



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106966887 B

(45)授权公告日 2020.06.05

(21)申请号 201710213416.5

C07C 45/79(2006.01)

(22)申请日 2017.03.28

A61P 25/28(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12P 7/26(2006.01)

申请公布号 CN 106966887 A

C12R 1/645(2006.01)

(43)申请公布日 2017.07.21

(56)对比文件

(73)专利权人 兰州理工大学

CN 102653720 A,2012.09.05,

地址 730050 甘肃省兰州市七里河区兰工坪路287号

CN 102911040 A,2013.02.06,

(72)发明人 杨中铨 陈效威

CN 102936252 A,2013.02.20,

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

CN 105503531 A,2016.04.20,

代理人 汤东风

KR 20010025876 A,2001.04.06,

Desheng Liu 等.A New Sesquiterpenoid

Derivative from the Coastal Saline Soil Fungus *Aspergillus fumigatus*.

《Rec.Nat.Prod》.2016,第10卷(第6期),第708-713页.

(51)Int.Cl.

审查员 陈平

C07C 49/743(2006.01)

C07C 45/78(2006.01)

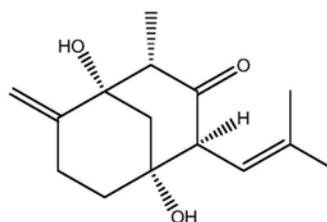
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

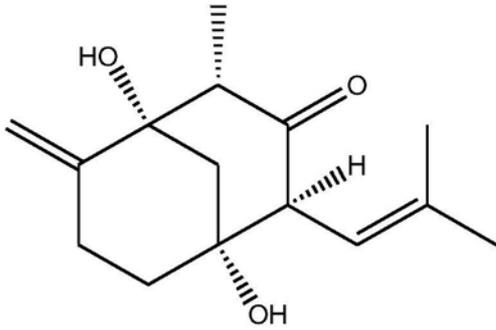
胶孢炭疽菌中分离的化合物及其制备方法  
与用途

(57)摘要

本发明公开了一种胶孢炭疽菌中分离的化合物及其制备方法与用途,所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的分子式为:C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>,所述化合物的制备方法为:取已冻存好的胶孢炭疽菌菌株活化,将活化的菌株接种至培养基培养,配制PDB液体培养基,灭菌;另无菌水溶解青霉素、链霉素各一瓶,加入发酵罐中;再将所述灭菌后培养物接入发酵罐中发酵;发酵结束后将所得发酵产物抽滤得菌丝体。再进行萃取、浓缩后得到菌液提取物;将粗提物进行柱层析、洗脱、湿法装柱,再次洗脱,硅胶柱层析,再用石油醚-丙酮洗脱液进行洗脱、柱层析、氯仿-甲醇洗脱脱色,分离得化合物胶孢炭疽菌素甲。本发明提供的化合物,可用于制备抗老年痴呆药物。



1. 一种胶孢炭疽菌中分离的化合物,其特征在於,所述化合物命名为胶孢炭疽菌素甲,分子式为: $C_{15}H_{22}O_3$ ,结构式如下:



2. 一种如权利要求1所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,包括以下步骤:

(1) 胶孢炭疽菌的发酵

a. 菌株活化:取已冻存好的胶孢炭疽菌菌株,在超净工作台中接种至PDA固体培养基的平板上,28℃恒温培养箱中培养7天;

b. 接种及菌株的一级发酵:将活化的菌株接种至装有200mL PDB液体培养基的500ml锥形瓶中,共设12瓶,置于28℃恒温气浴旋转式摇床培养;

c. 菌株的大批量发酵:配制PDB液体培养基共计45L,进行灭菌,灭菌结束后冷却培养基至室温;另无菌水溶解青霉素、链霉素各一瓶,加入发酵罐中;再将菌株一级发酵培养物接入发酵罐中,保持28℃,控制通气量和保持发酵液循环,发酵21天,得菌液;

(2) 胶孢炭疽菌次级代谢物的提取

发酵结束后将所得发酵产物抽滤,分别得到深褐色滤液和黑色菌丝体;发酵液50L用等体积的有机溶剂萃取三次,合并有机层,减压浓缩,得到菌液提取物;

(3) 菌液提取物次级代谢产物的分离

a. 将粗提物用HPD-100大孔树脂进行柱层析,配制乙醇体积含量分别为0%、10%、30%、50%、70%、90%、100%的乙醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,然后弃去水洗脱部分,TLC检测跟踪合并,得到6个组分,分别记为:Fr. 1、Fr. 2、Fr. 3、Fr. 4、Fr. 5、Fr. 6;

b. 取50g的MCI-gel湿法装柱,称取2g Fr. 4样品湿法上样,配制甲醇与水体积比分别为0:100,20:80,40:60,60:40,80:20,100:0的甲醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,每个梯度用5L洗脱液洗脱,每250ml收集浓缩一次,TLC检测合并得到7个粗组分,分别记为:Fr. 4-A、Fr. 4-B、Fr. 4-C、Fr. 4-D、Fr. 4-E、Fr. 4-F、Fr. 4-G;

c. 选取Fr. 4-B进行硅胶柱层析,所述硅胶目数为200~300目,用石油醚-丙酮洗脱液进行洗脱,TLC点板合并,再用sephdex LH-20柱层析,然后用氯仿-甲醇洗脱液进行洗脱脱色,脱色后用高效液相色谱进行分离,收集 $t_R=45\text{min}$ 的峰得到胶孢炭疽菌素甲。

3. 根据权利要求2所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,其特征在於,步骤(1) b中,所述恒温气浴旋转式摇床的转速为160r/min,培养时间为10天,发酵总体积为2.4L。

4. 根据权利要求2所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,其特征在於,步骤(1) c中,所述灭菌是在蒸气发生装置上灭菌,灭菌温度为115-118℃,灭菌时间为2.5h。

5. 根据权利要求2所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,其特征在於,步骤(1) c中,所述灭菌是在空气过滤器用灭菌锅中进行的,灭菌温度为121℃,灭菌时间为20min。

6. 根据权利要求2-5任意一项所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,其特征在于,步骤(3)c中,所述石油醚-丙酮洗脱液中石油醚与丙酮的体积比为20:1,所述氯仿-甲醇洗脱液中氯仿与甲醇的体积比为1:1。

7. 根据权利要求6所述胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,其特征在于,步骤(3)c中,所述高效液相色谱的流速为2ml/min,流动相为48%的甲醇,检测波长为210nm,色谱柱为Gemini-NX柱。

8. 一种如权利要求1所述的胶孢炭疽菌中分离的化合物的应用,其特征在于,所述化合物在制备抗老年痴呆药物方面的用途。

## 胶孢炭疽菌中分离的化合物及其制备方法与用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物分离制备技术领域,尤其涉及一种胶孢炭疽菌中分离的化合物及其制备方法与用途。

### 背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease,AD),即老年性痴呆,是一种渐进性的、神经衰退疾病,伴有记忆丧失和认知障碍等特征,随着老龄化的速度加快,阿尔茨海默病患者的人数急剧增加,并逐渐上升为一个社会问题,阿尔茨海默病的治疗也成为了科学界亟待解决的问题。

[0003] 如今,阿尔茨海默病的病因及发病机制尚未阐明。目前,国内外临床研究表明,乙酰胆碱酯酶抑制剂是治疗AD最有效的药物,因为对乙酰胆碱酶有抑制的药物,可显著提高AD病人脑内的乙酰胆碱水平,起到预防和治疗AD的作用。乙酰胆碱酯酶(AChE)是特异性水解乙酰胆碱(ACh)的酶,主要存在于胆碱能神经元、神经肌肉接头、红细胞等组织中。因为中枢乙酰胆碱酯酶(AChE)被抑制后能够增加脑内乙酰胆碱含量,而现代病理学显示:脑内胆碱能神经减少,使乙酰胆碱下降是导致阿尔茨海默病(AD)的关键原因,所以临床上主要使用乙酰胆碱酯酶抑制剂来治疗阿尔茨海默病(Mayeux R,Sano M.Treatment of Alzheimer's disease.Nejm.,1999,341:1670-1679.)。

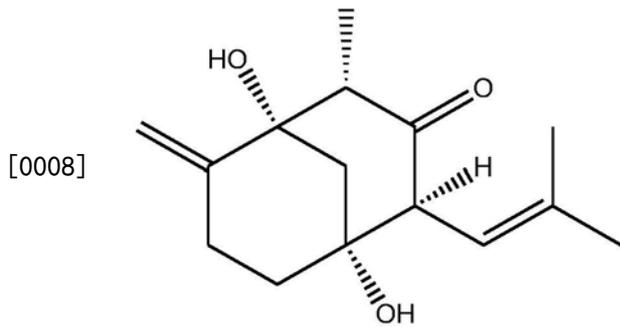
[0004] 药用植物内生真菌是一大类刚刚起步研究的新的资源微生物,随着对药用植物内生真菌的深入研究,从药用植物内生真菌中寻找新的生物活性成分已成为各领域的研究热点,如农用药物、污水处理、石油勘探、精细化工、治疗药物、发酵及食品工程、单细胞蛋白、生物多聚物、酶制剂及人类蛋白质遗传工程等,其中医药和农用药物受到了更为特别的重视。

[0005] 本发明使用的胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是从钩藤(*Uncaria tomentosa*)上分离得到的一株菌株,本发明从胶孢炭疽菌中分离出一种化合物——胶孢炭疽菌素甲(*Colletotrichine A*),并通过改良的Ellman法测定了该化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性,测定结果表明该化合物具有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性,因而该化合物能作为乙酰胆碱酯酶抑制剂用于老年痴呆症药物的制备。但是,到目前为止,尚未见关于从胶孢炭疽菌中分离得到胶孢炭疽菌素甲以及其对乙酰胆碱酯酶抑制活性的报道。

### 发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明人通过大量的实验与创造性的劳动,从胶孢炭疽菌中分离得到一种新的化合物,并且惊奇的发现,这种化合物具有有效的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

[0007] 本发明的目的在于提供一种胶孢炭疽菌中分离的化合物,所述胶孢炭疽菌中分离的化合物命名为胶孢炭疽菌素甲,分子式为: $C_{15}H_{22}O_3$ ,结构式如下:



[0009] 本发明的另一目的在于提供胶孢炭疽菌中分离的化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 胶孢炭疽菌的发酵

[0011] a. 菌株活化:取已冻存好的胶孢炭疽菌菌株,在超净工作台中接种至PDA固体培养基的平板上,28℃恒温培养箱中培养7天;

[0012] b. 接种及菌株的一级发酵:将活化的菌株接种至装有200mL PDB液体培养基的500ml锥形瓶中,共设12瓶,置于28℃恒温气浴旋转式摇床培养;

[0013] c. 菌株的大批量发酵:配制PDB液体培养基共计45L,进行灭菌,灭菌结束后冷却培养基至室温;另无菌水溶解青霉素、链霉素各一瓶,加入发酵罐中;再将菌株一级发酵培养物接入发酵罐中,保持28℃,控制通气量和保持发酵液循环,发酵21天,得菌液;

[0014] (2) 胶孢炭疽菌次级代谢物的提取

[0015] 发酵结束后将所得发酵产物抽滤,分别得到深褐色滤液和黑色菌丝体。发酵液50L用等体积的有机溶剂萃取三次,合并有机层,减压浓缩,得到菌液提取物;

[0016] (3) 菌液提取物次级代谢产物的分离

[0017] a. 将粗提物用HPD-100大孔树脂进行柱层析,配制乙醇体积含量分别为0%、10%、30%、50%、70%、90%、100%的乙醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,然后弃去水洗脱部分,TLC检测跟踪合并,得到6个组分,分别记为:Fr.1、Fr.2、Fr.3、Fr.4、Fr.5、Fr.6;

[0018] b. 取50g的MCI-gel湿法装柱,称取2g Fr.4样品湿法上样,配制甲醇与水体积比分别为0:100,20:80,40:60,60:40,80:20,100:0的甲醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,每个梯度用5L洗脱液洗脱,每250ml收集浓缩一次,TLC检测合并得到7个粗组分,分别记为:Fr.4-A、Fr.4-B、Fr.4-C、Fr.4-D、Fr.4-E、Fr.4-F、Fr.4-G;

[0019] c. 选取Fr.4-B进行硅胶柱层析,所述硅胶目数为200~300目,用石油醚-丙酮洗脱液进行洗脱,TLC点板合并,再用sephdex LH-20柱层析,然后用氯仿-甲醇洗脱液进行洗脱脱色,脱色后用高效液相色谱进行分离,收集tR=45min的峰得到胶孢炭疽菌素甲。

[0020] 进一步地,步骤(1)b中,所述恒温气浴旋转式摇床的转速为160r/min,培养时间为10天,发酵总体积为2.4L。

[0021] 进一步地,步骤(1)c中,所述灭菌是在蒸气发生装置上灭菌,灭菌温度为115-118℃,灭菌时间为2.5h。

[0022] 进一步地,步骤(1)c中,所述灭菌是在空气过滤器用灭菌锅中进行的,灭菌温度为121℃,灭菌时间为20min。

[0023] 进一步地,步骤(3)c中,所述石油醚-丙酮洗脱液中石油醚与丙酮的体积比为20:1,所述氯仿-甲醇洗脱液中氯仿与甲醇的体积比为1:1。

[0024] 进一步地,步骤(3)c中,所述高效液相色谱的流速为2ml/min,流动相为48%的甲醇,检测波长为210nm,色谱柱为Gemini-NX柱。

[0025] 本发明的又一目的在于提供胶孢炭疽菌中分离的化合物在制备抗老年痴呆药物方面的用途。

[0026] 本发明提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物,通过测定所述化合物的乙酰胆碱酯酶活性,得到所述化合物具有有效的抗乙酰胆碱酯酶活性,是良好的天然乙酰胆碱酯酶抑制剂;并使用所述化合物对东莨菪碱诱导的痴呆大鼠学习记忆能力的影响进行了进一步研究,结果显示所述化合物能明显改善痴呆大鼠的学习记忆能力。另外,所述化合物的制备方法简单,制备条件易控,可将所述化合物与药学上可以接受的载体或其它赋型型相结合,按照常规方法制成经口服给药的内用型、非口服给药的注射剂或其它剂型,在临床上用于老年痴呆症(阿尔兹海默症)的治疗。

### 附图说明

[0027] 图1是本发明实施例提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物胶孢炭疽菌素甲的结构式。

[0028] 图2是本发明实施例提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物胶孢炭疽菌素甲的IR光谱图。

[0029] 图3是本发明实施例提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物胶孢炭疽菌素甲的<sup>1</sup>H-NMR谱图。

[0030] 图4是本发明实施例提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物胶孢炭疽菌素甲的<sup>13</sup>C-NMR谱图。

[0031] 图5是本发明实施例提供的胶孢炭疽菌中分离的化合物胶孢炭疽菌素甲的DEPT谱图。

### 具体实施方式

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0034] 实施例1

[0035] 本发明的化合物的制备:

[0036] (1) 胶孢炭疽菌的发酵

[0037] a. 菌株活化:取已冻存好的胶孢炭疽菌菌株,在超净工作台中接种至PDA固体培养基的平板上,28℃恒温培养箱中培养7天;

[0038] b. 接种及菌株的一级发酵:将活化的菌株接种至装有200mL PDB液体培养基的500ml锥形瓶中,共设12瓶,置于28℃恒温气浴旋转式摇床培养,摇床转速为160r/min,培养时间为10天,发酵总体积为2.4L;

[0039] c. 菌株的大批量发酵:配制PDB液体培养基共计45L,在蒸气发生装置上进行灭菌,灭菌温度为115-118℃,灭菌时间为2.5h,灭菌结束后冷却培养基至室温;另无菌水溶解青

霉素、链霉素各一瓶,加入发酵罐中;再将菌株一级发酵培养物接入发酵罐中,保持28℃,控制通气量和保持发酵液循环,发酵21天,得菌液;

[0040] (2) 胶孢炭疽菌次级代谢物的提取

[0041] 发酵结束后将所得发酵产物抽滤,分别得到深褐色滤液和黑色菌丝体。发酵液50L用等体积的有机溶剂萃取三次,合并有机层,减压浓缩,得到菌液提取物;

[0042] (3) 菌液提取物次级代谢产物的分离

[0043] a. 将粗提物用HPD-100大孔树脂进行柱层析,配制乙醇体积含量分别为0%、10%、30%、50%、70%、90%、100%的乙醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,然后弃去水洗脱部分,TLC检测跟踪合并,得到6个组分,分别记为:Fr.1、Fr.2、Fr.3、Fr.4、Fr.5、Fr.6;

[0044] b. 取50g的MCI-gel湿法装柱,称取2g Fr.4样品湿法上样,配制甲醇与水体积比分别为0:100,20:80,40:60,60:40,80:20,100:0的甲醇-水洗脱液,依次进行梯度洗脱,每个梯度用5L洗脱液洗脱,每250ml收集浓缩一次,TLC检测合并得到7个粗组分,分别记为:Fr.4-A、Fr.4-B、Fr.4-C、Fr.4-D、Fr.4-E、Fr.4-F、Fr.4-G;

[0045] c. 选取Fr.4-B进行硅胶柱层析,所述硅胶目数为200~300目,用石油醚与丙酮的体积比为20:1的石油醚-丙酮洗脱液进行洗脱,TLC点板合并,再用sephdex LH-20柱层析,然后用氯仿与甲醇的体积比为1:1的氯仿-甲醇洗脱液进行洗脱脱色,脱色后用高效液相色谱进行分离,高效液相色谱的流速为2ml/min,流动相为48%的甲醇,检测波长为210nm,色谱柱为Gemini-NX柱,收集 $t_R = 45\text{min}$ 的峰得到胶孢炭疽菌素甲。

[0046] 实施例2

[0047] 本发明的化合物的结构式的确定和验证:

[0048] (1) 化合物的理化性质数据

[0049] 无色油状,旋光度:30;展开体系为石油醚:丙酮=2:1,硫酸乙醇显色为淡黄色斑点。

[0050] (2) 化合物分子式的确定

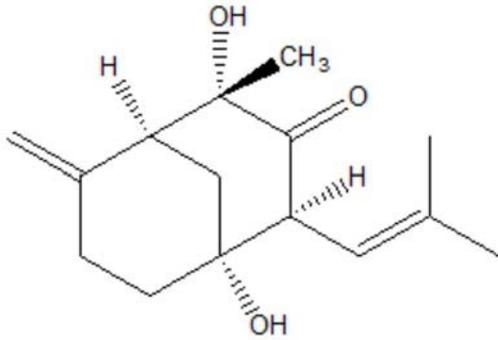
[0051] 结合 $^1\text{H-NMR}$ 以及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据及HRESIMS (实测值273.1466  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,计算 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Na}$ 值为273.1461),确定其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$ 。

[0052] (3) 化合物结构式的确定

[0053] 如图2所示,通过IR光谱数据显示化合物中含有羟基以及羰基( $\nu_{\text{max}} = 3406, 1724\text{cm}^{-1}$ )。 $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ 和DEPT谱图(如图3-图5所示)显示三个甲基,三个 $\text{sp}^3$ 亚甲基,一个 $\text{sp}^2$ 亚甲基,两个 $\text{sp}^3$ 次甲基,一个 $\text{sp}^2$ 次甲基,两个 $\text{sp}^3$ 季碳,两个 $\text{sp}^2$ 季碳和一个羰基碳的信号。

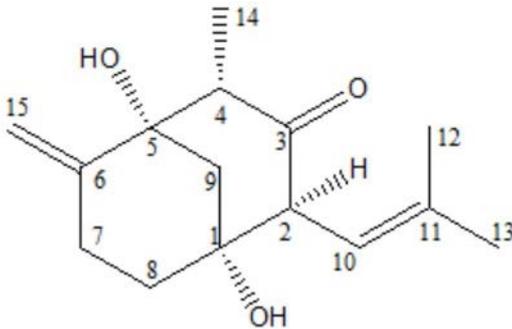
[0054] 现已知一化合物2(aspergiketone),其结构式如下:

[0055]



[0056] 本发明化合物记作化合物1,将化合物1与化合物2相比较,它们的 $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ 波谱极为相似,且两者具有相同分子式,表明化合物1和化合物2为异构体,通过2D-NMR ( $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ ,  $^1\text{H-QM C}$ ,  $^1\text{H-MBC}$ ) 的分析,进一步表明两者为异构体。在化合物1的 $^1\text{H-NMR}$ 谱中,H-5信号消失并出现四重H-4信号 (2.58 (q,  $J=6.6\text{Hz}$ )) 和双峰Me-14 (0.97 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ )) 信号,表明化合物1中的一个羟基在C-5处而不是在C-4处。化合物1与化合物2相比,C-5 ( $\delta\text{C}74.2$ ) 出现在较低场,进一步表明化合物1的C-5处有一个羟基相连。在化合物1的 $^1\text{H-MBC}$ 谱中,观察到H-15/C-5,H-14/C-5的 $^1\text{H-MBC}$ 相关峰,这进一步表明在C-5处有羟基连接。通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱确定了化合物1的相对构型, $^1\text{H-NMR}$ 谱 ( $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ ) 中5-OH/H-14,1-OH/H-14,1-OH/H-2的相关峰,表明5-OH,H-14,H-2和1-OH位于同侧。综上所述,可确定本发明化合物胶孢炭疽菌素甲的结构如下:

[0057]



[0058] 本发明化合物胶孢炭疽菌素甲 (记作化合物1) 及已知化合物2的 $^1\text{H-NMR}$ 数据见下表1、表2所示:

[0059] 表1化合物1与化合物2的 $^1\text{H-NMR}$ 数据

No.	1 in CDCl <sub>3</sub>	1 in CD <sub>3</sub> SOCD <sub>3</sub>	2 in CDCl <sub>3</sub>
2	3.39 (d, <i>J</i> = 9.8)	3.37 (d, <i>J</i> = 9.8)	3.93 (d, <i>J</i> = 9.9)
4	2.58 (q, <i>J</i> = 6.6)	2.50 (q, <i>J</i> = 6.6)	-
5	-	-	2.76 (Br s)
7a	2.27(dd, <i>J</i> =15.0, 5.7)	2.11 (dd, <i>J</i> = 15.7, 4.8)	2.15 (dd, <i>J</i> = 15.8, 5.8)
7b	1.62 (td, <i>J</i> =15.0 13.4, 5.9)	1.14 (m)	1.47 (td, <i>J</i> = 15.8, 5.9)
8a	1.85 (m)	1.76 (m)	1.86 (m)
8b	1.43 (m)	1.33 (m)	1.75 (m)
[0060] 9a	2.41 (d, <i>J</i> = 11.8)	2.26 (d, <i>J</i> = 11.8)	2.72 (dt, <i>J</i> = 12.3, 3.1)
9b	2.11 (d, <i>J</i> = 11.8)	1.85 (d, <i>J</i> = 11.8)	1.82 (dd, <i>J</i> = 12.3, 3.1)
10	5.27 (d, <i>J</i> =9.8)	5.06 (d, <i>J</i> = 9.3)	5.34 (d, <i>J</i> =10.0)
12	1.69 (S)	1.52 (S)	1.70 (S)
13	1.88 (S)	1.71 (S)	1.88 (S)
14	0.97 (d, <i>J</i> = 6.6)	0.73 (d, <i>J</i> = 6.6)	1.26 (S)
15a	4.92 (s)	4.58 (S)	4.77 (S)
15b	5.04 (S)	5.00(S)	4.82 (S)
5-OH	-	4.96 (S)	-
1-OH	-	4.75 (S)	-

[0061] 表2化合物1与化合物2的<sup>13</sup>CNMR数据

No.	1in CDCl <sub>3</sub>	2in CDCl <sub>3</sub>	No.	1in CDCl <sub>3</sub>	2in CDCl <sub>3</sub>
1	76.1	74.8	9	51.8	38.1
2	59.0	56.1	10	116.5	116.4
3	20.3	209.6	11	140.2	140.2
4	54.1	74.8	12	18.8	18.8
5	74.2	52.6	13	26.6	26.6
6	147.8	145.3	14	7.7	22.4
7	29.8	29.4	15	109.4	112.6
8	36.4	36.5			

[0063] 实施例3

[0064] 本发明化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性试验:

[0065] (1) 本发明的化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性测定

[0066] 采用改良的Ellman法测定化合物胶孢炭疽菌素甲的乙酰胆碱酯酶抑制活性,石杉碱甲作为阳性对照药,具体实施步骤如下:

[0067] 采用改进的Ellman法测定,操作步骤为:在96孔酶标板中依次加入140μL PBS (0.1M pH=8.0), 20μL样品溶液(终浓度为1mg/mL), 15μL AChE (0.28U/mL, pH=8.0PBS溶解稀释)。4℃孵育20min后,加10μL DTNB (0.075mol/L) 及10μL ATCI (0.01mol/L)。37℃孵育20min,用酶标仪在405nm下测定其吸光度值。其中,空白组用20μL PBS (pH 8.0) 代替20μL样品溶液;完全抑制组用20μL石杉碱甲 (0.125mg/mL) 代替20μL样品溶液。样品本底组用15μL PBS (pH=8.0) 代替15μL AChE (0.28U/mL, pH=8.0PBS溶解稀释)。所有样品平行做三次,取其平均值。

[0068] 测得吸光度值,通过以下公式计算其抗乙酰胆碱酯酶抑制率:

$$[0069] \quad \text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{空白孔} - \text{空白阴性孔}) - (\text{阳性孔} - \text{样品对照孔})}{(\text{空白孔} - \text{空白阴性孔})} \times 100\%$$

[0070] 通过量效关系和直线回归法可以计算出样品对酶的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 结果表明该化合物对乙酰胆碱酯酶具有较好的抑制活性, 并测定了该化合物的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 发现 IC<sub>50</sub> 较低, 说明具有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 实验数据见表3。

[0071] 表3化合物对乙酰胆碱抑制活性

[0072]	百分抑制率 (50 $\mu$ g/mL)	IC <sub>50</sub> (nM)
化合物胶孢炭疽菌素甲	73%	33.3 $\mu$ g/ml
石杉碱甲 (阳性药)	100%	75

[0073] (2) Morris水迷宫实验

[0074] 健康Wistar大鼠10只为空白对照组、东莨菪碱诱导认知障碍的动物模型50只, 随机分为模型组、阳性对照组 (石杉碱甲)、高剂量组、中剂量组及低剂量组, 每组各10只, 动物适应性喂养3d后给药。本发明化合物胶孢炭疽菌素甲, 石杉碱甲, 以生理盐水调配后灌胃给药, 给药剂量: 高剂量5mg/kg, 中剂量2.5mg/kg, 低剂量1.25mg/kg; 阳性对照药石杉碱甲0.15mg/kg, 参照临床成人用量: 每天0.3mg/kg; 空白对照组给与等容积的生理盐水, 均灌胃给药 (ig), 给药容量均为10mL/kg, 每天给药1次, 连续给药2周后, 进行水迷宫检测, 除空白对照组用等体积的生理盐水灌胃, 其他各组均在训练前灌胃给药东莨菪碱2mg/kg。

[0075] 采用MWM测试法, 进行定位航行实验和空间探索实验。水迷宫置于房间中间, 为一圆形水池, 直径200cm, 高100cm, 水深30cm, 水温保持在25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C。根据东 (E)、南 (S)、西 (S)、北 (N) 方位将水池等分为东北 (EN, 象限1)、西北 (WN, 象限2)、东南 (ES, 象限3)、西南 (WS, 象限4) 四个象限。在EN象限 (象限1) 中心放置一平台, 平台为圆形, 直径10cm, 平台高29cm, 即平台低于水面1cm, 称隐藏平台。迷宫正上方高处装有一个小型摄像机和一条电管, 并与录像机和监视器连接, 记录大鼠的游泳轨迹和游泳时间。迷宫水池里倒入适量SiO<sub>2</sub>, 使池里水能被均匀染白。水池由一可密闭的布袋密闭, 测试程序如下:

[0076] ①定位航行实验 (place navigation): 共进行5天。MWM实验的第1天至第6天, 进行定位航行试验。平台位于第1象限, 没于水下1cm, 大鼠入水点为各象限池壁中点, 每天分上下午两个时间段, 每一个时间段每鼠训练次, 将大鼠面向池壁由个入水点放入次池中, 测其120s内成功进驻平台所需时间 (即逃避潜伏期, escape latency), 如在120s内大鼠不能成功进驻平台, 则实验者将其引上平台并令其停留10s, 记录逃避潜伏期为120s。

[0077] ②空间搜索实验: 最后一天, 撤去平台, 让大鼠自由游泳, 测其寻求次数, 实验结果见表4。

[0078] 表4各组MWM行为学相关参数5天均值总体比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

[0079]	组别	动物数 (只)	潜伏期 (s)	寻找次数
	空白对照组	10	27.57 $\pm$ 17.53**	14.85 $\pm$ 4.035**
	模型组	10	40.34 $\pm$ 19.85	9.22 $\pm$ 3.158
	阳性对照组	10	29.19 $\pm$ 18.56**	13.73 $\pm$ 3.863**
	高剂量组	10	33.25 $\pm$ 17.12*	11.86 $\pm$ 4.175*
	中剂量组	10	35.48 $\pm$ 15.32*	10.31 $\pm$ 4.391*

低剂量组	10	37.61±12.75	9.54±3.812
------	----	-------------	------------

[0080] 注:与模型组相比,\*P<0.05,\*\*P<0.01。

[0081] 实验结果表明:与模型组比较,化合物高、中剂量组的潜伏期明显低于模型组,寻找次数均高于模型组,且跟模型组比均由显著性差异。说明本发明化合物胶孢炭疽菌素甲对痴呆大鼠的学习记忆能力起到了明显改善作用,具有抗痴呆作用。因而可将所述化合物与药学上可以接受的载体或其它赋型型相结合,按照常规方法制成经口服给药的内用型、非口服给药的注射剂或其它剂型,在临床上用于老年痴呆症(阿尔恣海默症)的治疗。

[0082] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

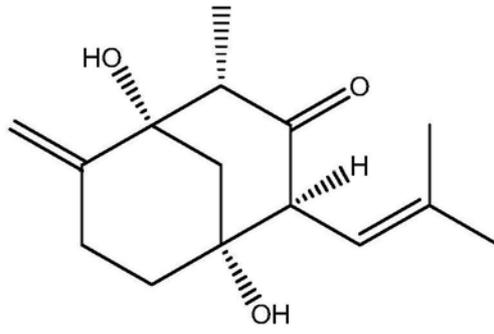


图1

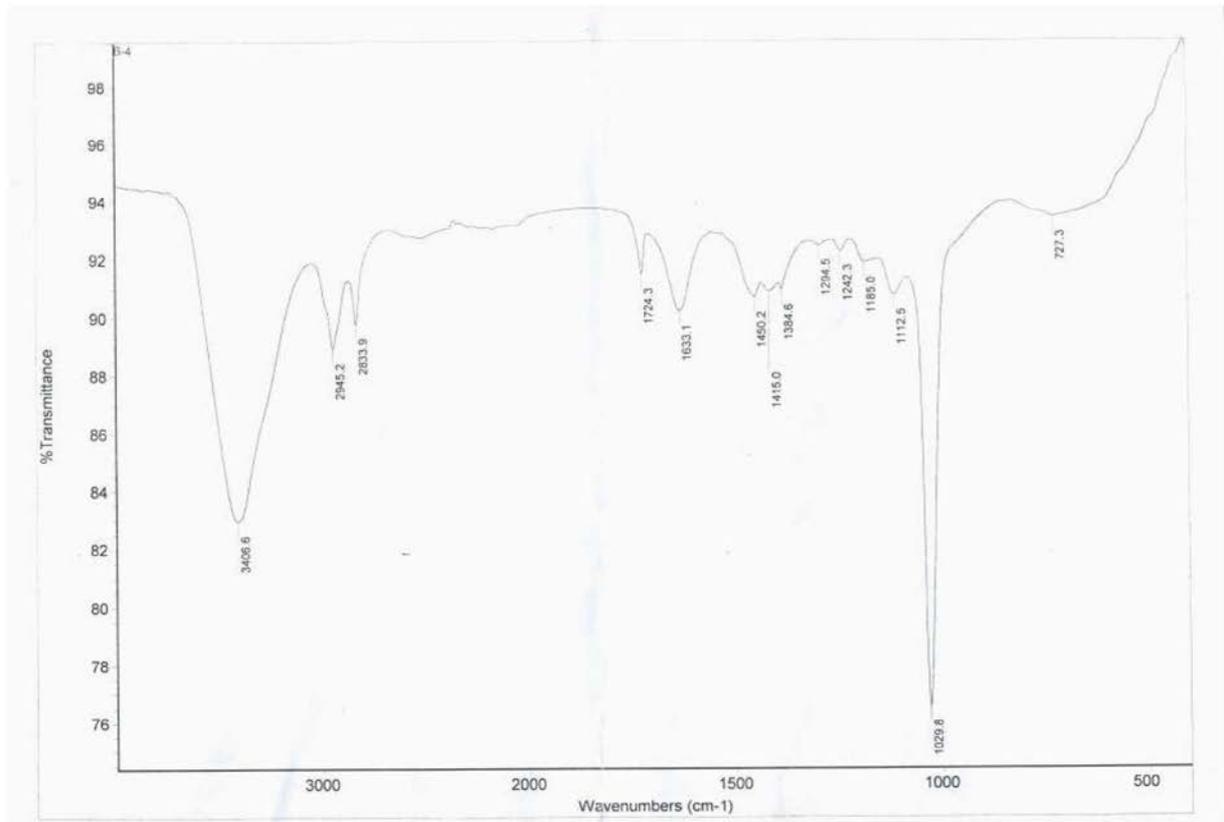


图2

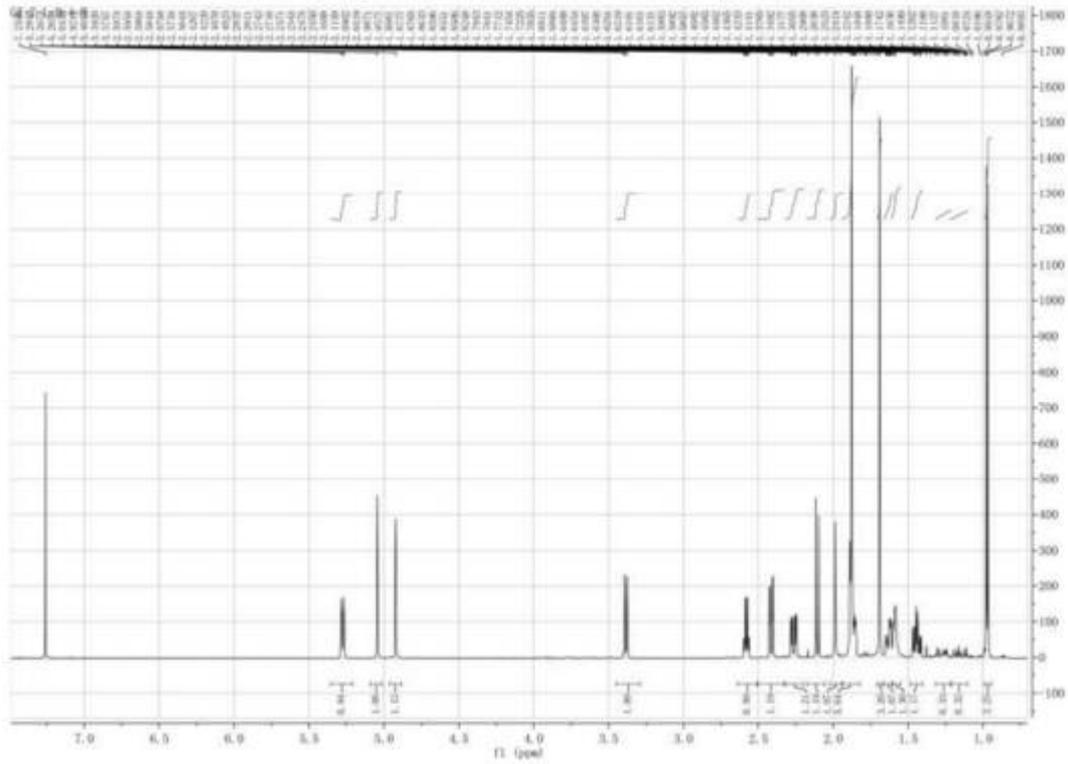


图3

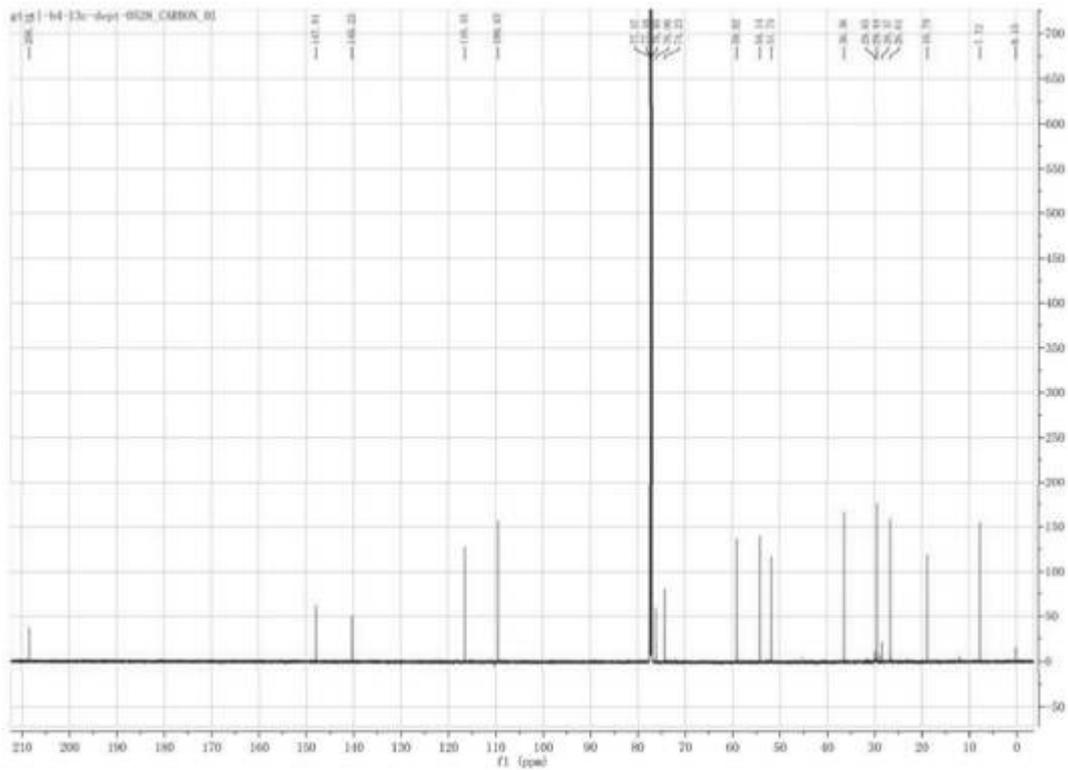


图4

