

高速逆流色谱法分离制备蛹虫草发酵液中虫草素

胡 瑕^{1,2}, 谢红旗^{1,3}, 罗 巍^{1,2}, 夏志兰^{1,2}, 刘东波^{1,2*}

1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128

2. 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128

3. 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128

摘要: 目的 以蛹虫草发酵液虫草素粗提物为原料, 对高速逆流色谱(HSCCC)分离制备虫草素条件进行研究。方法 利用HPLC测定分配系数法结合分析型HSCCC对分离虫草素的溶剂体系进行筛选, 确定虫草素分离的最佳溶剂体系为醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5), 并运用此溶剂体系, 上相作为固定相, 下相作为流动相, 利用制备型HSCCC分离制备蛹虫草发酵液中虫草素。结果 400 mg虫草素粗产品通过制备型HSCCC一次分离制备获得质量分数为98.7%的虫草素产品43.8 mg。结论 该法效率高, 操作简单, 为虫草素的大量制备提供了重要参考。

关键词: 虫草素; 高速逆流色谱; 蛹虫草; 分配系数; 物质基础

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0557-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.011

Isolation and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* fermentation broth by high speed counter-current chromatography

HU Xia^{1,2}, XIE Hong-qi^{1,3}, LUO Wei^{1,2}, XIA Zhi-lan^{1,2}, LIU Dong-bo^{1,2}

1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Sub-health Intervention Technology Laboratory, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410128, China

3. Key Laboratory for Crop Germplasm Innovation and Utilization of Hunan Province, Changsha 410128, China

Abstract: **Objective** To develop a new method for the isolation and preparation of cordycepin by high speed counter-current chromatography (HSCCC) with *Cordyceps militaris* fermentation broth as raw material. **Methods** The solvent systems for cordycepin separation were assessed and selected by HPLC partition coefficient method and analytical HSCCC. A solvent system that consisted of ethyl acetate-*n*-butanol-0.5% ammonia water (2:3:5) was applied to the separation. The upper phase was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile phase for the cordycepin separation by HSCCC. **Results** A high efficiency of HSCCC separation was achieved. Finally, cordycepin (43.8 mg) was obtained from 400 mg crude extract of *C. militaris* fermentation broth in one-step separation with a purity of 98.7%. **Conclusion** HSCCC is an efficient and simple method for the large-scale preparation of cordycepin from *C. militaris* fermentation broth.

Key words: cordycepin; high speed counter-current chromatography; *Cordyceps militaris* (Fr.) Link; partition coefficient; material basis

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (Fr.) Link, 又名北冬虫夏草、北虫草, 属于囊菌亚门, 麦角菌目, 麦角菌科, 虫草属^[1], 与冬虫夏草同属, 是我国传统的名贵中药之一。虫草素(3'-脱氧腺苷)是蛹虫草的主要活性成分之一, 蛹虫草野生和人工培育子实体, 发酵培养的菌丝体及发酵液中均含有虫草素^[2-4]。虫

草素具有抗菌、抗 HIV-I 型病毒、抑制肿瘤, 提高机体免疫力等药理活性^[5-6]。目前, 虫草素的生产量已经不能满足市场需求, 尤其是高纯度虫草素的大量制备技术的缺乏一定程度上限制了其药理药效的进一步研究和临床应用。

高速逆流色谱 (high speed counter-current chro-

收稿日期: 2012-05-05

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD33B11); 湖南省教育厅重点项目 (11A048); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2011B305)

作者简介: 胡 瑕 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能成分的分离纯化工程。Tel: 13874962461 E-mail: cherryxi Xia@163.com

*通信作者 刘东波 Tel: (0731)84635293 E-mail: chinasaga@163.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1526.005.html>

matography, HSCCC) 是一种新型的液-液分配色谱技术, 它在天然产物分离中具有独特的优势, 不但分离效率高而且制备量大, 同时较传统的色谱技术, 消除了固态载体导致的样品不可逆吸附、对样品的污染、变性、失活等影响^[7-9]。目前, 虫草素的分离主要采用离子交换树脂柱、活性炭色谱柱、硅胶色谱柱等方法^[10-11], 但均存在回收率低、操作步骤繁琐、难以获得高纯度产品的缺陷。本研究将 HSCCC 技术应用于虫草素的分离制备, 旨在获得纯度高的虫草素。

1 仪器与材料

TBE—20A 高速逆流色谱仪, 配有 UV500 紫外检测器 (上海同田生物技术有限公司); TBE—1000 A 高速逆流色谱仪, 配有 TBD—2000 紫外检测器 (上海同田生物技术有限公司); Laborota 4001—efficient 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph Instruments 公司); SK3300LH 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); Lab Tech 可见-紫外分光光度计 (北京莱伯泰科仪器有限公司); FTIR—8400s 傅里叶红外光谱扫描仪 (日本岛津公司)。

实验用原材料蛹虫草发酵液由湖南农业大学亚健康干预技术实验室提供。

正己烷、醋酸乙酯、正丁醇、甲醇、乙醇均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); HPLC 分析用色谱纯甲醇 (国药集团化学试剂有限公司); 氨水 (分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司); 虫草素对照品 (质量分数 $\geq 99\%$, Sigma 公司)。

2 方法

2.1 虫草素粗提物及样品溶液的制备

取虫草素质量浓度约 0.2 mg/mL 的蛹虫草发酵液高速离心 (4 000 r/min, 15 min), 将上清液真空浓缩至虫草素质量浓度为 0.6 mg/mL, 然后取 1 800 mL 此样品溶液通过 300 mL 大孔吸附树脂 (HPD-100) 初步除杂, 上样体积流量为 2 BV/h, 用体积分数为 25% 乙醇溶液以 3 BV/h 的体积流量洗脱, 洗脱液浓缩, 冷冻干燥, 获得虫草素粗提物样品, 粗提物样品中虫草素质量分数为 12.1%。

称取粗提物样品 400 mg, 加入选定的溶剂体系上下相各 30 mL, 超声波振荡使之完全溶解, 以备 HSCCC 进样。

2.2 虫草素的测定^[12]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack vp-ODS C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水

(15:85); 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 260 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.2.2 虫草素对照品溶液的配制及线性关系考察

精确称取虫草素对照品 2.0 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 0.2 mg/mL 对照品储备液。分别准确量取上述储备液用甲醇稀释定容至质量浓度分别为 10、20、40、80、100 μ g/mL 的系列对照品溶液, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0309X+0.01$, $r=0.9995$, 表明虫草素在 10~100 μ g/mL 线性关系良好。

2.3 HSCCC 溶剂体系的选择

采用 HPLC 法测定虫草素在各溶剂体系中的分配系数 (K) 值, 取适量粗提物样品于 10 mL 试管中, 用预先达到分配平衡的两相溶剂体系的下相将其溶解, 用 HPLC 进行检测, 测得目标组分峰面积为 A_1 , 然后取等体积的上相加入此溶液, 剧烈振荡让其充分混合, 待达到分离平衡后, 取下相用 HPLC 检测, 峰面积为 A_2 , 则 $K=(A_1-A_2)/A_2$ 。

溶剂体系经测定 K 值初步确定后, 利用分析型 HSCCC 进一步快速筛选, 具体工作参数如下: 进样体积 500 μ L, 工作转速 1 800 r/min, 温度 28 $^{\circ}$ C, 固定相泵入体积流量 5 mL/min, 流动相体积流量 0.5 mL/min, 检测波长 260 nm。

2.4 HSCCC 分离

配制溶剂体系醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水 (2:3:5), 按比例配制好溶剂体系, 将其反复多次振荡摇匀后静置过夜, 分相平衡后分出上、下相, 使用前用超声波脱气 30 min。开机时首先开启恒温水浴循环器, 设置主机温度为 28 $^{\circ}$ C, 然后以 40 mL/min 的体积流量将固定相 (上相) 泵入柱内, 当出口有固定相流出时, 表明固定相充满管道。停泵, 打开主机调整转速为 450 r/min, 以 8 mL/min 的体积流量泵入流动相 (下相), 此时用一个 1 000 mL 的刻度量筒接收流出液, 测定被推出的固定相体积, 计算固定相保留率。当有流动相从出口流出时, 体系达动力学平衡, 开启检测器, 基线稳定后开始进样, 同时进行图谱采集。检测器波长为 254 nm, 根据色谱图手动收集各色谱峰组分。

2.5 样品结构鉴定及纯度测定

HSCCC 分离得到的目标峰物质通过紫外、红外扫描与对照品对照以及质谱 (EI-MS) 分析鉴定结构。用 HPLC 测定, 峰面积归一法计算质量分数。

3 结果与分析

3.1 溶剂体系的筛选

溶剂体系的选择是 HSCCC 分离中的关键环节, 通常通过测定目标物质在溶剂体系中的 K 值来判断溶剂体系是否适合目标组分的分离。对于 HSCCC

分离, 目标物质在两相溶剂体系中的 K 值最适范围为 0.5~2.0^[13]。根据虫草素的化学性质及常用的参考溶剂体系, 实验中考察了蛹虫草发酵液中多个组分在多组溶剂体系中的 K 值, 结果见表 1。

在表 1 中, 保留时间 (t_R) 为 12.7 min 的组分

表 1 虫草素发酵液各组分在不同溶剂体系中的 K 值

Table 1 K values of different ingredients from *C. militaris* fermentation broth in various solvent systems

编号	溶剂体系	K 值		
		组分 1 ($t_R=11.8$ min)	组分 2 ($t_R=12.7$ min)	组分 3 ($t_R=15.9$ min)
1	正己烷-正丁醇-甲醇-水 (4:3.2:1.8:2)	0.39	0.31	0.14
2	正己烷-正丁醇-甲醇-水 (2:3.8:1.2:4)	0.52	0.60	0.32
3	醋酸乙酯-正丁醇-水 (4:1:5)	0.41	0.38	0.09
4	醋酸乙酯-正丁醇-水 (3:2:5)	0.52	0.75	0.36
5	醋酸乙酯-正丁醇-水 (2:3:5)	0.44	0.94	0.40
6	醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水 (2:3:5)	0.66	1.44	0.58

物质为虫草素, 其他两个组分在发酵液中相对量较高, 为与虫草素 t_R 较接近的组分物质。可知, 目标物质虫草素在溶剂体系 1 和 3 中的 K 值均偏小, 在分离过程中理论 t_R 长, 不易被流动相萃取出来, 不适宜于虫草素的分离。虫草素在溶剂体系 2 中的 K 值在合适的范围内, 但是各个组分的 K 值差别不大, 各个组分不能很好地分离, 利用分析型 HSCCC 试探其分离效果见图 1-A, 出峰时间快, 分离得到的两个峰未能达到基线分离, 不适宜发酵液中虫草素的分离。

以醋酸乙酯代替正己烷, 选择相对极性较大的溶剂体系醋酸乙酯-正丁醇-水 (表 1), 虫草素在溶剂体系 4、5、6 的 K 值均在适宜范围之内, 利用溶剂体系 4 在分析型 HSCCC 上分离样品, 分离色谱图见图 1-B, 各组分在溶剂体系 4 中已经开始有良好的分离趋势。对溶剂比例进一步进行调整, 加大正丁醇比例, 减小醋酸乙酯的比例 (溶剂体系 5), 在一定程度改善了 K 值, 将此溶剂体系应用于分析型 HSCCC 分离样品, 结果见图 1-C, 样品中各个组分基本达到基线分离, 按谱图接收各个峰对应的

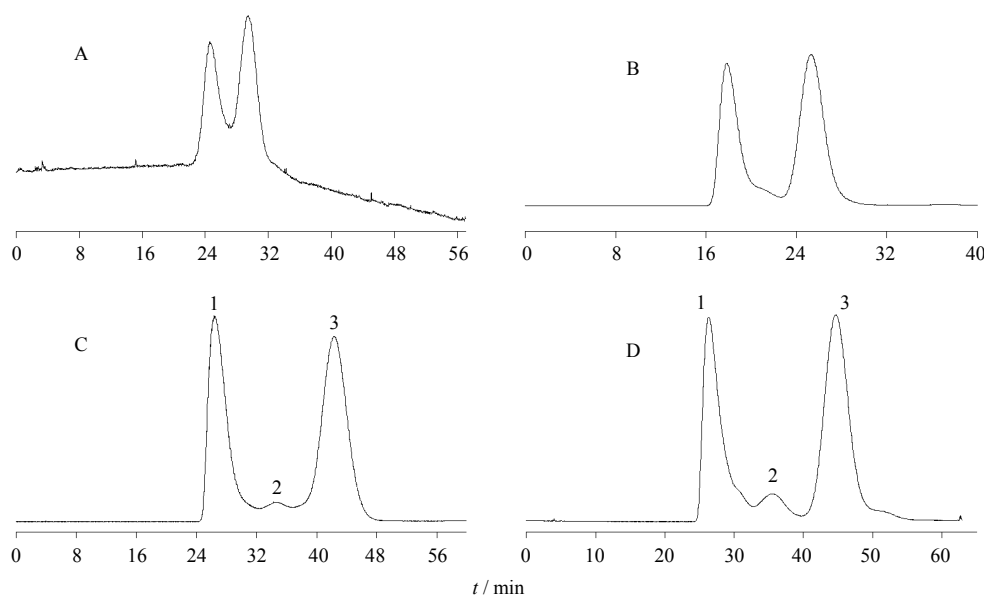


图 1 样品在不同溶剂体系中分离 HSCCC 色谱图

Fig. 1 HSCCC chromatograms of samples in various solvent systems

洗脱液,用 HPLC 检测,确定峰 3 为虫草素峰,但是在 260 nm 波长下检测峰质量分数只有 90%,在此溶剂体系条件下不能获得高纯度的虫草素产品。

由于虫草素为生物碱类物质,根据碱性化合物的特性,向溶剂体系中加入氨水调节分离环境中的 pH 值,以醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5)为溶剂体系(表 1 中溶剂体系 6),虫草素对应的 K 值增大,且各个组分 K 值的大小差异也增大,经分析型 HSCCC 分离(图 1-D),样品各组分在溶剂体系 6 的条件下得到了基线分离,较溶剂体系 5,各峰的分度得到了较大的改善。因此,最终选择醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5)为发酵液中虫草素的最佳分离溶剂体系。

3.2 HSCCC 分离纯化结果

以醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5)为溶剂体系,利用制备型 HSCCC 分离粗提物中虫草素,分离色谱图见图 2。手动收集各色谱峰后,经 HPLC 检测,峰 IV 为单一峰,与虫草素对照品 t_R 一致,均为 12.7 min(图 3),初步确定图 2 中峰 IV 即为虫草素对应的峰。

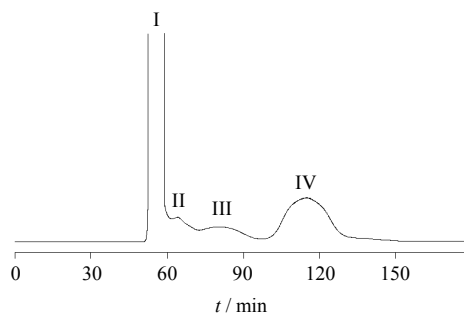


图 2 制备型 HSCCC 分离蛹虫草发酵液粗提物中虫草素的色谱图

Fig. 2 Preparative HSCCC chromatogram of cordycepin in crude extracts from *C. militaris* fermentation broth

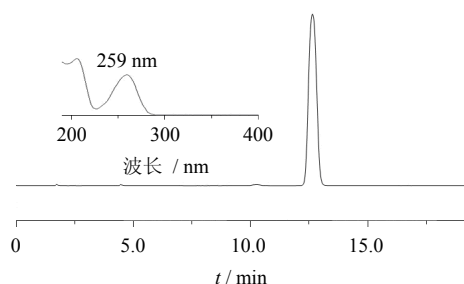


图 3 虫草素制备产品 HPLC 检测色谱图及紫外扫描图

Fig. 3 HPLC chromatogram and UV scanning spectrum of prepared cordycepin

3.3 样品结构鉴定及纯度分析

对制备获得峰 IV 物质进行紫外光谱扫描(图 3),最大吸收波长为 259 nm,与文献报道虫草素对照品最大吸收波长一致,与虫草素对照品扫描图谱对照,图谱谱线与对照完全一致。

对样品红外光谱进行扫描,与虫草素对照品扫描图谱对比(图 4),上部分线条为虫草素制备样品的谱线,下部分谱线为虫草素对照品对应的谱线,两者在 $4\,000\sim 450\text{ cm}^{-1}$ 的谱线特征一致,其特征吸收峰值分别为虫草素对照品: $3\,139.63$ 、 $2\,922.91$ 、 $1\,670.05$ 、 $1\,605.81$ 、 $1\,576.12$ 、 $1\,479.23$ 、 $1\,341.73$ 、 $1\,208.33$ 、 $1\,108.56$ 、 834.46 、 725.18 cm^{-1} ,制备虫草素样品: $3\,139.90$ 、 $2\,923.52$ 、 $1\,672.17$ 、 $1\,606.59$ 、 $1\,575.71$ 、 $1\,478.80$ 、 $1\,340.15$ 、 $1\,207.99$ 、 $1\,107.06$ 、 835.22 、 723.63 cm^{-1} ,两者对照,光谱特征一致。

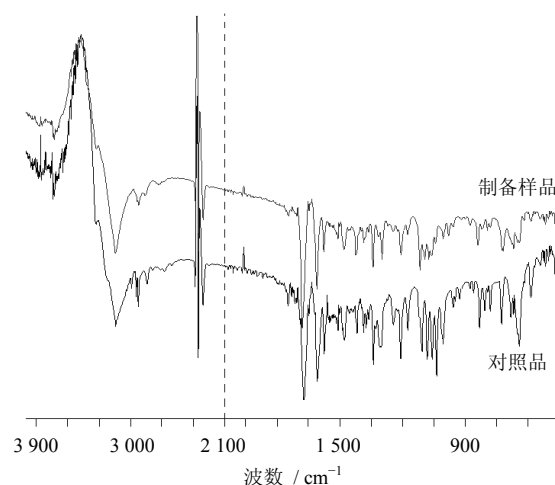


图 4 制备虫草素样品与虫草素对照品的红外扫描图谱
Fig. 4 IR scanning spectra of prepared cordycepin and cordycepin reference substance

质谱(EI-MS)对峰 IV 物质进行结构分析得 m/z : 250.09 (M-H)^- , 296.10 (M+HCOO)^- , $310.12\text{ (M+CH}_3\text{COO)}^-$ 。以上质谱数据与虫草素对照品的一致,计算得目标物质的相对分子质量为 251.1,确定峰 IV 物质为虫草素。

经 HPLC 检测,峰面积归一法计算,图 3 中目标峰物质质量分数为 98.7%。

4 讨论

溶剂体系筛选为 HSCCC 分离的关键步骤。根据虫草素,虫草素作为糖苷类化合物,具有一定的极性,常规生物碱类化合物的通用溶剂体系如氯仿-甲醇-水^[14],正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水^[15]等体系不适合虫草素的分离。根据虫草素在甲醇和正丁醇中

具有很好的溶解度的特性,参考 HBAW 方法^[13],考察了不同比例的正己烷-正丁醇-甲醇-水体系对虫草素的分离情况,如上述结果所述,此溶剂体系对样品的分离效果不理想,极性仍然偏弱。醋酸乙酯-正丁醇-水体系常用于糖苷混合物的分离^[13],实验中筛选出醋酸乙酯-正丁醇-水(2:3:5)体系对样品的分离色谱图显示分离效果较好,但是得到样品的峰质量分数仅 90%左右,再次结合虫草素作为生物碱类化合物的性质,在溶剂体系中添加氨水调节分离 pH 值,最终获得了很好的分离效果。

本研究以分离制备虫草素为主要目标,由图 2 可知,样品在溶剂体系醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5)下可分离获得 4 个组分,经 HPLC 检测,可知组分 I 为杂质峰,包括了大量的色素和极性较强的化合物混合物;组分 II 在 260 nm 下检测在 $t_R=8.3$ min 处有一较明显的峰,但峰面积小,峰质量分数为 75%左右;组分 III 在 260 nm 下检测在 $t_R=10.9$ min 和 $t_R=11.8$ min 处有 2 个较高的峰,2 个峰的总峰面积百分比为 90%以上,在后续研究中,可以将图 2 所示的组分 II 和组分 III 分别接收,进行浓缩和二次分离,获得更多高纯度的发酵液中的组分物质,实现资源的综合利用。

本研究对分离蛹虫草发酵液中虫草素的 HSCCC 溶剂体系进行了筛选,最后确定以醋酸乙酯-正丁醇-0.5%氨水(2:3:5)作为溶剂体系分离制备虫草素,从 400 mg 蛹虫草发酵液粗提物中一次分离获得 43.8 mg 质量分数为 98.7%的虫草素产品,实现了虫草素的高纯度制备。本工艺对高纯度虫草素制备的扩大生产具有重要的参考价值,同时为虫草素的药理研究提供了重要的物质基础。

参考文献

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [2] 钟思敏, 杜梅, 陈往滨, 等. 蛹虫草菌丝产虫草素液体培养条件的研究 [J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 229-234.
- [3] 李祥玲, 胡劲松, 陈作红. HPLC 测定人工蛹虫草及其培养基中虫草素和腺苷含量 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2010, 33(2): 107-111.
- [4] 郭宇森, 王雅玲, 赵轶男, 等. 虫草素检测含量的影响因素研究进展 [J]. 广西农业生物科学, 2008, 27(S1): 81-83.
- [5] 黄冕, 张松. 虫草素生理功效的研究进展 [J]. 菌物研究, 2010, 8(4): 234-238.
- [6] 余伯成, 唐永范, 唐亮, 等. 虫草素的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 349-352.
- [7] 陈小芬, 黄新异, 郑媛媛, 等. 高速逆流色谱分离纯化天然产物中生物碱类成分的应用进展 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 1026-1032.
- [8] 马丽娜, 张岩, 陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.
- [9] Wan J Z, Chen X X, Qiu C M, et al. Isolation and purification of isoaloeresin D and aloin from *Aloe vera* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 148-152.
- [10] 钟艳梅, 黄志全, 温凯. 人工蛹虫草固体培养残基中虫草素的提取分离研究 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(2): 40-42.
- [11] 陈伟, 吴畏, 高新华, 等. 采用柱层析分离与富集虫草素研究 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(4): 69-71.
- [12] 张红霞, 吴畏, 陈伟, 等. 北冬虫夏草发酵液中虫草素和腺苷含量的 HPLC 分析 [J]. 上海农业学报, 2005, 21(4): 53-56.
- [13] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] Yuan L M, Zi M, Ai P. Versatile two-phase solvent system for alkaloid separation by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 927(1/2): 91-96.
- [15] Liu R M, Chu X, Sun A L, et al. Preparative isolation and purification of alkaloids from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1/2): 139-144.