 柱, 用 0.5N 氨水洗脱。收集洗脱液 3000ml 置搪瓷盘中, 水浴蒸发得膏 8g, 与 (甲) 合并, 进行硅胶柱层析 (1:50)。用氯仿-甲醇 (4:1) 洗

脱, 收集洗脱液 33 份, 每份 100ml, 将第 3—4 份减压浓缩放置, 析出黄色结晶 100mg, m.p. 300℃ 以上, 质谱 M/e (%): 112 (M<sup>+</sup>, 100), 69 (66), 57 (56), 28 (39), uv λ<sub>max</sub> 257nm (log E 3.93) (H<sub>2</sub>O), 红外光谱与尿嘧啶光谱一致。第 5—10 份得到淡黄色粉末状结晶 50mg, m.p. 300℃ 以上, 质谱 M/e (%): 135 (M<sup>+</sup>, 100), 119 (45), 108 (78), 97 (15), 81 (39), 66 (24), 54 (43), 43 (51), 28 (51)。uv λ<sub>max</sub> 258nm (log E 4.13) (H<sub>2</sub>O), 红外光谱与腺嘌呤的一致。第 11—20 份得到白色针状结晶, 在乙醇中重结晶, m.p. 232—234℃, 质谱 M/e (%): 267 (M<sup>+</sup>, 6), 250 (2), 237 (12), 220 (2), 178 (53), 164 (100), 148 (16), 136 (98), 135 (100), 119 (2), 108 (36), 97 (7), 81 (11), 67 (12), 57 (24), 43 (31), 28 (37)。uv λ<sub>max</sub> 258nm (log E 4.23) (H<sub>2</sub>O), 红外光谱与腺嘌呤核苷的一致。第 30—32 份得到白色结晶 200mg, 280℃ 分解, 红外光谱与 L-丙氨酸的光谱一致。

## 三、虫草菌 1 号深层培养产物与冬虫夏草、亚香棒虫草化学成分的薄层层析比较

1. 脂溶性成分比较: 将以上 3 种样品的氯仿提取液点于硅胶 G 薄层上, 用氯仿-环己烷 (4:0.3) 为展开剂, 5% 磷钼酸乙醇试剂喷雾显色, 105℃ 烤 1—2 分钟显蓝黑色点, 并与标准品对照, 表明 3 种样品中均含麦角甾醇 (R<sub>f</sub> 0.37)

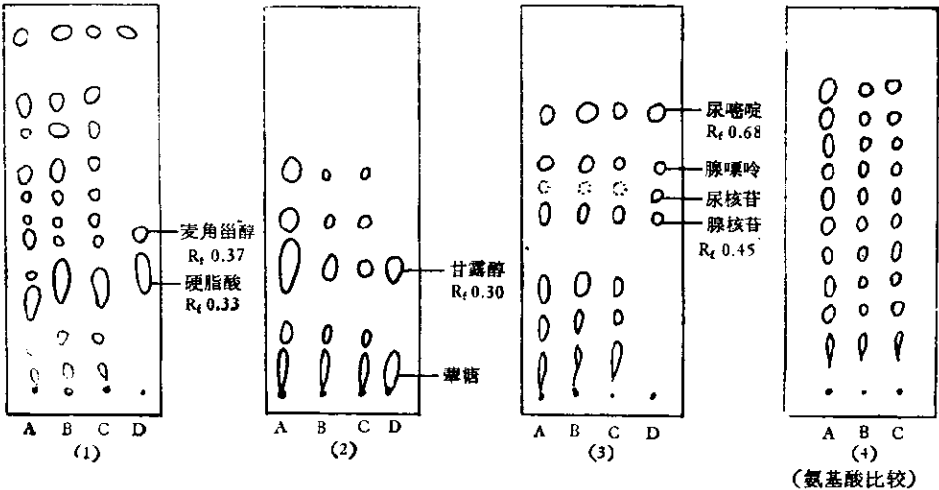


图 1 虫草菌 1 号与天然虫草化学成分薄层图谱比较

A. 虫草菌 1 号 B. 亚香棒虫草 C. 冬虫夏草 D. 各种标准品

和硬质酸 ( $R_f 0.33$ ) [见图 1(1)]。

2. 甘露醇和鞣糖成分的比较: 以上样品继续用乙醇提取, 取少量提取液点于硅胶 G 薄层上, 用氯仿-乙醇 (2:1) 为展开剂, 高碘酸钾和联苯胺试剂喷雾显白色点, 与标准品对照, 表明样品中均含甘露醇 ( $R_f 0.30$ ) 和鞣糖 ( $R_f 0.06$ ) [见图 1(2)]。

3. 水溶液成分比较: 经 734 型阳离子交换树脂制备的溶液, 取少量点于硅胶 GF 薄层上, 用氯仿-甲醇 (4:1) 为展开剂, 在荧光灯下显樱红色点, 与有关的标准品对照, 表明样品中均含尿嘧啶 ( $R_f 0.68$ )、腺嘌呤 ( $R_f 0.58$ )、尿嘧啶核苷 ( $R_f 0.51$ ) 微量和腺嘌呤核苷 ( $R_f 0.45$ ) [见图 1(3)]。将此提取液点于硅胶——纤维素 (3:1) 薄层上, 用正丁醇-冰醋酸-乙醇-水 (4:1:1:2) 为展开剂, 上行展开, 0.2% 茚三酮试剂喷雾, 105℃ 烤 3 分钟左右, 显一系列紫红色点, 为游离氨基酸色谱, 3 种样品中主要的氨基酸色点基本相似 [见图 1(4)]。

4. 甘露醇含量比较: 按药典二部<sup>[3]</sup>记载的方法测定样品中甘露醇含量, 结果虫草菌 1 号菌丝体为 5.68%, 比天然冬虫夏草全草 7.87% 稍低。

5. 氨基酸定量分析: 用阳离子交换树脂法制备的溶液, 再用 AA-100 型氨基酸自动分析仪测定, 结果氨基酸的种类与文献[1]报道的含量稍有不同。说明虫草菌 1 号氨基酸种类与天然虫草接近 (见表 1)。

表 1 虫草菌 1 号游离氨基酸 (培养五天)

氨基酸名称	菌丝中氨基酸 (mg/100g 干重)	菌液中氨基酸 (mg/100ml)
天门冬氨酸	微量	微量
苏氨酸	78.28	微量
丝氨酸	173.50	0.029
脯氨酸	56.66	0.018
甘氨酸	微量	微量
丙氨酸	231.68	0.049
缬氨酸	227.60	0.051
蛋氨酸	18.84	—
异亮氨酸	132.26	0.007
亮氨酸	238.28	0.023
酪氨酸	182.68	0.175
苯丙氨酸	184.92	0.107
组氨酸	36.74	0.061
赖氨酸	87.04	0.056
精氨酸	68.16	微量
合 计	1716.64	0.596

## 小 结

通过以上试验, 初步证明虫草菌 1 号深层培养产物的化学成分与天然虫草主要成分相似。是否可作为虫草代用品, 还有待药理和临床试验的进一步验证。

## 参 考 文 献

- [1] 黄和意等: 中草药, 11(10): 435—439, 1980.
- [2] 吕瑞锦等: 药学通报, 16(9): 55, 1981.
- [3] 全国药典委员会编: 《中华人民共和国药典二部》, 79 页, 人民卫生出版社, 1962.