

中国被毛孢液体发酵的化学成分

郑永标*, 庞海月, 刘晋, 刘慧娟, 黄建忠*

福建师范大学生命科学学院 工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350117

摘要: 本文采用反相硅胶、正相硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶等层析技术对中国被毛孢液体发酵的化学成分进行研究。经 1D-NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT)、2D-NMR (HSQC, HMBC, ^1H , ^1H -COSY) 和 ESI-MS、HR-EI-MS 解析鉴定, 从其菌丝体中分离到腺苷(1)、2'-脱氧腺苷(2)、2,3-二羟基丙基壬烷酸酯(3)和 4-羟基-6-戊基-四氢吡喃-2-酮(4), 从发酵液中分离到 4-甲基-1H-咪唑-5-乙醇(5)。化合物 3 和 5 首次以天然产物形式分离得到。

关键词: 中国被毛孢; 化学成分; 2,3-二羟基丙基壬烷酸酯; 4-甲基-1H-咪唑-5-乙醇

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

Chemical Constituents of the Fermented Broth and Mycelia of *Hirsutella sinensis*

ZHENG Yong-biao*, PAN Hai-yue, LIU Jin, LIU Hui-juan, HUANG Jian-zhong*

College of Life Sciences, Fujian Normal University; Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fuzhou 350117, China

Abstract: The chemical constituents of the fermented broth and mycelia of *Hirsutella sinensis* were investigated by solvent extraction technique and column chromatography over reversed phase silica gel (RP-18), normal phase silica gel and Sephadex LH-20. Four compounds (1-4) were isolated from the dry powder of mycelia of *H. sinensis* and one compound (5) was obtained from the fermented broth. Their structures were identified as adenosine (1), 2'-deoxyadenosine (2), 2,3-dihydroxypropyl nonanoate (3), 4-hydroxy-6-pentyl-tetrahydropyran-2-one (4) and 4-methyl-1H-imidazole-5-ethanol (5) based on the analysis of 1D-NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT), 2D-NMR (HSQC, HMBC, ^1H , ^1H -COSY), ESI-MS and HR-EI-MS spectral data. Compounds 3 and 5 were isolated from natural resource for the first time.

Key words: *Hirsutella sinensis*; chemical constituents; 2,3-dihydroxypropyl nonanoate; 4-methyl-1H-imidazole-5-ethanol

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 是由肉座菌目麦角菌科冬虫夏草菌寄生于高山草甸土中的蝙蝠蛾幼虫, 使幼虫僵化, 在适宜条件下, 僵虫头端可生长出棒状的子座, 即冬虫夏草菌的子实体与僵虫菌核 (幼虫尸体) 构成的复合体, 是中国传统的名贵中药材, 含有特殊的化学成分, 如虫草素 (Cordycepin)、3'-脱氧腺苷、虫草酸、甾醇类^[1] 和具有抗肿瘤活性的神经酰胺类化合物^[2] 等, 其药用价值已广泛被人们所接受。由于天然虫草资源稀缺且人工培养虫草难度极大, 通过深层发酵培养冬虫夏草菌以替代野生虫草具有重要意义。梁宗琦、李增智等研究表明中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 为冬虫夏草的无性型真菌^[3-5]。研究表明中国被毛孢的发酵产物除含有虫草素、腺苷、虫草酸、甾醇类^[6] 等与冬虫夏草相

同的化学成分外, 还产生一些特殊的活性化学成分, 如二肽类^[7] 和联萘酚类^[8] 等。本文对中国被毛孢液体发酵化学成分作进一步研究。

1 仪器与材料

核磁共振仪 (AVANCE III 500M, Bruker); 紫外光谱仪 (Amersham Biosciences); ESI-MS 质谱仪 (Applied Biosystems, API 2000), 双聚焦三扇型高分辨磁质谱仪 (AutoSpec Premier P776); 全自动旋光仪 (Jasco P-1020); 反相柱层析硅胶 RP C-18 (Merck); 凝胶柱层析 Sephadex LH-20 (GE Healthcare); 正相柱层析硅胶 (200 ~ 300 目) 和薄层层析板 GF₂₅₄ 为青岛海洋化工厂产品。

中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 菌种由贵州大学梁宗琦教授提供。将活化的中国被毛孢菌种, 接入装有 150 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基 (配方: 去皮土豆 200 g, 葡萄糖 30 g, 蛋白胨 3 g, 柠檬酸三胺 3 g, 硫酸镁 1 g, 维生素 B1 50 mg, 磷酸二氢钾 2 g, 水

收稿日期: 2014-03-10 接受日期: 2014-07-02

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2011N0013)

* 通讯作者 Tel: 86-591-22868193; E-mail: yongbiaozheng@fjnu.edu.cn; hjz@fjnu.edu.cn

1 L, 自然 pH) 的 250 mL 三角瓶中, 置 17 °C 和 170 rpm 摇床培养 26 d, 共培养 15 L。摇瓶培养后, 将菌丝体与发酵液离心分离, 菌丝体于 50 °C 烘箱中烘干, 发酵液浓缩至一定体积供提取。

2 提取与分离

取中国被毛孢液体发酵干燥菌丝粉 100 g, 用甲醇浸提 3 次, 合并后浓缩得膏状物 11.39 g, 膏状物用等体积的超纯水与乙酸乙酯萃取得乙酸乙酯粗提物 (0.69 g), 水相用等体积的正丁醇萃取, 得正丁醇粗提物 2.69 g。正丁醇粗提物用适量甲醇溶解后, 经反相硅胶柱 (170 g) 层析, 以甲醇: 水 (30: 70) 为洗脱剂, 得到组分 Fr. 1 (170 mg), 接着将组分 Fr. 1 用适量甲醇溶解, 经反相硅胶柱 (30 g) 层析, 以甲醇: 水 (10: 90) 为洗脱剂, 得到组分 Fr. 1.1 (67.6 mg), 取 30 mg Fr. 1.1 组分, 经正相硅胶柱层析, 氯仿: 甲醇 (30: 1) 洗脱得化合物 **1** (3.5 mg) 和亚组分 Fr. 1.1.1 (17 mg), 亚组分 Fr. 1.1.1 再经反相硅胶柱 (10 g) 层析, 以甲醇: 水 (10: 90) 为洗脱剂, 得到化合物 **2** (4.6 mg)。乙酸乙酯粗提物 (0.69 g) 用适量乙酸乙酯充分溶解, 经凝胶 (140 g) 柱层析, 乙酸乙酯洗脱, 流速为 12 ~ 15 s/drop, 每试管约收集 5 mL, 相似组分合并得到 Fr. I (70 mg) 和 Fr. II (20 mg)。Fr. I (70 mg) 经反相硅胶 (30 g) 柱层析, 100% 甲醇洗脱得主要组分 (10.6 mg), 经凝胶 (40 g) 柱层析, 甲醇洗脱得主要组分 (6.3 mg), 经正相硅胶柱层析, 氯仿: 甲醇 (200: 1) 洗脱得化合物 **3** (2.8 mg)。Fr. II (20 mg) 经反相硅胶 (30 g) 柱层析, 以甲醇: 水 (50: 50) 为洗脱剂, 得主要组分 5.2 mg, 经凝胶 (40 g) 柱层析, 甲醇洗脱得组分 4.5 mg, 再经正相硅胶柱层析, 氯仿: 甲醇 (100: 1) 洗脱得化合物 **4** (3.7 mg)。

中国被毛孢发酵液浓缩后, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 获得乙酸乙酯粗提物 482.7 mg。粗提物用适量甲醇充分溶解, 经凝胶 (140 g) 柱层析, 甲醇洗脱, 流速为 12 ~ 15 s/drop, 每试管收集 5 mL, 相似组分合并得 Fr. A (139 mg)。Fr. A (139 mg) 经反相硅胶 (30 g) 柱层析, 以甲醇: 水 (30: 70) 为洗脱剂, 得组分 22.4 mg, 经凝胶 (40 g) 柱层析, 甲醇洗脱得组分 11.4 mg, 经正相硅胶柱层析, 氯仿: 甲醇 (400: 1) 洗脱得化合物 **5** (6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末, 微溶于水与甲醇; UV

(MeOH) λ_{\max} 260 nm; ESI-MS m/z 252.0 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 8.12 (1H, s, H-2), 8.33 (1H, s, H-8), 7.32 (2H, brs, 6-NH₂), 6.34 (1H, dd, J = 6.0, 7.0 Hz, H-1' α), 2.27 (1H, ddd, J = 2.8, 6.0, 13.1 Hz, H-2' α), 2.75 (1H, ddd, J = 5.7, 7.0, 13.1 Hz, H-2' β), 4.42 (1H, m, H-3'), 3.88 (1H, m, H-4'), 3.63 (1H, m, H-5'a), 3.53 (1H, m, H-5'b), 5.33 (1H, d, J = 4.0 Hz, 3'-OH), 5.28 (1H, dd, J = 4.9, 6.7 Hz, 5'-OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 152.4 (C-2), 149.0 (C-4), 119.3 (C-5), 156.2 (C-6), 139.6 (C-8), 83.9 (C-1'), 39.4 (C-2'), 71.0 (C-3'), 88.0 (C-4'), 61.9 (C-5')。经检索与文献对比^[9], 化合物 **1** 鉴定为 2'-脱氧腺苷 (图 1)。

化合物 **2** 白色粉末, 微溶于水与甲醇; UV (MeOH) λ_{\max} 260 nm; ESI-MS m/z 268.2 [M + H]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 8.13 (1H, s, H-2), 8.35 (1H, s, H-8), 7.35 (2H, brs, 6-NH₂), 5.88 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-1' α), 4.63 (1H, dd, J = 5.6, 6.1 Hz, H-2' β), 4.15 (1H, ddd, J = 5.6, 4.5, 3.9 Hz, H-3'), 3.97 (1H, m, H-4'), 3.69 (1H, ddd, J = 4.0, 4.0, 12.0 Hz, H-5'a), 3.57 (1H, ddd, J = 3.7, 7.3, 12.0 Hz, H-5'b), 5.46 (1H, overlapped, 2'-OH), 5.20 (1H, d, J = 4.5 Hz, 3'-OH), 5.43 (1H, overlapped, 5'-OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.4 (C-5), 156.2 (C-6), 140.0 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.7 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。经与文献对比^[9], 将化合物 **2** 鉴定为腺苷 (图 1)。

化合物 **3** 无色油状, 可溶于甲醇与丙酮; UV (MeOH) λ_{\max} 213 nm; [α]_D²⁰ -34.9 (c 0.1, MeOH); HR-EI-MS m/z 232.1673 [M]⁺ (calcd for C₁₂H₂₄O₄, 232.1675); ESI-MS m/z 256.0 [M + Na]⁺; ¹H NMR [(CD₃)₂CO, 500 MHz] δ : 2.30 (2H, m, H-2), 1.31 (1H, overlapped, H-3a), 1.60 (1H, overlapped, H-3b), 1.29 ~ 1.33 (6H, overlapped, H-4, 5, 6), 2.32 (2H, m, H-7), 1.29 ~ 1.33 (2H, overlapped, H-8), 0.89 (3H, m, H-9), 4.07 (1H, dd, J = 6.3, 11.2 Hz, H-1'a), 4.14 (1H, dd, J = 4.5, 11.2 Hz, H-1'b), 3.83 (1H, brs, H-2'), 3.55 (2H, brs, H-3'); ¹³C NMR [(CD₃)₂CO, 125 MHz] δ : 174.0 (C-1), 34.6 (C-2), 25.6 (C-3), 29.9 (C-4, 5, 6), 32.0 (C-7), 24.0 (C-8), 14.3 (C-9), 66.2 (C-1'), 70.9 (C-

2'), 64.1 (C-3')。分析 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱数据,表明化合物**3**含有1个甲基,9个亚甲基(其中2个连氧),1个连氧的次甲基和1个酯基碳。在HMBC图谱上,H-2与C-1、C-3和C-4/5/6,H-9与C-8和C-7,以及H-3与C-4/5/6存在明显碳氢远程相关,再依据 ^1H - ^1H COSY图谱上观察到的H-2与H-3b、H-3b与H-4/5/6和H-8与H-9的明显相关关系,可以建立C-1至C-9的连接,该片段为壬烷酸基。在HMBC图谱上可以观察到H-1'a/b与C-3'和C-2'存在明显碳氢远程相关,在 ^1H - ^1H COSY图谱上,也可观察到的H-1'a/b与H-2'、H-2'与H-3'有明显相关,据此可以建立C-1'至C-3'的连接,片段为甘油基。根据HMBC图谱上的H-1'a/b与C-1明显的碳氢远程相关,可以将两个片段壬烷酸基与甘油基连接,至此,化合物**3**的结构得以建立,为2,3-二羟基丙基壬烷酸酯(2,3-dihydroxypropyl nonanoate,图1)。经检索,化合物**3**具有抑制肿瘤转移的活性^[10]。

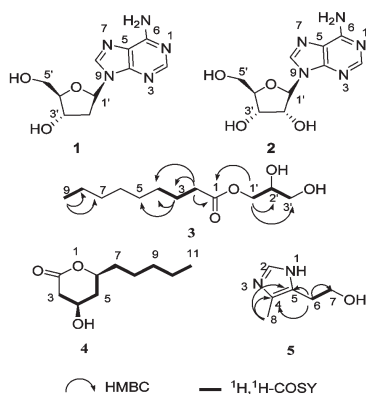


图1 中国被毛孢液体发酵的化学成分

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-5

化合物4 淡黄色油状,可溶于甲醇和丙酮;UV(MeOH) λ_{\max} 207 nm; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -20.139 (c 0.096, MeOH); HR-EI-MS m/z 186.1252 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 186.1256); ^1H NMR [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz] δ : 2.67 (1H, dd, $J = 4.6, 17.3$ Hz, H-3 α), 2.51 (1H, ddd, $J = 1.8, 3.5, 17.3$ Hz, H-3 β), 4.32 (1H, m, H-4), 1.77 (1H, ddd, $J = 3.0, 11.3, 14.2$, H-5 α), 1.96 (1H, dddd, $J = 1.8, 3.6, 5.4, -14.2$, H-5 β), 4.66 (1H, m, H-6), 1.69 (1H, m, H-7a), 1.61 (1H, m, H-7b), 1.52 (1H, m, H-8a), 1.41 (1H, m, H-8b), 1.34 ~ 1.27 (4H, overlapped, H-9, 10), 0.91 (3H, t, $J = 7.0$, H-11); ^{13}C NMR

[$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz] δ : 170.4 (C-2), 39.5 (C-3), 63.2 (C-4), 36.7 (C-5), 76.2 (C-6), 36.5 (C-7), 25.5 (C-8), 32.5 (C-9), 23.3 (C-10), 0.91 (C-11)。分析表明化合物**4**含有1个甲基,6个亚甲基,2个连氧的次甲基和1个酯基碳。在 ^1H - ^1H COSY图谱上,可以观察到H-4与H-3 α /3 β 、H-4与H-5 α /5 β 、H-5 α /5 β 与H-6、H-6与H-7a/7b、H-7a/7b与H-8a/8b、H-8a/8b与H-9/10、H-9/10与H-11存在明显相关点,据此可以建立C-2至C-11的连接。根据C-2、C-4、C-6的化学位移值及H-3 α /3 β 、H-4与H-5 α /5 β 的耦合常数,可以推导出C-2、C-3、C-4、C-5、C-6构成了六元环内酯结构,据此,可以建立化合物**4**的基本结构,并可由碳氢远程相关得到进一步证实。另外,H-3 β 和H-5 β 存在 $4J = 1.8$,表明H-3 β 和H-5 β 存在共平面的W型耦合,即为平伏键。根据Hassel和Barton规则^[11],在六元环体系中,较大基团位于平伏位置,即4-OH、C7-C11组成的脂肪链、及H-3 β 和H-5 β 是平伏键(e 键),而H-4、H-6、H-3 α 和H-5 α 是直立键(a 键),据此化合物**4**的相对构型可以建立(图1),经检索化合物**4**为4-羟基-6-戊基-四氢吡喃-2-酮(4-hydroxy-6-pentyl-tetrahydropyran-2-one),与分离自真菌*Cephalosporium recifei*的天然化合物 δ -lactone of 3,5-dihydroxydecanoic acid的结构一致^[12],其结构由质谱和化学反应来鉴定。本文通过核磁波谱、高分辨质谱等对其结构进行鉴定,据报道,脂肪酸内酯类化合物具有脂肪酸合成酶抑制剂的作用^[13]。

化合物5 淡黄色油状物质,微溶于甲醇,易溶于丙酮;UV(MeOH) λ_{\max} 250 nm; HR-EI-MS m/z 126.0789 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$, 126.0793); ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 8.66 (1H, s, H-2), 2.98 (2H, o, H-6), 3.74 (2H, o, H-7), 2.34 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) δ : 150.2 (C-2), 150.1 (C-4), 129.3 (C-5), 30.6 (C-6), 63.1 (C-7), 15.1 (C-8)。经检索化合物**5**为4-甲基-1H-咪唑-5-乙醇(4-methyl-1H-imidazole-5-ethanol,图1),是组氨受体拮抗剂^[14],并具有强心作用^[15]。

4 讨论

本文研究表明冬虫夏草的无性型中国被毛孢不但能产生腺苷等化学成分外,还能产生具有各种生物活性的化学成分,如具有抑制肿瘤转移活性的2,3-二羟基丙基壬烷酸酯(**3**)、具有抑制脂肪酸合成酶

活性的化合物 4-羟基-6-戊基-四氢吡喃-2-酮(4)和组氨受体拮抗剂并具有强心作用的化合物 4-甲基-1H-咪唑-5-乙醇(5),这些成分是冬虫夏草药用价值的基础。从中国被毛孢菌丝体分离到的化合物 3 和 5,为首次从天然产物中分离到,对市场上各种冬虫夏草菌粉的鉴别以及质量标准的制定都具有重要作用。化合物 5 分离自中国被毛孢液体发酵液,为中国被毛孢液体发酵的综合开发利用奠定了基础。因此,本论文的研究进一步揭示了冬虫夏草的药用价值,为中国被毛孢工业化开发提供了科学依据。

参考文献

- 1 Yang LY, Huang WJ, Hsieh HG, *et al.* H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J Lab Clin Med*, 2003, 141: 74-83.
- 2 Li JX(郇皆秀), Li J(李进), Xu LZ(徐丽珍), *et al.* Studies on chemical constituents of *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2003, 38: 499-501.
- 3 Zhao J(赵锦), Wang N(王宁), Chen YQ(陈月琴), *et al.* Molecular identification for the asexual stage of *Cordyceps sinensis*. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报), 1999, 38: 121-123.
- 4 Liu ZY, Yao YJ, Liang ZQ, *et al.* Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol Res*, 2001, 105: 827-832.
- 5 Li ZZ(李增智), Huang B(黄勃), Fan MZ(樊美珍). Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis*(Berk) SACC. I. Relation Between *Hirsutella sinensis* and *C. sinensis*. *Mycosystema*(菌物系统), 2000, 19: 60-64.
- 6 Bok JW, Lermer L, Chilton J, *et al.* Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 1999, 51: 891-898.
- 7 Jia JM, Ma XC, Wu CF, *et al.* Cordycedipeptide A, a new cyclodipeptide from the culture liquid of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 582-583.
- 8 Isakam M, Srisanoh U, Lartpornmatulee N, *et al.* ES-242 derivatives and cycloheptapeptides from *Cordyceps sp.* strains BCC 16173 and BCC 16176. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1601-1604.
- 9 Ciuffreda P, Casati S, Manzocchi A. Complete ^1H and ^{13}C NMR spectral assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. *Magn Reson Chem*, 2007, 45: 781-784.
- 10 Kobayashi S, Matsumoto M, Onimura K, *et al.* Tumor metastasis inhibitors containing 1-O-acylglycerol-2,3-phosphates: Japan, A09025235. 1997-01-28.
- 11 Barton DH. The principles of conformational analysis. *Science*, 1970, 169: 539-544.
- 12 Vesonder RF, Stodola FH, Rohwedder WK. Formation of the δ -lactone of 3,5-dihydroxydecanoic acid by the fungus *Cephalosporium recifei*. *Can J Biochem*, 1972, 50: 363-365.
- 13 Kang JL(康建磊), Zheng ZB(郑志兵), Wang LL(王莉莉), *et al.* Synthesis of γ -butyrolactone derivatives as FAS inhibitors. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志), 2010, 20: 81-83.
- 14 Van der Goot H, Sshepers MJP, Sterk GJ, *et al.* Isothiourea analog of histamine as potent agonists or antagonists of the histamine H3-receptor. *Eur J Med Chem*, 1992, 27: 511-517.
- 15 Lampe JW, Hanna RG, Piscitelli TA, *et al.* Cardiotonic agents. 6. Histamine analogs as potential cardiovascular selective H2 agonists. *J Med Chem*, 1990, 33: 1688-1697.