



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104056281 B

(45)授权公告日 2018.09.25

(21)申请号 201310090164.3

(22)申请日 2013.03.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104056281 A

(43)申请公布日 2014.09.24

(73)专利权人 中国医学科学院药用植物研究所

地址 100193 北京市海淀区马连洼北路151号

(72)发明人 邹忠梅 贾红梅 苏志恒 刘月涛

丁刚 张宏武 常星

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101736406 A,2010.06.16,

芦林林.基于代谢组学技术逍遥散抗抑郁有

效部位验证及机理研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2012,(第10期),

戴伟东等.基于液相色谱-质谱联用技术的代谢_省略_人参对过度疲劳大鼠干预作用的评价.《色谱》.2011,第29卷(第11期),

Zhi-Heng Su et al..Urinary metabonomics study of anti-depressive effect of Chaihu-Shu-Gan-San on an experimental model of depression induced by chronic variable stress in rats.《Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis》.2011,第55卷

审查员 张丽芳

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法及其用途

(57)摘要

本发明涉及从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,提供了一种基于代谢组学和中药化学成分分析技术从中药或天然药物复杂体系筛选活性成分的方法,其特征是:建立相关疾病的动物模型并给予中药或天然药物复方的有效部位或其加/减味方进行干预治疗;针对药物干预治疗的动物体液或组织进行代谢组学研究,获得各药物治疗组的疗效差异信息;应用多元统计分析方法寻找并鉴定差异化学成分,进而获得中药或天然药物复方中具有活性作用的先导化合物或化合物群。本发明的筛选活性成分的方法合理、可行。本发明可以作为从中药或天然药物复杂体系中开发新药的方法,亦可以作为中药或天然药物复方药物质量控制的补充手段。

1. 一种从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 中药或天然药物复方及其有效部位或相关加/减方的提取制备;

(2) 将步骤(1)中的中药或天然药物复方及有效部位或相关加/减方针对临床各种疾病或动物疾病模型进行干预治疗,收集生物样本进行代谢组学研究:

基于代谢组学方法采用¹H NMR和/或LC-MS检测手段分析各组动物生物样本,进行代谢轮廓比较分析;

(3) 针对步骤(2)中的生物样本进行多元统计分析,鉴定不同药物参与调控的差异代谢产物及代谢通路信息:

寻找并鉴定各组动物生物样本间的差异内源性标志物及代谢通路;联合应用多元统计分析方法,通过正交偏最小二乘法寻找并鉴定中药或天然药物复方有效部位及相关方的内源性差异标志物及差异标志物涉及的代谢通路;

(4) 建立步骤(1)中药物的化学成分分析方法,结合步骤(3)得到的参与调控的差异代谢产物及代谢通路信息,应用多元统计分析寻找并鉴定不同药物间的差异化学成分;

(5) 对步骤(4)中寻找到的差异化学成分进行药效活性评价。

2. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于,所述中药或天然药物复方的相关加/减方是在中药或天然药物复方基础上加上或减去一种组成药材。

3. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于,所述中药或天然药物复方的有效部位是指按照化合物种类区分的化合物群或者是按照极性大小将天然药物提取物进行分离而成的有效部位。

4. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于该筛选方法得到的活性成分能够应用于保健食品和功能食品的制备。

5. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于该筛选方法从中药或天然药物复杂体系中寻找具备活性先导化合物或化合物群。

6. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于该筛选方法从中药或天然药物复杂体系中寻找具备活性先导化合物或化合物群,能够作为中药或天然药物复方药物质量控制的指标性化合物。

7. 根据权利要求1所述的从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法,其特征在于该方法适用于中药或天然药物复方的药效物质基础及作用机制研究。

一种从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中药和天然药物复杂体系中筛选活性成分的方法及其用途,具体涉及中药活性成分筛选及作用机理研究领域,尤其涉及中药或天然药物复方活性成分的筛选方法及应用。

背景技术

[0002] 中药或天然药物复方是中医临床用药的主要形式,具备长期民间应用基础,是新药研发主要来源。现代医学研究表明由于中药或天然药物复方成分复杂、多样,它们是以多途径、多靶点、多受体形式发挥治疗作用。目前,从中药或天然药物复方筛选活性成分的方法主要是提取分离法^[1],它与药理学相结合,为活性成分的发现与分离作出积极贡献;近年,分离技术的发展与应用,大大加快药物活性成分的筛选速度,发现了一大批活性成分。但值得关注的是,天然药物分离技术忽略了中药或天然药物中多组分共存,在药物提取过程中相互作用的特点。所以,在未考虑整个复杂体系中多种化学成分相互作用关系的前提下,传统的溶剂提取法易于将多数的活性成分在分离过程中丢失。另外,由于不能够及时地进行活性跟踪,花费大量时间分离得到的化学成分往往没有活性,造成了大量人力、物力及资源的浪费。

[0003] 中药复方是在中医药理论指导下,根据经典的“君臣佐使”配伍规律而组成。中药复方活性成分研究有助于阐明中药复方配伍的组成原理及作用机制,为临床用药提供科学依据,也为创新中药奠定理论基础。中药复方作为一个复杂的科学系统,通过多成分、多靶点协同发挥作用,其主要药效物质是中药活性成分的组合。任何中药(单味或复方)的任何一种生物效应,均来自该中药的一种特定中药分子组合(包括种类与数量),但其活性成分组合的总体效应不能用每一成分单独作用结果的线性叠加来表示。拆方研究是中药复方配伍规律的重要手段之一,采取整体药理试验,并以药效学指标为依据对中药复方进行拆分研究。但上述研究均是以动物生理机能改变、生化指标变化或组织形态学变化等作为观测其药理作用和探讨其作用机理的指标。这些指标无法体现复方成分的加减或剂量改变对药效的影响,难以阐明复方组成药材或单一成分在复方中的贡献。

[0004] 代谢组学^[2]作为一门新兴的系统生物学技术,主要用于研究生物体受到外界环境、疾病、药物等干预后其代谢产物种类和数量的变化及变化规律。代谢组学能够描述病症的整个代谢过程所产生内源性代谢产物的动态变化,能忠实反映外界干预对机体代谢网络调控过程的微观变化,其研究思路与中医学整体观及辩证论治等思维方式基本吻合。近年来代谢组学在中医药领域的研究方兴未艾,主要包括中医症候诊断、中药质量标准化、中药作用机制和中药安全性评价等方面。研究表明,中药尤其是复方药物起效是通过多种成分作用于多个靶点、涉及多基因和多生化通路来实现的,对机体代谢网络进行整体调节,因此代谢组学这一技术适用于中医药研究。

[0005] 基于液质联用技术的中药或天然药物复方化学成分定性、定量分析方法,被广泛

应用于物质基础研究并作为评价中药质量标准的有效工具,但无法提供中药或天然药物复方的药效学信息,无法使复方化学成分研究与药效学研究进行有机结合。

[0006] 综上所述,如何将复方中各化学成分与药效学有机结合且不破坏复方整体用药的特点,是从中药或天然药物复方中活性成分筛选方法亟待解决的问题。

发明内容

[0007] 本发明提供一种在中医药理论指导下从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分的新方法,其主要特点是最大程度保存中药或天然药物复方用药的整体性,兼顾中药复杂体系化学成分相互作用的影响,联合应用代谢组学及中药化学分析手段筛选有效活性成分并对其作用机制进行阐述,目标性地从中药或天然药物复杂体系中寻找具备活性先导化合物或化合物群。

[0008] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0009] (1) 制备中药或天然药物复方各有效部位或其相关方

[0010] 本发明的研究对象中药复方相关方的选择,以该中药复方药物为基础方,相关方为在基础方的基础上减去一种组成药材或加上一种药材。

[0011] 本发明的研究对象中药或天然药物复方各有效部位指的是按照化合物种类区分的化合物部位或者是按照极性大小将天然药物提取物分离而成的有效部位。

[0012] (2) 建立动物疾病模型并且给予步骤(1)中的提取物进行干预治疗

[0013] (3) 基于代谢组学方法采用 ^1H NMR和/或LC-MS检测手段分析步骤(2)中的各组动物生物样本进行代谢轮廓比较分析

[0014] 建立 ^1H NMR和/或LC-MS方法,针对动物模型的体液(包括血浆或血清、尿液、组织)进行分析检测,得到不同药物干预组动物体内代谢轮廓信息

[0015] (4) 寻找并鉴定步骤(3)中的各组动物生物样本间的差异内源性标志物及代谢通路

[0016] 联合应用多元统计分析方法,通过正交偏最小二乘法(OPLS-DA)寻找并鉴定中药或天然药物复方有效部位及相关方的内源性差异标志物及差异标志物涉及的代谢通路

[0017] (5) 建立步骤(1)中中药或天然药物复方的化学成分分析方法,应用多元统计分析技术快速查找步骤(1)中各提取物鉴定差异化学成分

[0018] 建立UPLC-Q-TOF/MS中药复方及相关方的在线检测方法,运用多元统计分析方法比较分析中药复方及其相关方的化学成分轮廓色谱差异信息,根据质谱碎片信息,推测并鉴定天然药物各有效部位或复方相关方与中药或天然药物复方原方的差异化学成分信息

[0019] (6) 生物活性验证

[0020] 将步骤(5)中筛选得到的化学成分进行体外酶活性实验及动物体内在体实验,验证上述方法筛选得到化学成分的生物活性

[0021] 本发明能够从中药或天然药物复杂体系中寻找可能具有活性作用的先导化合物或化合物群,并且能够解释相关活性成分的起效机制,符合中医药理论观点。实验后期的活性评估实验对该方法筛选出来的活性成分进行药效学验证,充分论证本发明的合理性。本发明为中药活性成分筛选、中药或天然药物复方现代化提供了新思路。

附图说明

- [0022] 图1从中药或天然药物复杂体系中筛选活性成分流程图
- [0023] 图2柴胡疏肝散及去枳壳方给药组大鼠尿液样本主成分分析得分图
- [0024] 图3-1正离子模式下柴胡疏肝散及去枳壳方给药组大鼠尿液样本数据正交偏最小二乘法分析得分图及载荷图
- [0025] 图3-2负离子模式下柴胡舒肝散及去枳壳方给药组大鼠尿液样本数据正交偏最小二乘法分析得分图及载荷图
- [0026] 图4负离子模式下柴胡疏肝散全方与去枳壳方间的差异化合物
- [0027] 图5枳壳总提物、总生物碱部位给药大鼠尿液样本正离子模式下主成分分析得分图
- [0028] 图6负离子模式下枳壳总提取物与枳壳总生物碱部位间的差异化合物

具体实施方式

- [0029] 下面结合实施例,对本发明做进一步的说明,但本发明并不受限于下述实施例。
- [0030] 实施例1.从中药复方中筛选活性成分
- [0031] 提取实施例
- [0032] 提取实施例1.中药复方(柴胡疏肝散)样品制备
- [0033] 1.柴胡疏肝散全方组成药材及其剂量:柴胡6克,陈皮(醋炒)6克,川芎4.5克,枳壳(麸炒)4.5克,芍药4.5克,香附4.5克,甘草(炙)1.5克
- [0034] 2.制备方法:将上述各药材混合,粉碎成粗粉,加水1:10浸泡30分钟,煎煮1小时,趁热过滤,残渣再次煎煮1小时,合并滤液,60℃减压浓缩,冷冻干燥,得到柴胡疏肝散提取物(CSGS)。
- [0035] 提取实施例2.复方减味方(减枳壳方)样品制备
- [0036] 1.减枳壳方组成药材及其剂量:柴胡6克,陈皮(醋炒)6克,川芎4.5克,芍药4.5克,香附4.5克,甘草(炙)1.5克
- [0037] 2.制备方法:将上述总量配比的药材,按照提取实施例1方法制备,得到柴胡疏肝散减枳壳方提取物(QZ)。
- [0038] 药理实验例
- [0039] 1.大鼠慢性不可预见性应激模型复制及给药治疗
- [0040] (1)实验动物及分组
- [0041] Wistar大鼠,雄性,体重180~220g,购自维通利华实验动物有限公司,许可证:SCXK(京)2002-2003。
- [0042] 动物共分为4组,每组8只:空白对照组(Control group):不给予刺激,给予生理盐水;病理模型组(CUMS group):给予刺激同时给予生理盐水;柴胡疏肝散给药组(CSGS group):给予刺激同时给予按照提取实施例1配方比例制备药粉作为给药样品配制而成的药液(给药剂量7.2g生药量/Kg);减味方给药组(QZ group):给予刺激同时给予按照提取实施例2配方比例制备药粉作为给药样品配制而成的药液(给药剂量6.7g生药量/Kg)。
- [0043] (2)大鼠慢性应激抑郁模型的复制

[0044] 连续28天每天随机给予1或2种以下刺激:束缚5小时;冷水游泳(15℃,5min);热水游泳(45℃,5min);禁食(48h);禁水(48h);足底电击(1mA,持续2s,间隔30s,30次);噪声(110dB,1h);频闪(2闪/s,4h)。

[0045] 2.大鼠行为学评价

[0046] 针对大鼠糖水偏嗜度变化进行了药效学评价。实验结果表明,动物模型组的糖水偏嗜度产生了显著下降,慢性不可预见性应激模型造模成功。柴胡疏肝散组及其减味方组对模型大鼠糖水偏嗜度变化具有不同程度的治疗效果。

[0047] 表1.慢性应激前后各组大鼠的糖水偏嗜度变化情况

分组	糖水消耗量 (g)	
	第0周	第4周
正常组	17.2	17.1
模型组	16.7	8.4**
柴胡疏肝散组	16.5	17.3*
去枳壳组	17.6	21.7**

[0049] 3.代谢组学方法分析各组动物代谢轮廓信息

[0050] (1)尿液的处理:

[0051] 收集的尿液先经离心处理(5000rpm),取上清液,用蒸馏水稀释一倍后,置-80℃冰箱中保存,测试前以0.22μm微孔滤膜过滤。

[0052] (2)数据的提取方法:

[0053] 采用UPLC-Q-TOF/MS系统操作软件MassLynx V4.1中的MarkerLynx (MassLynx SCN633)软件包,该软件包能够自动完成谱峰识别、滤噪等前处理程序,最后输出三维矩阵,即由保留时间和精确质核比组成的谱峰索引(变量)、样本名称和峰强度/面积。

[0054] (3)数据的多元统计分析:

[0055] 多元统计分析采用SIMCA-P软件(Umetrics AB,Sweden,12.0version),首先进行主成分分析(PCA)对数据进行模式识别,考察各组数据轮廓的分离模式,评价所建立模型的解释能力和预测能力。同时,在主成分分析的基础上,利用正交偏最小二乘-判别分析法(OPLS-DA)进行分析,通过载荷图的加载分析和变量重要性分析(VIP)从建立的PLS-DA模型中找到造成两组之间差异的变量。差异变量的显著性分析使用双侧t检验的方法进行。

[0056] (4)各组大鼠尿液样本代谢轮廓信息

[0057] 应用多元统计分析方法,对正离子模式下采集的各组大鼠尿液样本(图1)进行无监督的主成分分析(PCA),观察各组的代谢轮廓变化趋势(图2),经过28天的造模,病理模型组的代谢轮廓与对照组相比在主成分1方向上产生了明显的分离,表明病理模型组大鼠的代谢轮廓发生了显著的变化。柴胡疏肝散给药组及减枳壳组均对慢性应激模型具有改善治

疗作用,但是柴胡疏肝散治疗组及减枳壳组在治疗效果上有一定差异。

[0058] 应用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对数据进行多元统计分析(图3-1)。通过载荷图(图3-2)对变量加载的结果进行描述,结合变量重要性(VIP)分析,从对照组与模型组中找到含量变化差异显著的变量,这些变量所涉及到的代谢通路有可能导致慢性应激模型的形成。组间差异代谢产物的信息及在各组含量变化趋势见表2。这些代谢产物相关的代谢通路根据代谢通路数据库KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)所提供的信息进行了归属。

[0059] 表2 柴胡舒肝散与去枳壳方参与调节的差异代谢产物及代谢通路信息

	代谢物	各组调控趋势			代谢途径
		模型组	柴胡疏肝散全方组	去枳壳组	
[0060]	1 甘油酸 1,3-二磷酸 ^a	↓**	↑**	—	糖酵解途径
	2 多巴胺 ^a	↑**	↓**	↓**	酪氨酸代谢
	4 肌氨酸 ^a	↓**	↑**	↑**	甘氨酸和丝氨酸代谢
	5 犬尿氨酸 ^a	↓**	↑**	—	色氨酸代谢
	6 2-氨基粘康酸半醛	↓**	↑**	—	色氨酸代谢

[0061] a正离子模式下检测得到的潜在生物标志物;b负离子模式下检测得到的潜在生物标志物

[0062] 5. 复方化学成分分析及差异化合物寻找并鉴定

[0063] 应用UPLC-Q-TOF/MS建立复方柴胡疏肝散化学成分分析方法,同时应用相同检测条件针对复方柴胡疏肝散和减枳壳方进行了检测(图4)。应用多元统计分析方法,建立正交偏最小二乘分析模型,寻找并鉴定两种组方间的差异化学成分。

[0064] 在负离子扫描模式下,通过高分辨结合多级裂解的方式,通过与标准品比对或初步鉴定了2个差异化学成分,它们分别是:辛弗林(Synephrine)和柚皮苷(Naringin)来自柴胡疏肝散组成药材之一的枳壳。结合代谢组学研究结果,上述2个化学成分即为枳壳入药的主要活性成分,具有潜在的抗抑郁活性。

[0065] 6. 生物活性验证

[0066] (1) 单胺氧化酶A(MAO-A)抑制实验

[0067] 本研究以单胺氧化酶活性抑制来验证筛选出化合物的潜在抗抑郁活性。实验原理是以苯胺为底物,在MAO作用下氧化生成苯醛,以环己烷抽提产物,在242nm波长处测定吸光度,可以测算出酶的活性。实验结果表明,筛选得到的活性化合物辛弗林和柚皮苷对大鼠肝组织中的MAO-A活性抑制作用与阳性药吗氯贝胺相近,具有抗抑郁作用(表3)。

[0068] $\text{MAO-A活性抑制率} = (\text{对照组吸光度} - \text{测试组吸光度}) / \text{对照组吸光度} \times 100\%$

[0069] 表3. 各单体化合物对MAO-A的抑制活性

	化合物	IC ₅₀ (μM)
[0070]	1 辛弗林	10.67
	2 柚皮苷	6.96
	阳性对照药 吗氯贝胺	5.25

[0071] (2) 筛选得到的活性成分对小鼠悬尾应激不动时间的影响

[0072] 悬尾箱为30×30×30cm,顶部中心设置一个小夹子,将胶布粘在小鼠尾端2cm处,用夹子夹住胶布,使小鼠呈倒悬姿势,头部离箱底约10cm,观察6分钟,记录后4分钟的累计不动时间。判断标准为动物静止不同、不挣扎。结果进行统计学处理。小鼠连续7天给予上述2个单体化合物,药效行为学评价结果见表4。

[0073] 表4. 小鼠悬尾应激不动时间列表

	正常组	辛弗林	柚皮苷
[0074] 不动时间 (s)	80.1±9.4	43.2±5.2**	49.6±6.8**

[0075] 结果显示本发明中所筛选出来的单体化合物辛弗林和柚皮苷能够显著的缩短小鼠悬尾不动时间,具有抗抑郁活性。

[0076] 实施例2. 从中药或天然药物中筛选活性成分

[0077] 提取实施例

[0078] 提取实施例1. 枳壳总提取物制备

[0079] 制备方法:将枳壳药材,粉碎成粗粉,用70%乙醇水溶液加热回流1小时,趁热过滤,残渣再次回流1小时,合并滤液,60℃减压浓缩,冷冻干燥,得到枳壳提取物(Zhi-Qiao)。

[0080] 提取实施例2. 枳壳总生物碱类样品制备

[0081] 制备方法:将枳壳药材,粉碎成粗粉,9倍量水浸泡1小时,煎煮1小时,趁热过滤,滤液中加入2-5倍量一定浓度的乙醇进行醇沉,放置24小时,离心分离过滤,60℃减压浓缩,冷冻干燥,得到枳壳总生物碱类样品(Zhi-A)。

[0082] 药理实验例

[0083] 1. 大鼠慢性不可预见性应激模型复制和给药治疗

[0084] (1) 实验动物及分组

[0085] Wistar雄性大鼠,体重180~220g,购自维通利华实验动物有限公司,许可证:SCXK(京)2002-2003。

[0086] 动物共分为4组,每组8只:空白对照组(Control group):不给予刺激,给予生理盐水;病理模型组(CUMS group):给予刺激同时给予生理盐水;枳壳总提取物给药组(Zhi-Qiao group):给予刺激同时给予按照提取实施例1制备药粉作为给药样品配制而成的药液;枳壳总生物碱给药组(Zhi-A group):给予刺激同时给予按照提取实施例2制备药粉作为给药样品配制而成的药液。

[0087] (2) 大鼠慢性应激抑郁模型的复制

[0088] 具体操作同实施例1中的药理实施例

[0089] 3. 大鼠行为学评价

[0090] 参照实施例1中的药理实施例。

[0091] 实验结果表明,动物模型组的糖水偏嗜度产生了显著下降,慢性不可预见性应激模型造模成功。枳壳总提物及枳壳总生物碱给药组对模型大鼠糖水偏嗜度变化具有不同程度的治疗效果。

[0092] 表5.慢性应激前后各组大鼠的糖水偏嗜度变化情况

分组	糖水消耗量 (g)	
	第 0 周	第 4 周
正常组	16.1	17.1
模型组	17.1	7.3**
枳壳组	16.7	15.3**
枳壳生物碱部位	17.2	16.3**

[0093]

[0094] 4.代谢组学方法分析各组动物代谢轮廓变化信息

[0095] (1)尿液的处理:

[0096] 具体操作同实施例1中的药理实施例

[0097] (2)数据的提取方法:

[0098] 具体操作同实施例1中的药理实施例

[0099] (3)数据的多元统计分析:

[0100] 具体操作同实施例1中的药理实施例

[0101] (4)各组大鼠尿液样本代谢轮廓信息

[0102] 具体操作同实施例1中的药理实施例。

[0103] 观察各组的代谢轮廓经过28天的造模及给药治疗后的变化趋势(图5),枳壳提取物和总生物碱均对慢性应激模型具有改善作用,但是枳壳总生物碱给药组与枳壳总提取物组在治疗效果上有一定的差异。组间差异代谢产物的信息及在各组含量变化趋势见表6。

[0104] 表6 枳壳总提物与总生物碱给药治疗组参与调控的差异生物标志物及差异代谢通路信息

	代谢产物	变化趋势			代谢通路
		模型组	枳壳组	枳壳生物碱部位	
1	苯基丙氨酸	↓**	↑**	—	苯丙氨酸和酪氨酸代谢
2	3-甲氧基多巴	↑**	↓**	—	色氨酸代谢
4	肌氨酸	↓**	↑**	—	甘氨酸和丝氨酸代谢
5	犬尿氨酸	↓**	↑**	↑**	色氨酸代谢
8	脯氨酸	↓**	↑**	↑**	精氨酸和脯氨酸代谢

[0105]

[0106] 5.中药化学成分分析及差异化合物寻找并鉴定

[0107] 具体操作同实施例1中药理实施例

[0108] 在相同检测条件下针对枳壳总提物、枳壳生物碱类化合物进行了检测。应用多元统计分析方法,建立正交偏最小二乘分析模型,寻找并鉴定两种组方间的差异化学成分(图6)。

[0109] 在负离子扫描模式下,通过高分辨结合多级裂解的方式,通过与标准品比对或初步鉴定了差异化学成分的结构信息。枳壳总生物碱部位与总提物的主要差异化合物为:柚皮芸香苷(Narirutin)和柚皮苷(Naringin)。结合代谢组学研究结果,上述2个化学成分为枳壳总提物中的主要活性成分,具有潜在的抗抑郁活性。

[0110] 6.生物活性验证

[0111] (1)单胺氧化酶A(MAO-A)抑制实验

[0112] 具体操作同实施例1中药理实施例

[0113] 实验结果表明,筛选得到的活性化合物柚皮芸香苷和柚皮苷对大鼠肝组织中的MAO-A活性抑制作用与阳性药吗氯贝胺(IC₅₀,5.25μM)相近,具有抗抑郁活性(表7)。

[0114] 表7.各单体化合物对MAO-A的抑制活性

	化合物	IC ₅₀ (μM)
[0115]	1 柚皮芸香苷	14.67
	2 柚皮苷	6.96

[0116] (2)筛选活性成分对小鼠急性应激悬尾不动时间的影响

[0117] 具体操作同实施例1中药理实施例

[0118] 小鼠连续7天给予上述2个单体化合物,药效行为学评价结果见表8。

[0119] 表8.小鼠悬尾应激不动时间列表

		不动时间 (s)
	正常组	90.3±9.1
[0120]	1 柚皮芸香苷	63.1±3.1 *
	2 柚皮苷	46.6±7.3 **

[0121] 结果显示本发明中所筛选出来的单体化合物中柚皮芸香苷和柚皮苷能够显著地缩短小鼠悬尾不动时间,且与实施例结果相吻合,具有抗抑郁活性。

[0122] 总之,本发明的筛选活性成分具有抗抑郁活性作用,因此,本发明从天然药物或中药复方中筛选活性成分的方法是科学的,可行的。

[0123] 参考文献

[0124] 【1】刘福强,张恒弼,张白晶.目前中药复方现代化研究的几种取向[J]药学实践杂志,2005,23(6):333-336.

[0125] 【2】Nicholson JK,Lindon JC,Holmes E.Metabonomics:understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.[J]

Xenobiotica,1999,29(11):1181-1189.

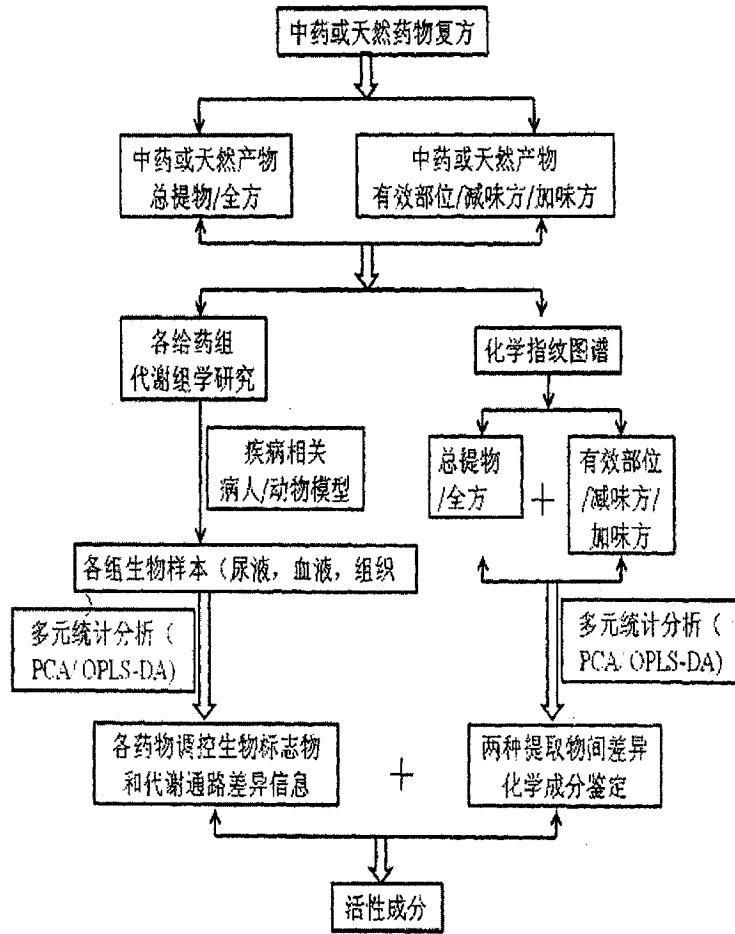


图1

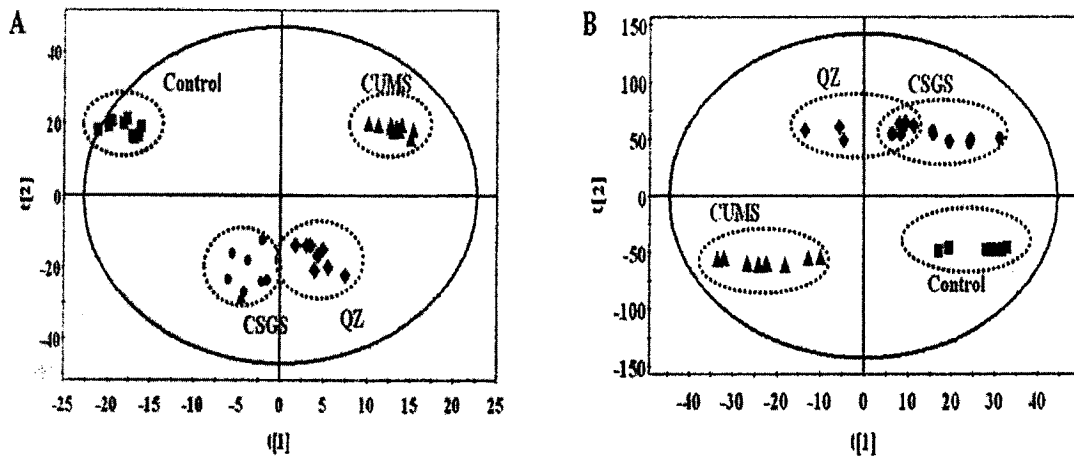


图2

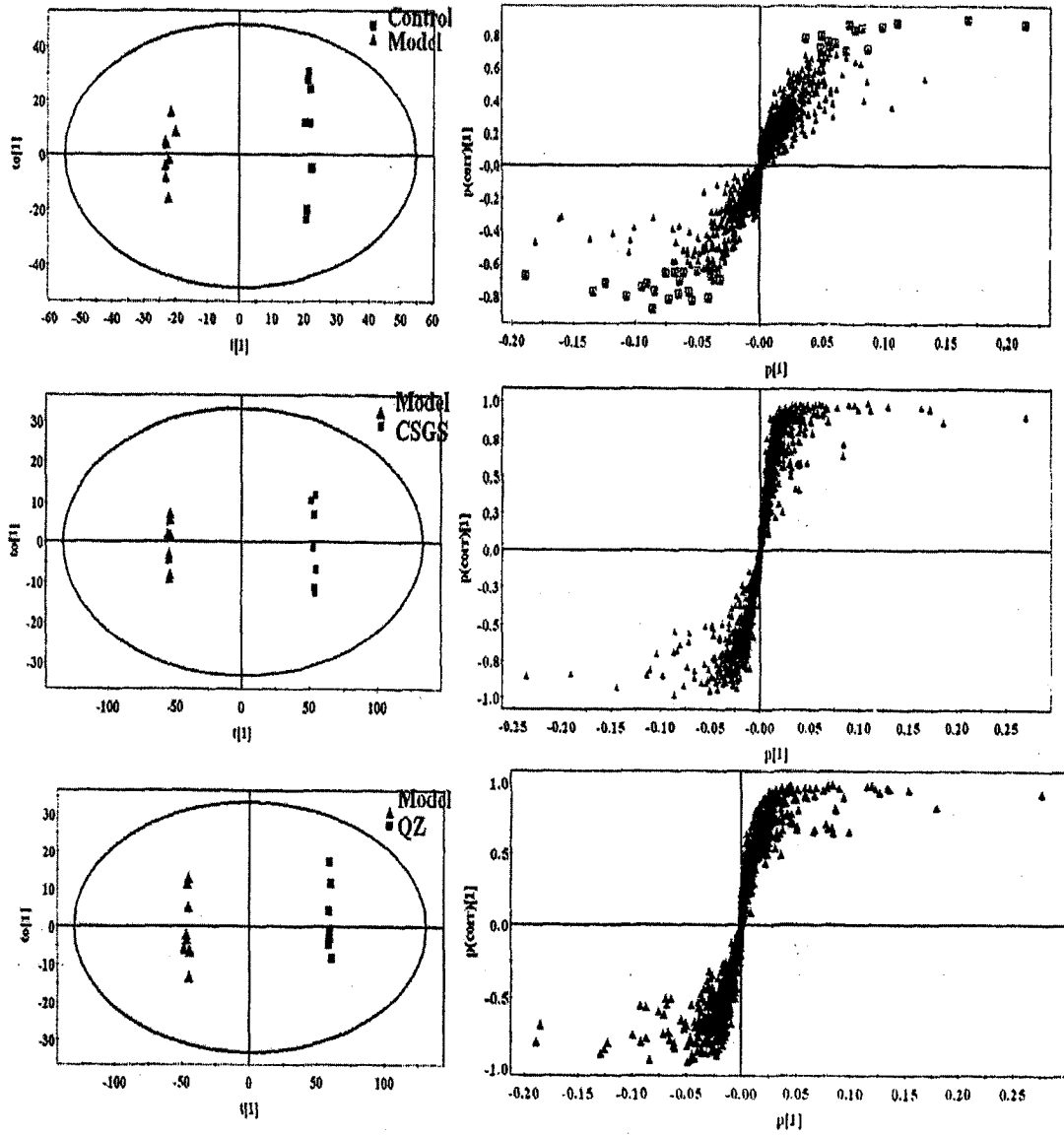


图3-1

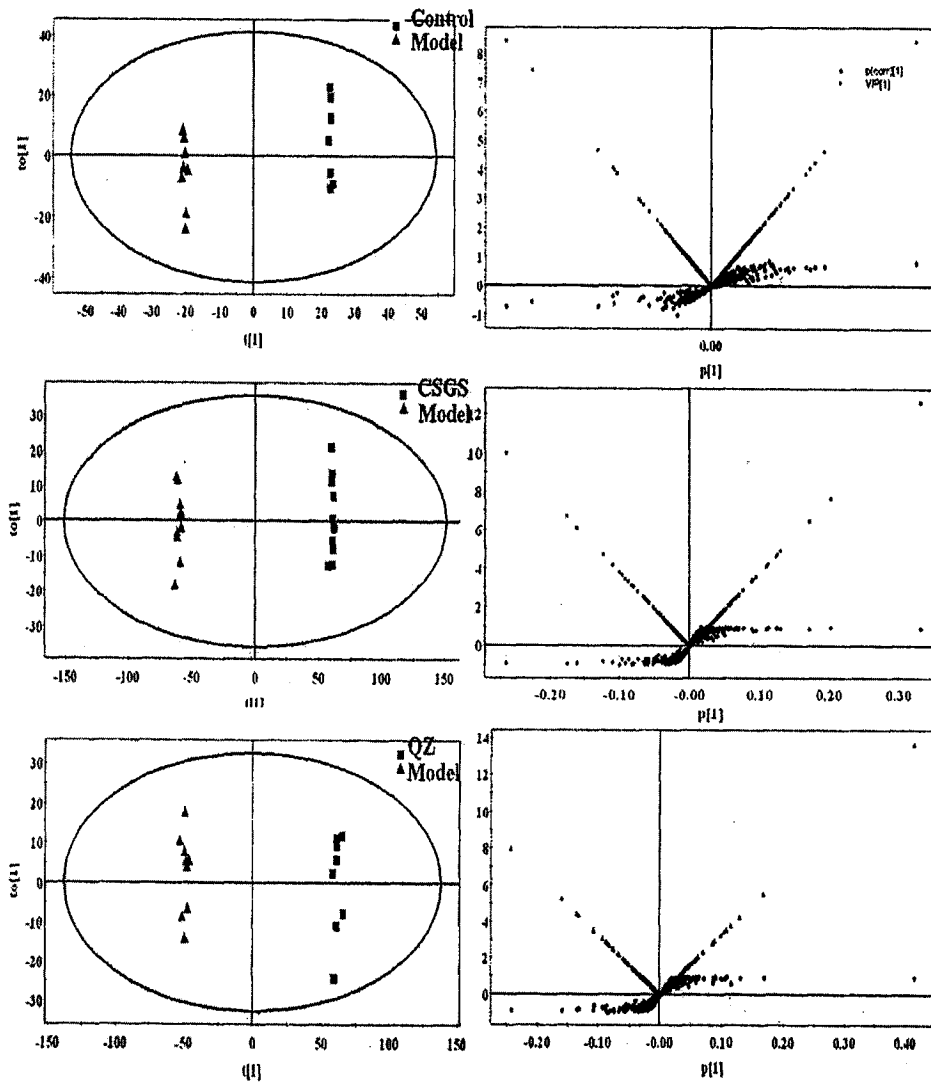


图3-2

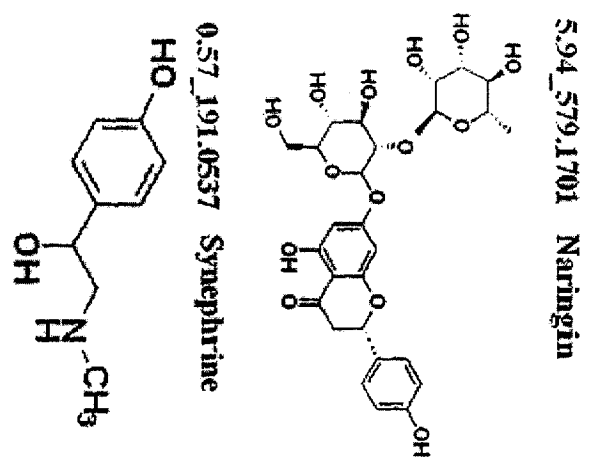
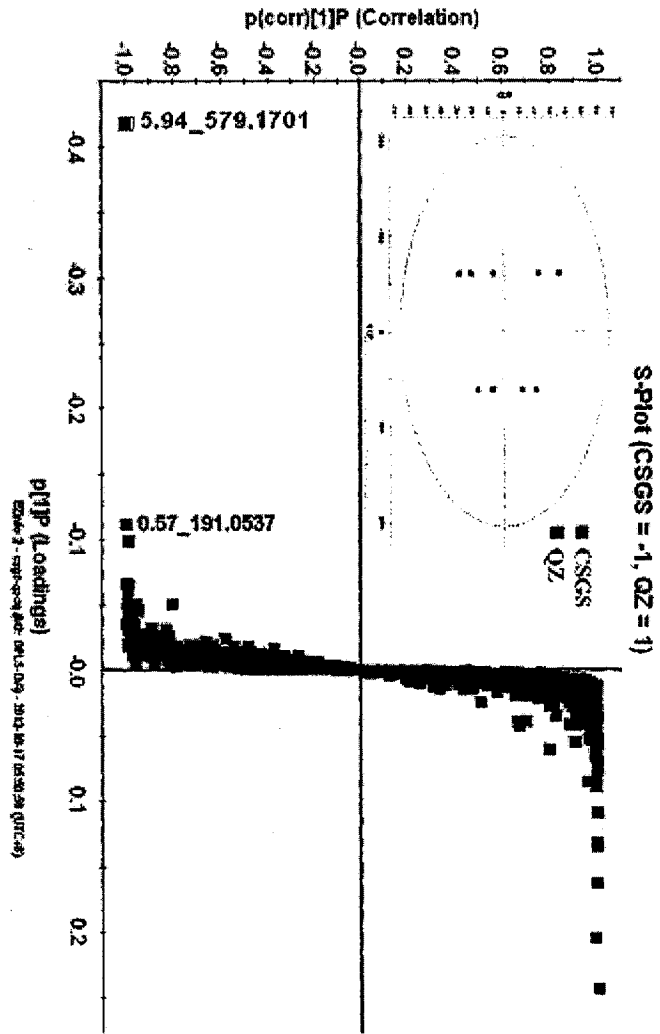


图4

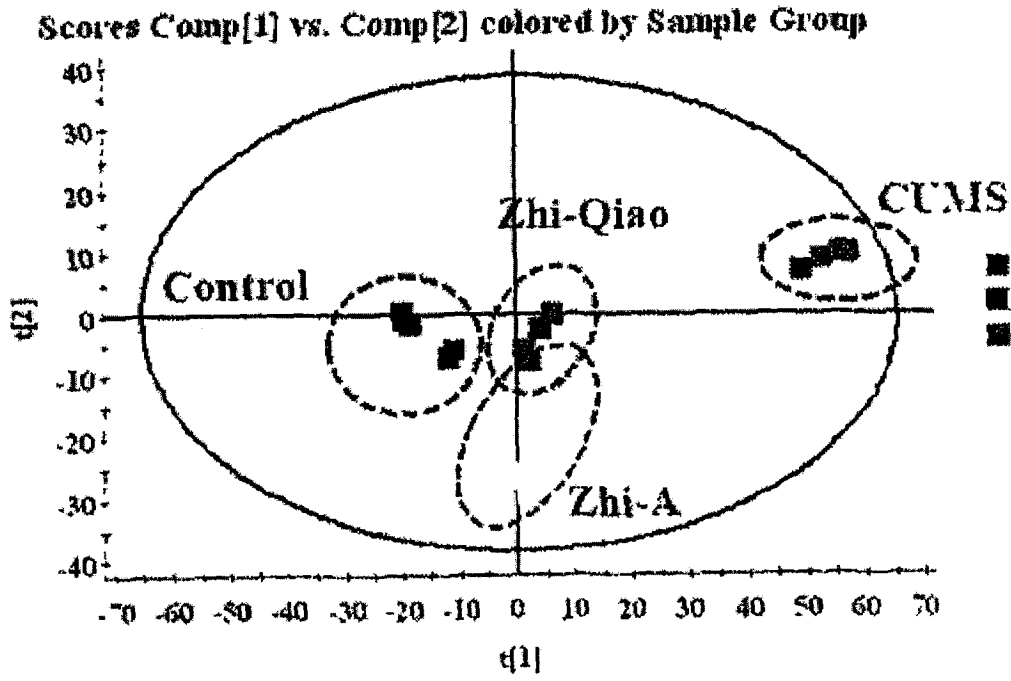


图5

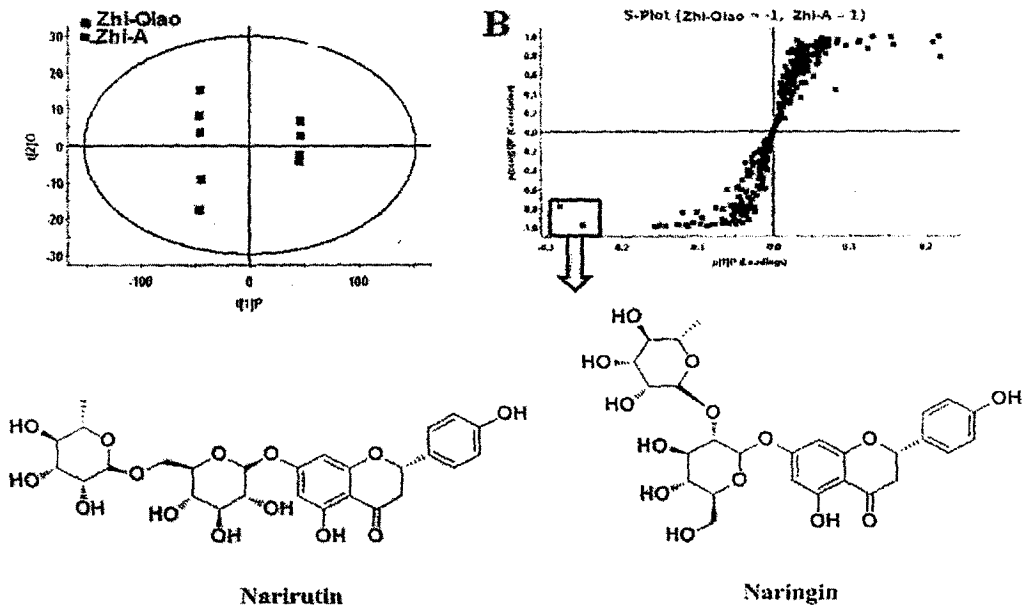


图6