

虫草头孢菌粉抗心律失常活性成分的分 离纯化及结构鉴定

邹峥嵘¹, 陈贝贝¹, 王如伟², 姚新生^{3,*}

(1.江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 2.浙江中药与天然药物研究院, 浙江 杭州 310052;

3.深圳中药及天然药物研究中心, 广东 深圳 518057)

摘 要: 目的: 研究虫草头孢(*Cephalosporium sinensis*)菌粉的抗心律失常活性成分。方法: 在活性检测结果的指导下, 采用硅胶柱色谱法、ODS RP C₁₈高效液相色谱法分离纯化虫草头孢菌粉中的抗心律失常活性化学成分, 根据化合物的理化性质和波谱数据鉴定其化学结构。结果: 从虫草头孢菌粉乙醇提取物的水饱和正丁醇萃取部位中分离得到5个化合物, 分别是尿苷(化合物1)、胸苷(化合物2)、腺苷(化合物3)、2'-脱氧尿苷(化合物4)、尿嘧啶(化合物5)。结论: 核苷类化合物为虫草头孢菌粉中的主要的抗心律失常成分。

关键词: 虫草头孢菌粉; 抗心律失常; 活性成分

Separation, Purification and Structural Identification of Antiarrhythmic Constituents in *Cephalosporium sinensis* Mycelia

ZOU Zheng-rong¹, CHEN Bei-bei¹, WANG Ru-wei², YAO Xin-sheng^{3,*}

(1. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

2. Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Hangzhou 310052, China;

3. Shenzhen Research Center of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Shenzhen 518057, China)

Abstract: Objective: To study antiarrhythmic constituents in *Cephalosporium sinensis* mycelia. Methods: Antiarrhythmic constituents in *Cephalosporium sinensis* mycelia were separated and purified by silical gel column chromatography and ODS RP C₁₈ HPLC and structurally identified according to physio-chemical properties and spectral data. Results: Five active compounds were separated from the water saturated butanol-soluble fraction of ethanolic extract from *Cephalosporium sinensis* mycelia, including uridine, thymidine, 2'-deoxyuridine and uracil. Conclusion: The main antiarrhythmic constituents in *Cephalosporium sinensis* mycelia are nucleosides.

Key words: *Cephalosporium sinensis*; antiarrhythmic; active constituents

中图分类号: Q539.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0149-04

冬虫夏草是我国传统名贵的药食两用中药材, 补肾益肺, 用于治疗疲倦、自汗盗汗、性功能障碍、高血脂症、高血糖症、肾功能障碍、心脏疾病、肝脏疾病以及病后久虚不复^[1-2]。药理研究表明, 冬虫夏草具有抗炎、抗氧化、保护神经细胞^[3]、抗肝纤维化^[4]、抗肿瘤新生血管生成^[5]、提高免疫力^[6]和促进性激素合成^[7]等多方面的生物活性。从冬虫夏草中分离得到的真菌菌株经人工发酵培养得到菌粉, 具有与冬虫夏草类似的化学成分, 可以作为冬虫夏草的替代品使用, 用于生产各种保健食品和药品。目前, 临床广泛使用的金水宝、宁心宝胶囊等, 其主要原料即是虫草真菌经液体深层发酵得到的菌粉干燥粉末。

从虫草类原材料中分离得到的化合物有多糖^[8]、核

苷^[9]、生物碱^[10]为了阐明虫草头孢菌粉药理作用的物质基础, 本研究采用活性指导下的追踪分离方法, 对虫草头孢菌粉乙醇提取物的抗心律失常活性部位和活性成分进行系统的分离纯化和活性测定, 并对有效部位的化学成分进行结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用的原药材为冬虫夏草头孢菌粉(mycelia of *Cephalosporium sinensis* (powder))由浙江现代中药与天然药物研究院提供, 购自浙江万丰企业集团制药有限公司(批号030601)。

收稿日期: 2011-09-05

作者简介: 邹峥嵘(1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品保健品活性化学成分。E-mail: zouzhr@163.com

*通信作者: 姚新生(1934—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: yaoxinshen@tom.com

出生1~3d SD大鼠(乳鼠)原代培养的心肌细胞。DMEM/F12细胞培养液 美国Sigma公司; 胶原酶II型生工生物工程(上海)股份有限公司; 5% CaCl_2 注射液(批号030602) 上海信谊金朱药业有限公司; 盐酸维拉帕米注射液(批号020801) 上海禾丰制药有限公司。

层析用硅胶(100~140、200~300目) 青岛海洋化工厂; 硅胶GF254预制板、ODS RP-18(40~63 μm)、氘代试剂 德国Merck公司; Sephadex LH-20 Mitsubishi Kasei公司; 洗脱剂甲醇(色谱纯) 天津协和昊鹏公司; 其余试剂均为分析纯 广州安谱公司。

1.2 仪器与设备

光电换能装置及光电换能软件系统 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 熔点测定仪 日本Yanaco制造所; Esquire 2000质谱仪、AVANCE-400超导核磁共振仪 瑞士Bruker公司; PHPLC采用LC-8A制备型高效液相色谱仪 日本岛津株式会社。

1.3 方法

1.3.1 虫草头孢菌粉提取物的制备与分离

虫草头孢菌粉1kg以4倍量(V/m)的95%乙醇浸泡24h后, 超声提取3次, 每次超声时间为30min。合并3次的超声提取液, 回收溶剂, 得到虫草头孢菌粉乙醇提取物湿浸膏(Cs-E)。经过乙醇提取的虫草头孢菌粉再用蒸馏水超声提取3次, 每次用蒸馏水3000mL, 超声30min。合并3次的超声水提取液, 回收溶剂, 即得到虫草头孢菌粉水提取物浸膏(Cs-W)。将上述乙醇提取物浸膏均匀分散在含有10%乙醇的蒸馏水(2000mL)中, 依次用等体积的环己烷、氯仿、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取, 每种溶剂均萃取3次。分别合并每种溶剂的萃取液, 回收溶剂, 得到虫草头孢菌粉乙醇提取物的环己烷部分(Cs-E-Pt)、氯仿部分(Cs-E-Ch)、乙酸乙酯部分(Cs-E-Et)、正丁醇部分(Cs-E-Bu)和水部分(Cs-E-W)。正丁醇部分进行硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(体积比8:2)洗脱, 得到活性部位Bu-3, 用半制备型反相高效液相色谱仪进行分离纯化, 得到5个化合物。

1.3.2 高效液相色谱条件

流动相: 甲醇-水(15:85, V/V); 流速: 2mL/min; 色谱柱: AQUSAIL SS4251(120) ODS C_{18} (10mm $\times$ 250mm)和SHIM-PACK PREP-ODS C_{18} (20mm $\times$ 250mm)色谱柱; 检测器: SHIMADZU SPD-10A UV-VIS紫外检测器; 检测波长: 260nm; 工作站: 浙江智达N2000在线工作站。

1.3.3 心律失常体外抑制活性的检测

参考文献[11]稍作修改。无菌条件下取乳鼠心室肌, 用新鲜配制的0.1%胶原酶分次消化分散成单个心肌细胞, 悬浮于含有20%小牛血清的培养液中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 培养箱中先培养90min, 以去除成纤维细胞, 所得心肌细胞以 2×10^5 个/mL的密度接种至96孔板。每隔48h换液。前48h在培养液中加入0.1mmol/L的5-溴脱氧尿苷抑制成纤维

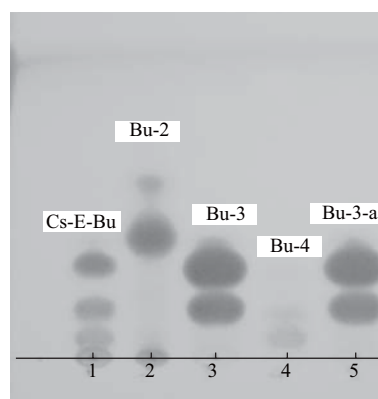
细胞的生长。根据预实验结果, 选用培养5~7d搏动节律规则且同步化的心肌细胞簇。提取物分别以DMSO或无水乙醇或75%的乙醇或水溶解, 设不同梯度质量浓度组(终质量浓度为0.01、0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$), 氯化钙诱发的心肌细胞心律失常为模型组, 维拉帕米作阳性对照, 相应的溶剂(DMSO、无水乙醇、75%乙醇、水)作为阴性对照。实验时, 将96孔板置于(36 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 的恒温工作箱的倒置显微镜下, 稳定15min后, 选取搏动节律规则且同步化的心肌细胞, 先加入200 $\mu\text{g/mL}$ 的 CaCl_2 溶液致心肌细胞心律失常, 达到稳态后, 每隔5min由低到高依次递加不同质量浓度的受试物, 采用光电换能装置记录加药后5min末的细胞搏动次数和搏动节律, 连续观察30min(相同实验重复进行3次), 再用光电换能软件系统换算并作量化评价。

1.3.4 化合物的波谱数据测定

化合物的熔点用Yanaco熔点测定仪测定(温度未校正); ESI-MS用Bruker Esquire 2000质谱仪测定, 电喷雾解离; NMR数据的检测方法是样品溶解在氘代试剂DMSO中用Bruker AVANCE-400超导核磁共振仪在室温条件下测定。

2 结果与分析

2.1 虫草头孢菌粉乙醇提取物浸膏的萃取分离与硅胶柱层析结果



薄层板: 硅胶GF254预制板; 展开剂: 氯仿、乙酸乙酯、甲醇、异丙醇、氨水体积比为8:3:3:3:0.9; 显色法: 254nm紫外灯下显色。

图1 正丁醇部位经硅胶柱层析后各馏分的TLC分析

Fig.1 TLC analysis of the water saturated butanol-soluble fraction of ethanolic extract from *Cephalosporium sinensis* mycelia and its subfractions obtained by silical gel column chromatography

正丁醇部位经硅胶柱层析后各馏分的TLC分析见图1。虫草头孢菌粉乙醇提取物湿浸膏(Cs-E, 258g)经环己烷、氯仿、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取, 得到虫草头孢菌粉乙醇提取物的环己烷部分(Cs-E-Pt, 94.0g)、氯仿部分(Cs-E-Ch, 6.4g)、乙酸乙酯部分(Cs-E-Et, 6.1g)、正丁醇部分(Cs-E-Bu, 41g)和水部分(Cs-E-W,

95.7g)。正丁醇部分41g进行硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(体积比8:2)洗脱, 得到活性部位Bu-3 (25.92g)。

2.2 虫草头孢菌粉提取物的心律失常体外抑制活性

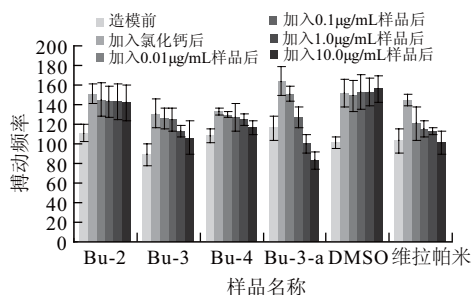


图2 正丁醇部分的样品对氯化钙诱发乳鼠原代培养心肌细胞心律失常的体外抑制

Fig.2 Antiarrhythmic effect of Bu-2, Bu-3 and Bu-4 on neonatal rat cardiac myocytes induced by CaCl_2 in vitro

由图2可知, 虫草头孢菌粉提取物经过萃取和柱层析后, 正丁醇萃取部位经过硅胶柱层析合并后得到的第3个馏分(Bu-3)对由氯化钙诱发的乳鼠原代培养心肌细胞心律失常均有明显的改善效应, Bu-3在0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度时, 作用强度与0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的维拉帕米相当($P < 0.05$)。

2.3 有效部位Bu-3的反相高效液相色谱分离纯化

用制备型反相高效液相色谱仪进行分离纯化, 流动相为甲醇-水(15:85, V/V); 检测波长: 260nm, 共分离得到5个化合物。

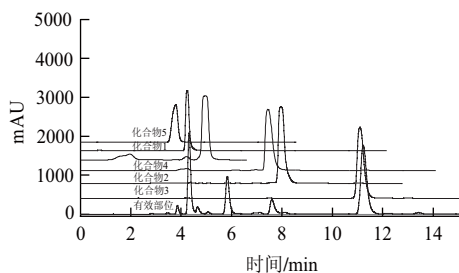


图3 有效部位经高效液相色谱制备分离后各化合物的HPLC分析

Fig.3 HPLC analysis of five compounds separated from Bu-3 separated by P-HPLC

2.4 化合物的结构鉴定

2.4.1 化合物1的结构鉴定

无色针状结晶(甲醇), mp 168.5~170.0 $^{\circ}\text{C}$ 。[ESI-MS] $^{+}$ m/z : 267 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 、245 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 、113 $[\text{M}-132+\text{H}]^{+}$ 。[ESI-MS] $^{-}$ m/z : 487 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 、243 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。根据上述质谱数据可以推出化合物的相对分子质量为244, 含有偶数个N原子, 结合化合物的 ^{13}C -NMR和 ^1H -NMR数据, 确定化合物的分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 。根据化合物的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR和HMQC谱, 完成了化合物中C及其所连接的H原子的化学位移归属: ^1H -NMR(pyridine, 400MHz) δ : 5.78 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$, H-5)、8.52 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$, H-6)、

6.80 (1H, d, $J=3.8\text{Hz}$, H-1'), 4.87 (1H, m, H-2'), 4.89 (1H, m, H-3'), 4.64 (1H, m, H-4'), 4.19 (1H, dd, $J=2.6, 12.1\text{Hz}$, H-5'), 4.30 (1H, dd, $J=2.6, 12.1\text{Hz}$, H-5')。 ^{13}C -NMR(pyridine, 100MHz) δ : 152.1(C-2)、164.3(C-4)、102.3(C-5)、141.6(C-6)、90.2(C-1'), 71.0(C-2'), 75.9(C-3'), 86.1(C-4'), 61.6(C-5')。

上述ESI-MS、NMR数据与文献[12]中的尿苷数据基本一致, 因此确定该化合物为尿苷(uridine)。

2.4.2 化合物2的结构鉴定

黄色粉末, mp 186~187.5 $^{\circ}\text{C}$ 。[ESI-MS] $^{+}$ m/z 265: $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 、243 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。[ESI-MS] $^{-}$ m/z 483 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 、241 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。根据上述质谱数据可以推出化合物的相对分子质量为242, 含有偶数个N原子, 结合化合物的 ^{13}C NMR和 ^1H NMR数据, 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ 。化合物2的主要HMBC相关信号如图4所示。

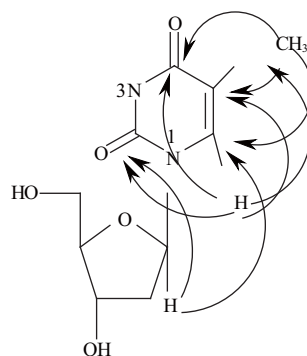


图4 化合物2的主要HMBC相关信号

Fig.4 Key HMBC correlations of compound 2

根据化合物的 ^{13}C NMR、 ^1H NMR和HMQC谱, 完成了化合物中C及其所连接的H原子的化学位移归属: ^1H -NMR(DMSO, 400MHz) δ : 7.69 (1H, d, $J=1.2\text{Hz}$, H-6)、1.77 (3H, d, $J=1.2\text{Hz}$, H-7)、6.17 (1H, t, $J=7.4\text{Hz}$, H-1'), 2.07 (2H, m, H-2'), 4.24 (1H, m, H-3'), 3.75 (1H, q, $J=3.8\text{Hz}$, H-4'), 3.58 (2H, m, H-5')。 ^{13}C -NMR(DMSO, 100MHz) δ : 150.4(C-2)、163.7(C-4)、109.3(C-5)、136.1(C-6)、12.2(C-7)、83.7(C-1'), 39.7(C-2'), 70.4(C-3'), 87.2(C-4'), 61.3(C-5')。

上述ESI-MS、NMR数据与文献[13]中的胸苷数据基本一致, 因此确定该化合物为胸苷(thymidine)。

2.4.3 化合物3的结构鉴定

无色针晶(甲醇), mp 236.8~238 $^{\circ}\text{C}$, 1%的茴香醛硫酸试剂显黄灰色。[ESI-MS] $^{+}$ m/z : 290 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 、268 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 、136 $[\text{M}-132+\text{H}]^{+}$ 。[ESI-MS] $^{-}$ m/z : 533 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 、266 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 、134 $[\text{M}-132-\text{H}]^{-}$ 。根据上述质谱数据可以推出化合物的相对分子质量为267, 含有奇数个N原子, 结合化合物的 ^{13}C NMR和 ^1H NMR数据, 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$ 。根据化合物的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR和HMQC谱, 完成了化合物中C及其所连接的

H原子的化学位移归属: $^1\text{H-NMR}$ (pyridine, 400MHz) δ : 8.60 (1H, s, H-2)、8.71 (1H, s, H-8)、8.31 (2H, bs, NH_2)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine, 100MHz) δ : 153.3(C-2)、149.9(C-4)、121.6(C-5)、157.6(C-6)、140.6(C-8)、90.8(C-1')、72.3(C-2')、75.5(C-3')、87.7(C-4')、62.9(C-5')。

将化合物3与腺苷对照品共薄层,发现两者在不同的展开系统中均有相同的Rf值,而如上所述的ESI-MS、NMR数据与文献[14]中的腺苷数据基本一致,因此确定化合物3为腺苷(adenosine)。

2.4.4 化合物4的结构鉴定

白色无定形固体, mp: 183~186℃。根据化合物的 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-NMR}$ 和HMQC谱,完成了化合物中C及其所连接的H原子的化学位移归属: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz) δ : 5.63 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$, H-5)、7.85 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$, H-6)、6.15 (1H, m, H-1')、2.08 (2H, m, H-2')、4.23 (1H, m, H-3')、3.78 (1H, m, H-4')、3.57 (2H, m, H-5')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100MHz) δ : 150.4(C-2)、163.1(C-4)、101.7(C-5)、140.6(C-6)、84.1(C-1')、39.6(C-2')、70.4(C-3')、87.4(C-4')、61.3(C-5')。

化合物4的上述数据与文献[15]基本一致,因此确定化合物4为2'-脱氧尿嘧啶核苷[1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl) uracil]。

2.4.5 化合物5的结构鉴定

黄色粉末, mp > 300℃。化合物的NMR数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz) δ : 10.79 (1H, bs, H-1)、10.98 (1H, bs, H-3)、5.44 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H-5)、7.38 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100MHz) δ : 151.5(C-2)、164.4(C-4)、100.3(C-5)、142.2(C-6)。

化合物5的上述数据与文献[16]基本一致,因此确定化合物5为尿嘧啶(pyrimidin-2, 4-dione, uracil)。

3 讨论

虫草头孢菌粉是多种保健品和药品的主要原料^[17]。本实验的研究对象具有提高窦性心律,改善窦房结、房室传导功能,改善心脏功能的作用,用于治疗多种难治性缓慢型心律失常和房室传导阻滞。但美中不足的是,这种药品对于心律失常起效较慢而且服药量大。其主要原因是菌粉中物质组成复杂,药效物质不清楚,缺乏有效的质量检测和质量控制方法,从而影响了药材的质量检测和控制,不利于产品的进一步推广和利用。

本研究工作活性筛选结果的指导下,对虫草头孢菌粉乙醇提取物进行系统分离。根据活性检测结果,采用乙醇提取、溶剂萃取和硅胶柱层析等3个处理步骤,得到虫草头孢菌粉的抗心律失常活性部位Bu-3,它对

分别由氯化钙和异丙肾上腺素诱发的乳鼠原代培养心肌细胞正性频率和节律失常均有明显的改善效应,在0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时,其作用强度与0.01 $\mu\text{g/mL}$ 维拉帕米相当。采用反相高效液相色谱法对有效部位Bu-3的化学成分进行分离纯化,根据化合物的理化特征和波谱数据,确定抗心律失常有效部位Bu-3的化学成分中主要含有尿苷(uridine)、胸苷(thymidine)、腺苷(adenosine)、2'-脱氧尿苷(1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl) uracil)、尿嘧啶(pyrimidin-2,4-dione, uracil)等化合物,本研究结果为进一步完善虫草头孢菌粉(宁心宝)的质量控制标准提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院《中药大辞典》编写组. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 767-768.
- [2] ZHOU X, GONG Z, SU Y, et al. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61: 279-291.
- [3] JIN D, PARK B C, LEE J S, et al. Mycelial extract of *Cordyceps ophioglossoides* prevents neuronal cell death and ameliorates β -amyloid peptide-induced memory deficits in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(7): 1126-1129.
- [4] LIU Yukan, SHEN Wei. Inhibitive effect of *Cordyceps sinensis* on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism[J]. World J Gastroenterology, 2003, 9(3): 529-533.
- [5] YOO H S, SHIN J W, CHO J H, et al. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(5): 657-665.
- [6] WEN Shucheng, CHOU Chengjen, LIN Liechwen, et al. Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 83: 79-85.
- [7] SIU K M, MAK D H F, CHIU P Y, et al. Pharmacological basis of 'Yin-nourishing' and 'Yang-invigorating' actions of *Cordyceps*, a Chinese tonifying herb[J]. Life Sciences, 2004, 76: 385-395.
- [8] 邹峥嵘, 袁宜如, 赖海华. 虫草头孢菌粉粗多糖的理化性质和含量测定研究[J]. 食品科学, 2009, 28(9): 86-88.
- [9] LI Shaoping, LI Ping, JI Hui, et al. The nucleosides contents and their variation in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2001, 10(4): 175-179.
- [10] 酆皆秀, 李进, 徐丽珍, 等. 西藏产冬虫夏草化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(7): 499-501.
- [11] 刘凤鸣, 李增晔, 石山. 沙棘总黄酮对培养大鼠心肌细胞和心室内cAMP及腺苷酸环化酶的影响[J]. 中国药理学报, 1988, 9(6): 539-542.
- [12] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册: 第七分册[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [13] 史大永, 韩丽君, 孙杰, 等. 海藻基根硬毛藻的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 347-350.
- [14] XUE Peifeng, LIANG Hong, WANG Bin, et al. Chemical constituents from *Potentilla multifida* L.[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2005, 14(2): 86-88.
- [15] 李莉娅, 邓志威, 李军, 等. 中国南海海绵 *Cinachyrella australiensis* 化学成分研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(1): 12-17.
- [16] STAUBMANN R, SCHUBERT-ZSILAVECZ M, HIERMANN A, et al. A complex of 5-hydroxypyrrolidin-2-one and pyrimidine-2, 4-dione isolated from *Jatropha curcas*[J]. Phytochemistry, 1999, 50: 337-338.
- [17] 杨大荣. 中国昆虫资源利用和产业化[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.