蛹草拟青霉发酵液中活性组分的分离纯化

赵和平， 胡丰林， 宋社吾， 樊美珍

（安徽农业大学微生物防治重点实验室，安徽 合肥 230036）

关键词：薄层色谱法（thin-layer chromatography）；高效液相色谱法（high performance liquid chromatography）；活性组分（active constituent）；分离纯化（isolation and purification）；蛹草拟青霉（*Paecilomyces militaris*）；发酵液（fermentation liquor）

中图分类号：O658 文献标识码：B 文章编号：1000-8713（2005）04-0435-01

蛹虫草又名北冬虫夏草，为子囊菌亚门麦角菌目麦角菌科真菌。随着蛹虫草及其无性型的人工培养较成功，近年来有关该菌的活性成分研究变得十分活跃。本文采用柱色谱法对初分离样品进行进一步的分离纯化，最终从该菌代谢产物的酯相组分中分离纯化出两个纯度高于 95% 的单一化学组分，并经过进一步的药理实验证实了它们对多种肿瘤细胞的抑制活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

硅胶柱色谱系统；CS-930 薄层色谱扫描仪；Young Lin 高效液相色谱仪。Waters Spherisorb ODS2 柱（250 mm × 4.6 mm i. d.，5 μm）；柱色谱硅胶粒度 70 ~ 140 μm；葡聚糖凝胶 Sephadex-LH20；高效硅胶薄层板（Silica gel F254）。

1.2 材料

蛹草拟青霉 *P. militaris*. RCEF0718 菌株分离自采集于皖岳西鹞落坪的蛹虫草（*Cordyceps militaris*）。菌种由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。

2 结果与讨论

2.1 活性产物的粗分离及其抗肿瘤活性的证实

将菌株 RCEF0718 的发酵液用无机膜（0.5 μm）过滤，以充分去除菌丝体。过滤液用乙醇沉淀（加入的乙醇占总体积的 65%，这样可较完全地去除胞外多糖），浓缩上清液以除去乙醇。处理过的发酵液用乙酸乙酯进行萃取，萃取液分为酯相（Z）和水相（S）两部分。观察它们对肝肿瘤 Bel-7402 细胞株、口腔癌 KB 细胞株及结肠癌 HCT-08 细胞株的抑制作用。抗肿瘤活性实验证明酯相部分对上述几种肿瘤细胞株有良好的抑制活性。

2.2 薄层色谱展开剂的选择

配制三氯甲烷-甲醇-水体积比分别为 50∶1∶1（A）、40∶10∶1（B）、30∶10∶1（C）、14∶6∶1（D）和 13∶7∶1（E）等 5 种不同极性的展开剂。将萃取后的酯相等量点样于 5 块 5 cm × 10 cm 的硅胶薄层板上，分别用上述 5 种展开剂展开，取出薄层板（5 块薄层板的展距相等），展开剂挥发后置于 254 nm 波长紫外光下观察展开斑点并拍照，计算主要组分的比移值 R_f 及 ΔR_f 值。结果显示，在 B 展开剂中酯相各组分能被较好地分开，主要组分的 R_f 为 0.2 ~ 0.8，且 $\Delta R_f \geqslant 0.1$。

2.3 柱色谱洗脱液的选择

柱色谱法的分离条件可用薄层色谱探索。由于采用湿法装柱，因此柱色谱的固定相预先吸附了流动相中的极性组分，使之对样品组分的吸附活性较薄层色谱低，所以选用的流动相的极性要低于薄层色谱。一般认为多组分分离时柱色谱所用流动相的极性相当于薄层色谱的一半，否则洗脱速度太快，不利于极性相近组分的分离。在前述薄层色谱展开剂的试验中发现，当以展开剂 E 展开时，酯相主要组分的 R_f 为 0.1 ~ 0.4，可见展开剂 E 可作为柱色谱的流动相。

2.4 硅胶色谱柱分离纯化

取硅胶 400 g 按湿法装入 60 cm × 5 cm i. d. 玻璃柱管中，然后用同样的方法加入 2 g 预先吸附在 20 g 硅胶上的酯相样品。用前述展开剂 E 作流动相进行洗脱。在洗脱 3 倍柱床体积后，为提高洗脱速度，用三氯甲烷-甲醇（体积比为 1∶1）洗脱，每 20 mL 收集一管。最后逐管进行薄层色谱分析，根据斑点合并对应的洗脱液，浓缩后冻干得初步纯化的组分 Z1 和 Z2。

2.5 凝胶色谱柱分离纯化

葡聚糖凝胶 Sephadex-LH20 用 100% 甲醇溶解后装柱。将 Z1，Z2 分别用甲醇溶解并上样，用 100% 甲醇洗脱，流速 1 mL/min，用 MP-D 高性能紫外检测仪在 260 nm 波长下检测，按峰收集不同组分，得 Z1-3、Z1-4、Z2-1 和 Z2-2 等 4 组分，脱去溶剂后冻干。

2.6 纯化后的样品纯度鉴定

（1）高效液相色谱法（HPLC）：将 Z1-3，Z1-4，Z2-1，Z2-2 分别用 60% 甲醇溶解，并使其质量浓度均为 0.5 g/L。进样 10 μL，以 60% 甲醇为流动相，流速为 1 mL/min，洗脱时间为 20 min，检测波长为 230 和 260 nm。用峰面积归一化法计算纯化后产物的纯度。从高效液相色谱图（略）上可看到，230 和 260 nm 波长下 Z1-4、Z2-1 及 Z2-2 都有一个主要吸收峰，峰面积积分分析结果表明它们的纯度均达到 95% 以上；Z1-3 有两个较大的吸收峰及一些次要吸收峰，说明它不是单一组分，对此有待做进一步的研究。

（2）薄层色谱法：HPLC 测定纯度的波长范围较窄，此单一方法不能完全证实纯化所得样品为纯物质。为了证实纯化后样品的纯度，我们将展开后的薄层板在紫外光和碘蒸气下进行显色。结果显示，在供试的两种不同展开剂系统中，Z1-3 均有两个主要斑点，而 Z1-4、Z2-1 和 Z2-2 均只有一个主要斑点，由此可以判断 Z1-4、Z2-1 和 Z2-2 均为纯度较高的样品，Z1-3 仍为混合组分。此结果也与 HPLC 结果吻合。

收稿日期：2004-08-03

作者简介：赵和平，男，硕士研究生，E-mail：hopechoil@ hotmail. com.

通讯联系人：樊美珍，女，教授，Tel：（0551）2843286，E-mail：mzfan@ ahau. edu. cn.

基金项目：安徽省生物防治重点实验室基金资助项目（项目号：2004A010）.