



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115304616 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 04

(21) 申请号 202211104188.5

C07C 49/755 (2006.01)

(22) 申请日 2022.09.09

A61K 31/352 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/122 (2006.01)

申请公布号 CN 115304616 A

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.11.08

A61K 36/8988 (2006.01)

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所  
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(56) 对比文件

CN 115286606 A, 2022.11.04

(72) 发明人 胡江苗 杨柳 李芝兰

Mark Tristan Quimque等. Potential

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
专利代理师 申素霞

Cancer- and Alzheimer's Disease-Targeting Phosphodiesterase Inhibitors from Uvaria alba: Insights from In Vitro and Consensus Virtual Screening. ACS Omega. 2021, 第6卷8403-8417.

(51) Int. Cl.

C07D 493/06 (2006.01)

C07D 493/04 (2006.01)

C07D 307/80 (2006.01)

C07C 45/79 (2006.01)

审查员 赵贞贞

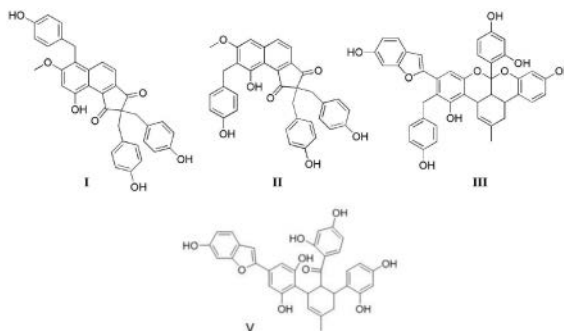
权利要求书2页 说明书15页

(54) 发明名称

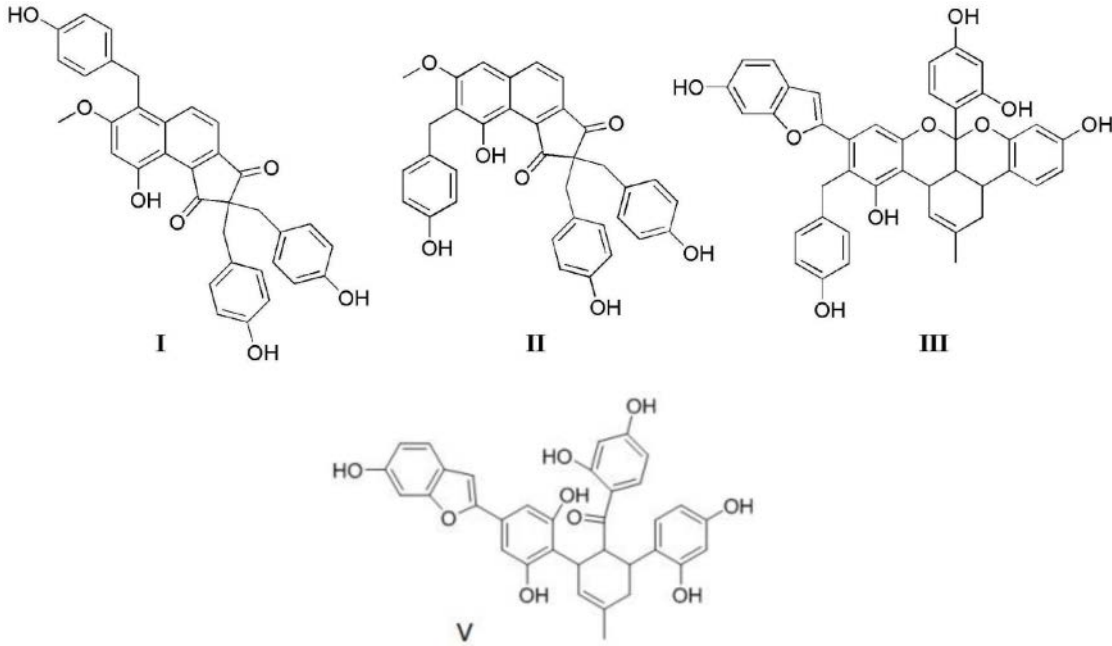
一种天麻活性化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种天麻活性化合物及其制备方法和应用,涉及生物药物技术领域。本发明提供的天麻活性化合物,具有式I~III,式V所示的结构,该天麻活性化合物具有较好的酶活作用,尤其是对胆碱酯酶具有很有的抑制作用,在制备药物方面具有很好的应用前景。本发明以传统中药天麻为原料进行醇提分离得到上述天麻活性化合物,源于中草药,安全性和有效性高,极大的拓展了天麻的药学经济价值;制备方法操作简单,原料廉价易得,成本低,适宜工业化生产;而且,本发明提供的制备方法能够避免使用大量的有机原料,绿色环保。



1. 一种化合物,其特征在于,具有式I~III,式V所示的结构:



2. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将天麻进行醇提,得到醇提液;将所述醇提液进行乙酸乙酯萃取后浓缩,得到乙酸乙酯相;

(2) 将所述乙酸乙酯相进行第一硅胶柱层析分离,得到组分Fr. 8;所述第一硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为石油醚-丙酮溶剂,所述石油醚-丙酮溶剂中石油醚与丙酮的体积比为100:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

(3) 将所述组分Fr. 8进行第二硅胶柱层析分离,得到13个组分,依次记为组分Fr. 8.1、组分Fr. 8.2、组分Fr. 8.3、组分Fr. 8.4、组分Fr. 8.5、组分Fr. 8.6、组分Fr. 8.7、组分Fr. 8.8、组分Fr. 8.9、组分Fr. 8.10、组分Fr. 8.11、组分Fr. 8.12和组分Fr. 8.13;所述第二硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为15:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

(4) 将所述组分Fr. 8.6进行第三硅胶柱层析分离,得到组分Fr. 8.6.6;所述第三硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为5:1~2:1,洗脱方式为梯度洗脱;

将所述组分Fr. 8.6.6依次进行第一SephadexLH-20凝胶柱层析、第四硅胶柱层析分离、第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离和半制备高效液相色谱分离,分别得到具有式I和式II所示结构的化合物;所述第一SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为乙酸乙酯-丙酮溶剂,所述乙酸乙酯-丙酮溶剂中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1:2~1:3,洗脱方式为梯度洗脱;所述第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;所述半制备高效液相色谱分离采用的流动相为乙腈体积分数为65%的乙腈水溶液;

(5) 将所述组分Fr. 8.8进行MCI除色,得到组分Fr. 8.8.1;

将所述组分Fr. 8.8.1依次进行第五硅胶柱层析分离、第三SephadexLH-20凝胶柱层析

分离和第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式III所示结构的化合物;所述第五硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比为6:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;所述第三SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;

(6) 将所述组分Fr.8.10进行第七硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.10.10;将所述组分Fr.8.10.10依次进行第八硅胶柱层析分离、第六SephadexLH-20凝胶柱层析分离和第七SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式V所示结构的化合物;所述第七硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮混合溶剂,所述氯仿-丙酮混合溶剂中氯仿和丙酮的体积比为1:1;所述第八硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比是15:1~1:1,洗脱方式为梯度洗脱;所述第六SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第七SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;

步骤(4)和步骤(5)没有时间先后顺序。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述醇提利用醇水溶液进行;所述醇水溶液中醇包括乙醇和/或甲醇;所述醇水溶液中醇的体积分数为70~95%。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述天麻的质量与醇水溶液的体积之比为1kg:2~4L。

5. 根据权利要求2、3或4所述的制备方法,其特征在于,所述醇提为回流醇提;所述醇提的次数为2~3次,单次醇提的时间为1~3h。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述MCI除色采用的洗脱液为水-甲醇溶剂,所述水-甲醇溶剂中水和甲醇的体积比为7:3~0:1。

7. 权利要求1所述的式I~III和式V所示化合物或权利要求2~6任一项所述制备方法制得的式I~III和式V所示的化合物在制备胆碱酯酶抑制剂中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述应用为抗老年痴呆。

## 一种天麻活性化合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物药物技术领域,具体涉及一种天麻活性化合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 中药天麻(别称赤箭、定风草等,学名GastrodiaelataBl.)为兰科(Orhidaceae)植物天麻属(GastrodiaR.Br.)天麻GastrodiaelataBl.的干燥块茎,功能息风止痉,平抑肝阳,祛风通络。主治肝风内动,惊痫抽搐,眩晕,头痛,肢体麻木,手足不遂,风湿痹痛等,是传统名贵中药。目前,文献报道的天麻属的主要化学成分是天麻素、对羟基苯甲醇等酚性成分及其衍生物、多糖、多肽等共八十多个化合物。这些主要化学成分表现出多样的生物活性,如镇静安神、降低外周血管、脑血管和冠状血管阻力,并有降压、减慢心率及镇痛抗炎作用,天麻多糖有免疫活性。

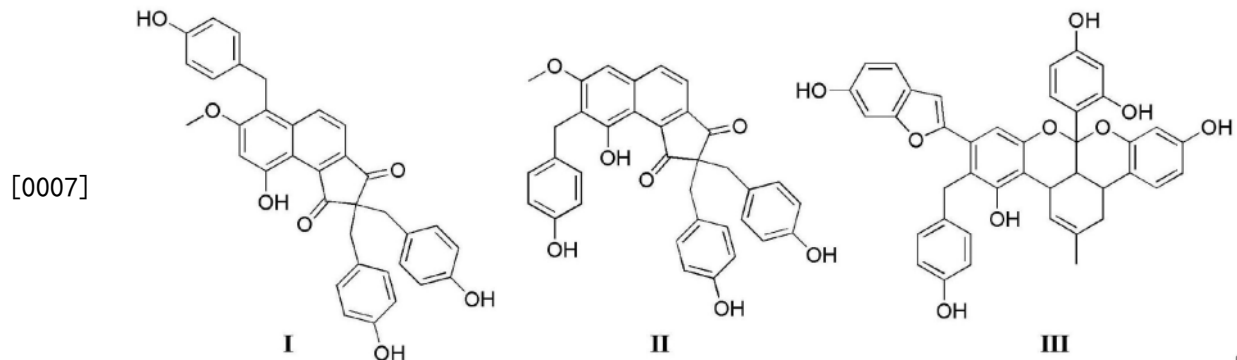
[0003] 目前,关于天麻中赤剑素类化合物的报道仅有gastrodinol(赤剑素),其他以赤剑素类化合物以及桑黄素类化合物的分离鉴定未见报道,研究天麻中新的活性成分对于拓展天麻的应用范围具有重要的意义。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种天麻活性化合物及其制备方法和应用,本发明提供的天麻活性化合物对胆碱酯酶具有很有的抑制作用。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种天麻活性化合物,具有式I~III中任意一种所示的结构:



[0008] 本发明提供了上述技术方案所述天麻活性化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 将天麻进行醇提,得到醇提液;将所述醇提液进行乙酸乙酯萃取后浓缩,得到乙酸乙酯相;

[0010] (2) 将所述乙酸乙酯相进行第一硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8;所述第一硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为石油醚-丙酮溶剂,所述石油醚-丙酮溶剂中石油醚与丙酮的体积比为100:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0011] (3) 将所述组分Fr.8进行第二硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6和组分Fr.8.8;所

述第二硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为15:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0012] (4)将所述组分Fr.8.6进行第三硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6.6;所述第三硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为5:1~2:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0013] 将所述组分Fr.8.6.6依次进行第一SephadexLH-20凝胶柱层析、第四硅胶柱层析分离、第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离和半制备高效液相色谱分离,分别得到具有式I和式II所示结构的天麻活性化合物;所述第一SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为乙酸乙酯-丙酮溶剂,所述乙酸乙酯-丙酮溶剂中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1:2~1:3,洗脱方式为梯度洗脱;所述第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;所述半制备高效液相色谱分离采用的流动相为乙腈体积分数为65%的乙腈水溶液;

[0014] (5)将所述组分Fr.8.8进行MCI除色,得到组分Fr.8.8.1;

[0015] 将所述组分Fr.8.8.1依次进行第五硅胶柱层析分离、第三Sephadex LH-20凝胶柱层析分离和第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式III所示结构的天麻活性化合物;所述第五硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比为6:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;所述第三SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;

[0016] 步骤(4)和步骤(5)没有时间先后顺序。

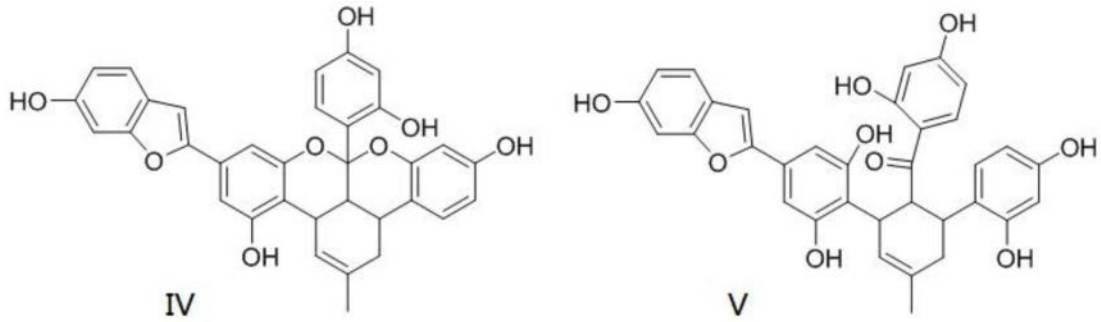
[0017] 优选地,所述醇提利用醇水溶液进行;所述醇水溶液中醇包括乙醇和/或甲醇;所述醇水溶液中醇的体积分数为95%。

[0018] 优选地,所述天麻的质量与醇水溶液的体积之比为1kg:2~4L。

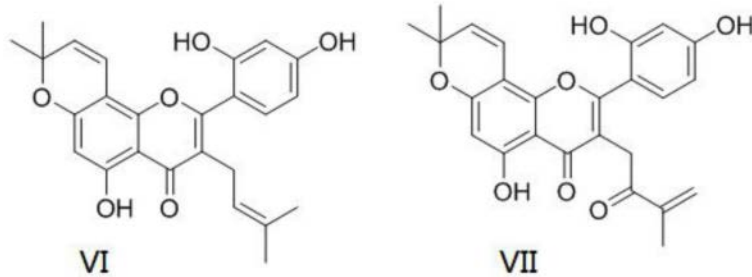
[0019] 优选地,所述醇提为回流醇提;所述醇提的次数为2~3次,单次醇提的时间为1~3h。

[0020] 优选地,所述MCI除色采用的洗脱液为水-甲醇溶剂,所述水-甲醇溶剂中水和甲醇的体积比为7:3~0:1。

[0021] 本发明提供了上述技术方案所述的天麻活性化合物、上述技术方案所述制备方法制得的天麻活性化合物或具有式IV~VII所示结构中的任意一种天麻活性化合物在制备药物中的应用;



[0022]



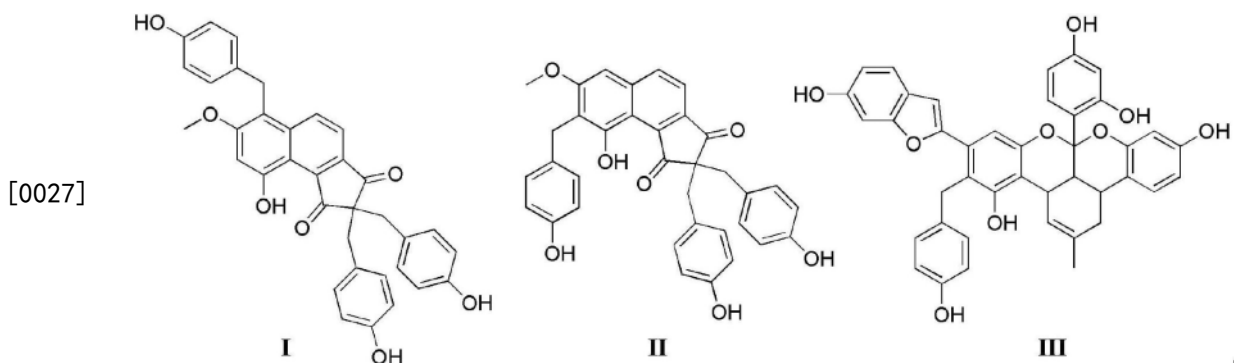
[0023] 优选地,所述应用为作为胆碱酯酶抑制剂应用。

[0024] 本发明提供了一种天麻活性化合物,具有式I~III中任意一种所示的结构。本发明提供的天麻活性化合物具有较好的酶活作用,尤其是对胆碱酯酶具有很好的抑制作用,在制备药物方面具有很好的应用前景。此外,本发明提供的天麻活性化合物还可以应用于医疗器械产品。

[0025] 本发明提供了上述技术方案所述天麻活性化合物的制备方法。本发明以传统中药天麻为原料进行醇提、分离得到上述天麻活性化合物,源于中草药,安全性和有效性高,极大的拓展了天麻的药学经济价值;制备方法操作简单,原料廉价易得,成本低,适宜工业化生产;而且,本发明提供的制备方法能够避免使用大量的有机原料,绿色环保。

### 具体实施方式

[0026] 本发明提供了一种天麻活性化合物,具有式I~III中任意一种所示的结构:



[0028] 本发明提供了上述技术方案所述天麻活性化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0029] (1) 将天麻进行醇提,得到醇提液;将所述醇提液进行乙酸乙酯萃取后浓缩,得到乙酸乙酯相;

[0030] (2) 将所述乙酸乙酯相进行第一硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8;所述第一硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为石油醚-丙酮溶剂,所述石油醚-丙酮溶剂中石油醚与丙酮的体积

比为100:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0031] (3)将所述组分Fr.8进行第二硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6和组分Fr.8.8;所述第二硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为15:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0032] (4)将所述组分Fr.8.6进行第三硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6.6;所述第三硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为5:1~2:1,洗脱方式为梯度洗脱;

[0033] 将所述组分Fr.8.6.6依次进行第一SephadexLH-20凝胶柱层析、第四硅胶柱层析分离、第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离和半制备高效液相色谱分离,分别得到具有式I和式II所示结构的天麻活性化合物;所述第一SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为乙酸乙酯-丙酮溶剂,所述乙酸乙酯-丙酮溶剂中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1:2~1:3,洗脱方式为梯度洗脱;所述第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;所述半制备高效液相色谱分离采用的流动相为乙腈体积分数为65%的乙腈水溶液;

[0034] (5)将所述组分Fr.8.8进行MCI除色,得到组分Fr.8.8.1;

[0035] 将所述组分Fr.8.8.1依次进行第五硅胶柱层析分离、第三Sephadex LH-20凝胶柱层析分离和第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式III所示结构的天麻活性化合物;所述第五硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比为6:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱;所述第三SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;

[0036] 步骤(4)和步骤(5)没有时间先后顺序。

[0037] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料组分均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0038] 本发明将天麻进行醇提,得到醇提液;将所述醇提液进行乙酸乙酯萃取后浓缩,得到乙酸乙酯相。在本发明中,所述天麻优选为干燥的天麻花杆。在本发明中,所述醇提优选利用醇水溶液进行,所述醇水溶液中醇的体积分数优选为70~95%,更优选为90~95%;所述醇水溶液中醇优选包括乙醇和/或甲醇。在本发明中,所述天麻的质量与醇水溶液的体积之比优选为1kg:2~4L,更优选为1kg:3L。在本发明中,所述醇提优选为回流醇提;所述醇提的次数优选为2~3次,更优选为3次;单次醇提的时间优选为1~3h,更优选为2h,合并提取液,得到醇提液。在本发明中,所述乙酸乙酯萃取的次数优选为2~4次,更优选为3次;单次乙酸乙酯萃取用乙酸乙酯与醇提液的体积比优选为1:0.5~2,更优选为1:1~1.5。本发明对于所述浓缩没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的浓缩方式即可,具体如减压浓缩。

[0039] 得到乙酸乙酯相后,本发明将所述乙酸乙酯相进行第一硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8;所述第一硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为石油醚-丙酮溶剂,所述石油醚-丙酮溶剂中石油醚与丙酮的体积比为100:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱。在本发明的具体实施例中,所述第一硅胶柱层析分离过程中优选采用TLC检测合并极性相同的组分(即划段),得到8个组分,依次记为组分Fr.1、组分Fr.2、组分Fr.3、组分Fr.4、组分Fr.5、组分Fr.6、组分

Fr.7和组分Fr.8。在本发明中,所述第一硅胶柱层析分离用硅胶的粒径优选为200~300目。

[0040] 得到组分Fr.8后,本发明将所述组分Fr.8进行第二硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6和组分Fr.8.8;所述第二硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为15:1~0:1,洗脱方式为梯度洗脱。在本发明中,所述第二硅胶柱层析分离优选为常压正相硅胶柱层析分离。在本发明的具体实施例中,所述第二硅胶柱层析分离过程中优选进行划段,得到13个组分,依次记为组分Fr.8.1、组分Fr.8.2、组分Fr.8.3、组分Fr.8.4、组分Fr.8.5、组分Fr.8.6、组分Fr.8.7、组分Fr.8.8、组分Fr.8.9、组分Fr.8.10、组分Fr.8.11、组分Fr.8.12和组分Fr.8.13。

[0041] 得到组分Fr.8.6后,本发明将所述组分Fr.8.6进行第三硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.6.6;所述第三硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-丙酮溶剂,所述氯仿-丙酮溶剂中氯仿和丙酮的体积比为5:1~2:1,洗脱方式为梯度洗脱。在本发明的具体实施例中,所述第三硅胶柱层析分离过程中优选进行划段,得到6个组分,依次记为组分Fr.8.8.1、组分Fr.8.8.2、组分Fr.8.8.3、组分Fr.8.8.4、组分Fr.8.8.5和组分Fr.8.8.6。

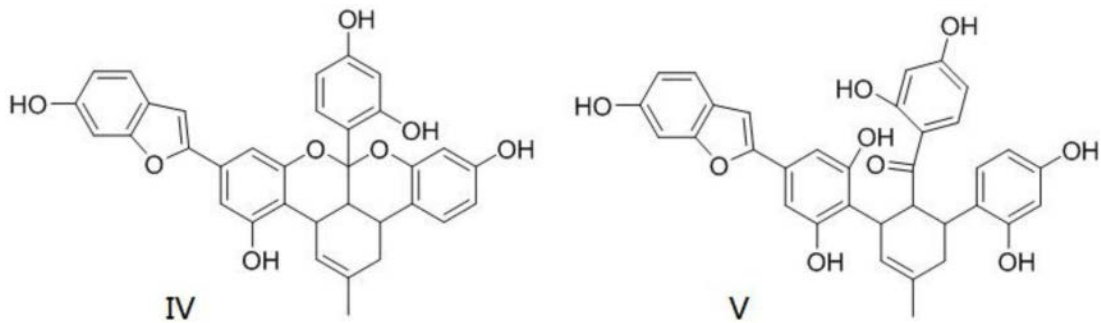
[0042] 得到组分Fr.8.6.6后,本发明将所述组分Fr.8.6.6依次进行第一Sephadex LH-20凝胶柱层析、第四硅胶柱层析分离、第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离和半制备高效液相色谱分离,得到具有式I和式II所示结构的天麻活性化合物;所述第一SephadexLH-20凝胶柱层析采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为乙酸乙酯-丙酮溶剂,所述乙酸乙酯-丙酮溶剂中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1:2~1:3,洗脱方式为梯度洗脱;所述第二SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇;所述半制备高效液相色谱(HPLC)分离采用的流动相为乙腈体积分数为65%的乙腈水溶液。在本发明中,所述第四硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。

[0043] 得到组分Fr.8.8后,本发明将所述组分Fr.8.8进行MCI除色,得到组分Fr.8.8.1。在本发明中,所述MCI除色采用的洗脱液为水-甲醇溶剂,所述水-甲醇溶剂中水和甲醇的体积比为7:3~0:1,洗脱方式优选为梯度洗脱。在本发明的具体实施例中,所述MCI除色过程中优选进行划段,得到7个组分,依次记为组分Fr.8.8.1、组分Fr.8.8.2、组分Fr.8.8.3、组分Fr.8.8.4、组分Fr.8.8.5、组分Fr.8.8.6和组分Fr.8.8.7。

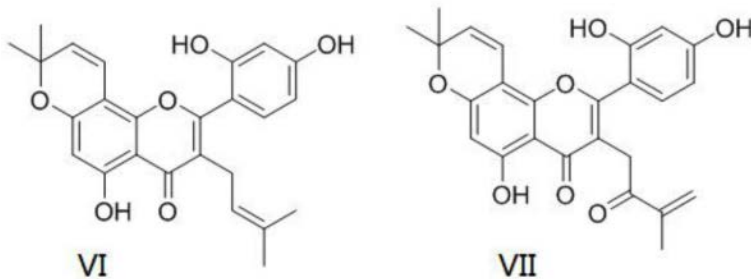
[0044] 得到组分Fr.8.8.1后,本发明将所述组分Fr.8.8.1依次进行第五硅胶柱层析分离、第三SephadexLH-20凝胶柱层析分离和第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离,分别得到具有式III所示结构的天麻活性化合物;所述第五硅胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比为6:1~0:1;所述第三SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为1:1;所述第四SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂为甲醇。在本发明中,所述第五硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,洗脱方式优选为梯度洗脱,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。

[0045] 本发明提供了上述技术方案所述的天麻活性化合物、上述技术方案所述制备方法制得的天麻活性化合物或具有式IV~VII所示结构中的任意一种天麻活性化合物在制备药物中的应用;





[0046]



[0047] 在本发明中,所述应用优选为作为胆碱酯酶抑制剂应用。

[0048] 在本发明中,所述具有式IV所示结构的天麻活性化合物的制备方法优选包括以下步骤:将所述组分Fr.8.8.2依次进行第六硅胶柱层析分离和第五SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式IV所示结构的天麻活性化合物。在本发明中,所述第五SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为氯仿-甲醇混合溶剂,所述氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比优选为1:1。在本发明中,所述第六硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比是15:1~1:1;所述第六硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。

[0049] 在本发明中,所述具有式V所示结构的天麻活性化合物的制备方法优选包括以下步骤:将所述组分Fr.8.10进行第七硅胶柱层析分离,得到组分Fr.8.10.10;将所述组分Fr.8.10.10依次进行第八硅胶柱层析分离、第六Sephadex LH-20凝胶柱层析分离和第七SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式V所示结构的天麻活性化合物。在本发明中,所述第七硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为氯仿-丙酮混合溶剂,所述氯仿-丙酮混合溶剂中氯仿和丙酮的体积比为1:1;所述第七硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析分离,采用的硅胶的粒径优选为200~300目,在本发明的具体实施例中,优选进行划段得到12个组分,依次记为组分Fr.8.10.1、组分Fr.8.10.2、组分Fr.8.10.3、组分Fr.8.10.4、组分Fr.8.10.5、组分Fr.8.10.6、组分Fr.8.10.7、组分Fr.8.10.8、组分Fr.8.10.9、组分Fr.8.10.10、组分Fr.8.10.11和组分Fr.8.10.12。在本发明中,所述第八硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比是15:1~1:1,洗脱方式优选为梯度洗脱;所述第八硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。在本发明中,所述第六Sephadex LH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为氯仿-甲醇溶剂,所述氯仿-甲醇溶剂中氯仿和甲醇的体积比优选为1:1。在本发明中,所述第七Sephadex LH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为甲醇。

[0050] 在本发明中,所述具有式VI和式VII所示结构的天麻活性化合物的制备方法优选包括以下步骤:将所述组分Fr.7进行第九硅胶柱层析分离,得到组分Fr.7.8和组分

Fr.7.11;将所述组分Fr.7.8依次进行第十硅胶柱层析分离和半制备HPLC分离,得到具有式VII所示结构的天麻活性化合物;将所述组分Fr.7.11进行第十一硅胶柱层析分离和第八SephadexLH-20凝胶柱层析分离,得到具有式VI所示结构的天麻活性化合物。在本发明中,所述第九硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为石油醚-丙酮混合溶剂,所述石油醚-丙酮混合溶剂中石油醚和丙酮的体积比优选为石油醚-丙酮溶剂中石油醚与丙酮的体积比为20:1~0:1,洗脱方式优选为梯度洗脱;所述第九硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析分离,采用的硅胶的粒径优选为200~300目,在本发明的具体实施例中,所述第九硅胶柱层析分离过程中优选进行划段,得到14个组分,依次记为组分Fr.7.1、组分Fr.7.2、组分Fr.7.3、组分Fr.7.4、组分Fr.7.5、组分Fr.7.6、组分Fr.7.7、组分Fr.7.8、组分Fr.7.9、组分Fr.7.10、组分Fr.7.11、组分Fr.7.12、组分Fr.7.13和组分Fr.7.14。在本发明中,所述第十硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为石油醚-乙酸乙酯溶剂,所述石油醚-乙酸乙酯溶剂中石油醚和乙酸乙酯的体积比优选为5:1~0:1,洗脱方式优选为梯度洗脱;所述第十硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。在本发明中,所述所述半制备HPLC分离采用的流动相为甲醇体积分数为75%的甲醇水溶液。在本发明中,所述第十一硅胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为石油醚-乙酸乙酯溶剂,所述石油醚-乙酸乙酯溶剂中石油醚和乙酸乙酯的体积比优选为20:1~0:1,洗脱方式优选为梯度洗脱;所述第十一硅胶柱层析分离优选为反复常压正相硅胶柱层析,采用的硅胶的粒径优选为200~300目。在本发明中,所述所述第八SephadexLH-20凝胶柱层析分离采用的洗脱剂优选为甲醇。

[0051] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

#### [0052] 实施例1

[0053] 用95%乙醇水溶液对170kg干燥的天麻花杆回流提取3次,每次提取时间为2h,合并3次提取液即为醇提液,单次提取用乙醇水溶液体积为340L;将所述醇提液用乙酸乙酯等体积萃取3次,合并萃取液后减压浓缩,得到乙酸乙酯相和水相。将所述乙酸乙酯相进行硅胶柱层析分离(石油醚和丙酮体积比=20:1~0:1,梯度洗脱),TLC检测合并极性相同部分(即划段),得到8个组分,依次记为组分Fr.1组分~Fr.8。

[0054] 对所述组分Fr.7(124g)进行常压正相硅胶柱层析分离(石油醚:丙酮体积比=20:1~0:1,梯度洗脱),划段,得到14个组分,依次记为组分Fr.7.1~组分Fr.7.14。将组分Fr.7.8(12g)经SephadexLH-20凝胶柱层析分离(氯仿:甲醇体积比=1:1),再经过反复常压正相柱层析(硅胶200~300目,氯仿与甲醇体积比=15:1~0:1,梯度洗脱)和进一步进行半制备HPLC分离(75%甲醇水溶液等度洗脱),得到具有式VII所示结构的天麻活性化合物(5mg)。将所述组分Fr.7.11(20g)进行SephadexLH-20凝胶柱层析分离(氯仿:甲醇体积比=1:1),再经过反复常压正相柱层析分离(硅胶200~300目,洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯体积比=20:1~0:1)和SephadexLH-20凝胶柱层析分离(甲醇),得到具有式VI所示结构的天麻活性化合物(22mg)。

[0055] 将组分Fr.8(743g)进行常压正相硅胶柱层析分离(氯仿:丙酮体积比=15:1~0:

1, 梯度洗脱), 划段, 得到13个部分, 依次记为组分Fr. 8.1~组分Fr. 8.13。将所述组分Fr. 8.6 (26g) 进行常压正相硅胶柱层析分离(氯仿: 丙酮体积比=5:1~2:1, 梯度洗脱), 划段, 得到6个组分, 依次记为组分Fr. 8.6.1~组分Fr. 8.6.6。将所述组分Fr. 8.6.6 (5.3g) 经SephadexLH-20凝胶柱层析分离(氯仿: 甲醇体积比=1:1)、反复常压正相柱层析(硅胶200~300目, 乙酸乙酯: 丙酮的体积比=1:2~1:3, 梯度洗脱) 和SephadexLH-20凝胶柱层析分离(甲醇), 再进一步半制备HPLC分离(65v/v% 乙腈水溶液等度洗脱15min, 再用70% 乙腈水溶液等度洗脱20min), 得到具有式I (23mg) 和式II (4mg) 所示结构的天麻活性化合物。将组分Fr. 8.8 (13g) 经MCI除色(水: 甲醇体积比=7:3~0:1, 梯度洗脱), 得到7个组分, 依次记为组分Fr. 8.8.1~组分Fr. 8.8.7。将组分Fr. 8.8.1经反复常压正相柱层析分离(硅胶200~300目, 氯仿: 甲醇的体积比=6:1~0:1, 梯度洗脱)、SephadexLH-20凝胶柱层析(氯仿: 甲醇体积比=1:1) 和SephadexLH-20凝胶柱层析分离(甲醇), 得到具有式III所示结构的天麻活性化合物(29mg)。将所述组分Fr. 8.8.2经反复常压正相柱层析分离(硅胶200~300目, 氯仿: 甲醇的体积比=15:1~1:1, 梯度洗脱)、SephadexLH-20凝胶柱层析(氯仿: 甲醇体积比=1:1) 和SephadexLH-20凝胶柱层析(甲醇), 得到具有式IV所示结构的天麻活性化合物(53mg)。将所述组分Fr. 8.10进行常压正相硅胶柱层析分离(氯仿: 丙酮体积比=1:1, 硅胶200~300目), 划段, 得到12个部分, 依次记为组分Fr. 8.10.1~Fr. 8.10.12。将所述组分Fr. 8.10.10经常压正相柱层析(硅胶200~300目, 氯仿和甲醇的体积比=15:1~1:1, 梯度洗脱)、Sephadex LH-20凝胶柱层析(氯仿: 甲醇体积比=1:1) 和SephadexLH-20凝胶柱层析(甲醇) 得到具有式V所示结构的天麻活性化合物(16mg)。

[0056] 具有式I~VII所示结构的天麻活性化合物中, 具有式I (gastrodinolB)、式II (gastrodinolC) 所示结构的天麻活性化合物为赤剑素类化合物, 具有式III (benzylmulberrofuranG)、式IV (mulberrofuranG) 和式V (mulberrofuran) 所示结构的天麻活性化合物为桑黄素类化合物, 具有式VI (morusin) 和式VII (notabilisinG) 所示结构的天麻活性化合物为异戊烯基化黄酮类化合物, 各化合物的核磁数据如下:

[0057] GastrodinolB (式I):  $C_{35}H_{28}O_7$ ; (-) HRESI-MSm/z 673.1695 ( $[M+CF_3COO]^-$ , calcd 673.1691);  $^1H$ NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  12.11 (s, 1H, 10-OH), 9.12 (s, 3H, 4', 4'', 4'''-OH), 8.21 (d, J=9.0Hz, 1H, H-7), 7.50 (d, J=8.9Hz, 1H, H-6), 7.02 (s, 1H, H-11), 6.80 (d, J=8.6Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.71 (d, J=8.5Hz, 4H, H-2'', H-6'', H-2''', H-6'''), 6.55 (d, J=8.5Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.38 (d, J=8.5Hz, 4H, H-3'', H-5'', H-3''', H-5'''), 4.10 (s, 2H, H-7'), 3.92 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 3.14 (m, 4H, H-7'', H-7''');  $^{13}C$ NMR (126MHz, DMSO)  $\delta_C$  210.38 (C-3), 200.57 (C-1), 159.72 (C-12), 155.98 (C-4'', C-4'''), 155.40 (C-4'), 155.32 (C-10), 142.19 (C-5), 140.34 (C-4), 136.80 (C-8), 135.46 (C-7), 130.49 (C-1'), 130.44 (C-2'', C-6'', C-2''', C-6'''), 128.72 (C-2', C-6'), 125.15 (C-1'', C-1'''), 117.65 (C-6), 115.16 (C-3'', C-5'', C-3''', C-5'''), 115.06 (C-13), 114.97 (C-3', C-5'), 112.56 (C-9), 101.84 (C-11), 61.84 (C-2), 56.35 (12-OCH<sub>3</sub>), 39.96 (C-7'', C-7'''), 28.73 (C-7')。

[0058] GastrodinolC (式II):  $C_{35}H_{28}O_7$ ; (-) HRESI-MSm/z 605.1812 ( $[M+COOH]^-$ , calcd 605.1817);  $^1H$ NMR (500MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta_H$  7.93 (dt, J=8.5, 1.6Hz, 1H, H-7), 7.43 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6), 7.09 (d, J=8.6Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.89 (s, 1H, H-13), 6.80 (d, J=8.6Hz, 4H, H-2'', H-6'', H-2''', H-6'''), 6.65 (d, J=8.5Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.38 (d, J=

8.6Hz, 4H, H-3", H-5", H-3"', H-5'''), 4.05(s, 2H, H-7'), 3.89(s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 3.21(s, 4H, H-7", H-7'''); <sup>13</sup>CNMR (126MHz, MeOD) δ<sub>c</sub>: 211.92 (C-3), 203.22 (C-1), 162.13 (C-12), 157.27 (C-4", C-4'''), 156.20 (C-4'), 154.56 (C-10), 144.67 (C-5), 141.66 (C-4), 139.67 (C-8), 139.45 (C-7), 133.10 (C-1'), 131.81 (C-2", C-6", C-2''', C-6'''), 130.60 (C-2', C-6'), 127.45 (C-1", C-1'''), 120.59 (C-11), 118.03 (C-6), 115.89 (C-3", C-5", C-3''', C-5'''), 115.80 (C-3', C-5'), 115.37 (C-9), 100.75 (C-13), 63.89 (C-2), 56.31 (12-OCH<sub>3</sub>), 41.76 (C-7", C-7'''), 29.32 (C-7').

[0059] BenzylmulberrofuranG (式III): C<sub>41</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>; (+) HRESI-MSm/z 669.2126 ([M+H]<sup>+</sup>, calcd 669.2119); <sup>1</sup>HNMR (500MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.56 (s, 1H, 10"-OH), 8.54 (s, 1H, 6-OH), 8.50 (s, 1H, 12"-OH), 8.34 (s, 1H, 18"-OH), 8.12 (s, 1H, 4"'-OH), 7.49 (s, 1H, 3'-OH), 7.33 (d, J=8.4Hz, 1H, H-4), 7.23 (d, J=8.7Hz, 1H, H-14"), 7.14 (dd, J=8.4, 1.2Hz, 1H, H-20"), 7.03 (s, 1H, H-6'), 6.94 (dd, J=2.1, 0.9Hz, 1H, H-7), 6.90 (d, J=8.6Hz, 2H, H-2"', H-6'''), 6.77 (dd, J=8.4, 2.1Hz, 1H, H-5), 6.67 (d, J=8.6Hz, 2H, H-3"', H-5'''), 6.65 (d, J=0.9Hz, 1H, H-3), 6.50 (dd, J=8.4, 2.5Hz, 1H, H-19"), 6.43 (dd, J=3.7, 2.4Hz, 1H, H-2"), 6.42 (d, J=2.4Hz, 1H, H-11"), 6.36 (d, J=2.5Hz, 1H, H-17"), 6.24 (dd, J=8.6, 2.4Hz, 1H, H-13"), 4.16 (s, 2H, H-7'''), 3.56 (d, J=5.6Hz, 1H, H-3"), 3.36 (dd, J=11.9, 5.6Hz, 1H, H-4"), 2.99 (m, 1H, H-5"), 2.73 (dd, J=17.1, 5.4Hz, 1H, H-6" a), 2.02 (dd, J=17.1, 12.0Hz, 1H, H-6" b), 1.77 (s, 3H, H-7"). <sup>13</sup>CNMR (126MHz, Acetone) δ<sub>c</sub>: 159.93 (C-12"), 157.78 (C-18"), 157.59 (C-10"), 156.64 (C-6), 156.45 (C-7a), 156.33 (C-4'''), 155.78 (C-3'), 154.60 (C-2), 153.38 (C-16"), 152.35 (C-5'), 134.39 (C-1"), 131.98 (C-1'''), 131.49 (C-1'), 130.47 (C-14"), 129.83 (C-2''', C-6'''), 127.91 (C-20"), 122.38 (C-3a), 122.34 (C-2"), 121.99 (C-4), 119.70 (C-2'), 117.56 (C-15"), 116.89 (C-9"), 115.94 (C-3''', C-5'''), 115.28 (C-4'), 113.09 (C-5), 109.86 (C-19"), 109.56 (C-6'), 107.15 (C-13"), 105.60 (C-3), 104.62 (C-11"), 103.95 (C-17"), 102.47 (C-8"), 98.28 (C-7), 37.40 (C-4"), 36.29 (C-6"), 35.16 (C-3"), 32.05 (C-7'''), 28.52 (C-5"), 23.96 (C-7").

[0060] mulberrofuranG (式IV): 600MHz, Methanol-d<sub>4</sub> δ<sub>H</sub>: 7.11 (d, J=8.2Hz, 1H, H-6'), 6.60 (d, J=9.9Hz, 1H, H-1"), 6.42 (d, J=2.2Hz, 1H, H-3'), 6.41-6.39 (dd, J=8.2Hz, 2.2Hz, 1H, H-5'), 6.15 (s, 1H, H-6), 5.59 (d, J=9.9Hz, 1H, H-2"), 5.09 (t, J=7.1Hz, 1H, H-2'''), 3.10 (d, J=7.1Hz, 2H, H-1'''), 1.59 (s, 3H, H-4'''), 1.43 (s, 6H, H-4", H-5"), 1.40 (s, 3H, H-5'''). <sup>13</sup>CNMR (151MHz, MeOD) δ<sub>c</sub>: 183.88 (C-4), 163.58 (C-2), 162.72 (C-5), 162.07 (C-4'), 160.48 (C-7), 157.95 (C-2'), 153.79 (C-8a), 132.87 (C-3'''), 132.44 (C-6'), 128.20 (C-2"), 122.72 (C-2'''), 122.05 (C-3), 115.77 (C-1"), 113.07 (C-1'), 108.04 (C-5'), 105.92 (C-8), 103.84 (C-3'), 102.22 (C-4a), 100.11 (C-6), 79.14 (C-3"), 28.40 (C-4", C-5"), 25.86 (C-4'''), 24.90 (C-1'''), 17.68 (C-5''').

[0061] mulberrofuran (式V): 500MHz, Methanol-d<sub>4</sub> δ<sub>H</sub>: 7.11 (d, J=8.3Hz, 1H, H-6'), 6.62 (d, J=10.0Hz, 1H, H-1"), 6.38 (d, J=8.3Hz, 1H, H-5'), 6.37 (s, 1H, H-3'), 6.16 (s, 1H, H-6), 6.03 (s, 1H, H-4'' b), 5.79 (s, 1H, H-4'' a), 5.61 (d, J=10.0Hz, 1H, H-2"), 3.82 (s, 2H, H-1'''), 1.83 (s, 3H, H-5'''), 1.44 (s, 6H, H-4", H-5"); <sup>13</sup>CNMR (126MHz, MeOD) δ<sub>c</sub>: 200.68 (C-2'''), 183.28 (C-4), 164.32 (C-2), 162.61 (C-5), 162.51 (C-2'), 160.69 (C-7), 158.06 (C-

4'), 153.84(C-8a), 145.54(C-3''), 132.32(C-6'), 128.43(C-2''), 125.71(C-4''), 117.38(C-3), 115.69(C-1''), 112.31(C-1'), 108.38(C-5'), 105.54(C-4a), 103.84(C-3'), 102.38(C-8), 100.33(C-6), 79.23(C-3''), 35.73(C-1''), 28.39(C-4'', C-5''), 17.83(C-5'')。

[0062] morusin(式VI): 500MHz, Acetone- $d_6$   $\delta_H$ : 8.55(d, J=9.0Hz, 1H, H-14''), 7.34(d, J=8.4Hz, 1H, H-4), 6.97(d, J=8.4Hz, 1H, H-20''), 6.93(d, J=2.2Hz, 1H, H-7), 6.92(d, J=0.9Hz, 1H, H-3), 6.77(s, 2H, H-2', H-6'), 6.76(dd, J=8.3, 2.1Hz, 1H, H-5), 6.52(d, J=2.4Hz, 1H, H-17''), 6.37(dd, J=9.0, 2.4Hz, 1H, H-13''), 6.30(dd, J=8.4, 2.4Hz, 1H, H-19''), 6.23(d, J=2.3Hz, 1H, H-11''), 5.76(d, J=2.8Hz, 1H, H-2''), 4.62(dd, J=5.4, 3.7Hz, 1H, H-4''), 4.12(p, J=2.6Hz, 1H, H-3''), 3.75(dt, J=6.3, 3.0Hz, 1H, H-5''), 2.53-2.43(m, 1H, H-6''b), 2.26-2.14(m, 1H, H-6''a), 1.95(s, 3H, H-7'');  $^{13}C$ NMR (126MHz, Acetone)  $\delta_C$ : 209.36(C-8''), 167.01(C-12''), 166.73(C-10''), 157.91(C-16''), 157.80(C-18''), 156.63(C-3', 5', 2), 156.49(C-7a), 155.36(C-6), 135.07(C-14''), 133.71(C-1''), 130.83(C-1'), 128.60(C-20''), 124.38(C-2''), 122.45(C-15''), 121.78(C-4), 121.74(C-3a), 116.48(C-9''), 113.23(C-4'), 113.09(C-5), 109.05(C-13''), 107.29(C-19''), 104.69(C-2', C-6'), 103.55(C-11''), 103.48(C-17''), 101.80(C-3), 98.30(C-7), 47.77(C-4''), 36.40(C-5''), 33.08(C-3''), 32.27(C-6''), 23.82(C-7'')。

[0063] notabilisinG(式VII): 400MHz, Methanol- $d_4$   $\delta_H$ : 7.34(d, J=8.4Hz, 1H, H-4), 7.14(d, J=8.6Hz, 1H, H-14''), 7.09(d, J=8.4Hz, 1H, H-20''), 6.92(s, 1H, H-7), 6.91(d, J=1.8Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.82(s, 1H, H-3), 6.73(dd, J=8.4, 2.1Hz, 1H, H-5), 6.46(dd, J=8.4, 2.6Hz, 1H, H-19''), 6.40(d, J=4.7Hz, 1H, H-2''), 6.35(d, J=2.5Hz, 1H, H-17''), 6.33(d, J=2.4Hz, 1H, H-11''), 6.14(dd, J=8.6, 2.4Hz, 1H, H-13''), 3.34-3.23(m, 2H, H-3'', H-4''), 2.95(td, J=11.1, 5.4Hz, 1H, H-5''), 2.66(dd, J=17.1, 5.5Hz, 1H, H-6''a), 2.01(dd, J=17.0, 11.4Hz, 1H, H-6''b), 1.78(s, 3H, H-7'');  $^{13}C$ NMR (101MHz, MeOD)  $\delta_C$ : 158.65(C-10''), 157.02(C-18''), 156.51(C-12''), 156.33(C-6), 155.85(C-2), 155.39(C-5'), 154.34(C-3'), 153.52(C-16''), 152.21(C-7a), 132.52(C-1''), 130.14(C-1'), 129.18(C-14''), 126.60(C-20''), 121.96(C-2''), 121.71(C-3a), 120.60(C-4), 116.89(C-4'), 115.96(C-15''), 112.52(C-9''), 111.85(C-5), 108.65(C-19''), 105.63(C-13''), 104.10(C-3), 103.60(C-6'), 103.15(C-2'), 102.78(C-17''), 101.70(C-8''), 100.76(C-11''), 97.10(C-7), 36.24(C-3''), 35.34(C-6''), 34.02(C-5''), 27.44(C-4''), 22.54(C-7'')。

[0064] 测试例1

[0065] 具有式I~VII所示结构的天麻活性化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性

[0066] (1) 实验材料与试剂

[0067] 试剂:  $Na_2HPO_4$ ;  $NaH_2PO_4$ ; 乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、DTNB、他克林(Tacrine)均购自Sigma。

[0068] 仪器: MultiskanFC酶标仪(Thermo公司)。

[0069] (2) 实验方法

[0070] (2.1) 用磷酸盐缓冲液(每100mL磷酸盐缓冲液中含0.1M  $Na_2HPO_4$  溶液94.7mL; 0.1M  $NaH_2PO_4$  溶液5.3mL, 调pH值至8.0)将AChE稀释成0.1U/mL工作液;

[0071] (2.2) 碘化硫代乙酰胆碱和DTNB用磷酸盐缓冲液配成6.25mM的溶液(工作液);

[0072] (2.3) 化合物用DMSO稀释成浓度梯度。阳性对照为他克林,用DMSO稀释成浓度梯度;阴性对照组(NC组)为2%DMSO溶剂对照。

[0073] (2.4) 反应在96孔板中进行,铺板按200 $\mu$ L/体系,每个样品做3个重复;

[0074] (2.5) 化合物和他克林(TA)浓度梯度的设定(用1%DMSO稀释)如表1所示,个别活性较好样品,会降低浓度以求得IC<sub>50</sub>。

[0075] 表1化合物和他克林(TA)浓度梯度的设定

[0076]	TA浓度梯度设定	化合物浓度梯度设定
	2 $\mu$ M	100 $\mu$ M
	1 $\mu$ M	50 $\mu$ M
	0.5 $\mu$ M	30 $\mu$ M
[0077]	0.2 $\mu$ M	10 $\mu$ M
	0.04 $\mu$ M	3 $\mu$ M
	0.008 $\mu$ M	1 $\mu$ M
	0.0016 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M

[0078] (2.6) 铺板:200 $\mu$ L/体系,每孔内DMSO的终浓度均为0.1%,每个样本做3个复孔,各试剂加入顺序和加入量如表2所示。

[0079] 表2各试剂加入顺序和加入量

顺序	试剂 (工作液及其浓度)	Blank 组 (μL)	NC组 (μL)	他克林 组 (μL)	化合物 组 (μL)	各种试剂反应终浓度
1)	磷酸缓冲液 (pH 8.0)	150	110	110	110	-
2)	DMSO (2%)	10	10	-	-	0.1%
3)	他克林(设浓度梯度)	-	-	10	-	设浓度梯度
[0080] 4)	化合物 (设浓度梯度)	-	-	-	10	设浓度梯度
5)	AChE酶 (0.1 U/mL)	-	40	40	40	0.004 U/次反应 (0.02 U/mL)
在PE酶标仪中 37 °C 孵育 20 min, 405 nm测 2 次背景值, 再加入:						
6)	DTNB (6.25 mM) 和碘 化硫代乙酰胆碱 (6.25 mM) 的等体积混合液	40	40	40	40	DTNB (0.625 mM)、 碘化硫代乙酰胆碱 (0.625 mM)

[0081] (2.7) 加入显色剂和底物后1小时内,每30秒钟检测一次405nm吸光值。

[0082] (2.8) 选择NC组吸光值平均值约为1时的样品吸光值,计算化合物吸光值平均值(化合物测定值-背景值),并按照(NC-化合物吸光值平均值)/NC\*100%来计算化合物AChE抑制率。

[0083] (3) 实验结果如表3所示。

[0084] 表3天麻活性化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性结果

样品	浓度 ( $\mu\text{M}$ )	抑制率 (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Tacrine	2	89.309	0.138 $\pm$ 0.005
	1	84.074	
	0.5	76.161	
	0.2	59.187	
	0.04	28.717	
	0.008	5.308	
	0.0016	0.817	
	[0085] I	100	
50		62.407	
30		56.872	
10		21.769	
3		4.537	
1		-0.188	
0.2		-3.535	
II		100	72.550
	50	69.749	
	30	62.288	
	10	38.886	
	3	17.880	
	1	4.620	
	0.2	1.758	



		2	90.856	
		1	77.917	
		0.5	49.401	
	III	0.2	23.016	0.488±0.032
		0.1	4.636	
		0.05	-0.969	
		0.025	-5.274	
		8	95.929	
		4	93.585	
		2	78.843	
	IV	1	46.875	1.057±0.011
		0.5	26.095	
		0.2	9.960	
		0.1	8.651	
[0086]		8	78.872	
		4	56.898	
		2	37.001	
	V	1	18.489	3.124±0.127
		0.5	10.185	
		0.2	1.280	
		0.1	-1.660	
		100	75.116	
		50	69.554	
		30	63.390	
	VI	10	56.515	5.344±0.341
		3	41.756	
		1	17.884	
		0.2	9.345	
	VII	100	63.796	10.809±1.144

---

	50	61.849
	30	57.189
[0087]	10	45.192
	3	32.702
	1	16.577
	0.2	8.284

---

[0088] 由表3可知,本本本发明制备的天麻活性化合物对乙酰胆碱酯酶具有很好的抑制作用。

[0089] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。