(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101891785 B
(45)授权公告日 2012.06.27

(21)申请号 201010253791.0

(22)申请日 2010.08.16

(73)专利权人 江西山香药业有限公司
地址 342100 江西省赣州市安远县欣山镇龙泉路 139 号
专利权人 江西青峰药物研究有限公司

(72)发明人 杨小玲 谢宁 叶劲英 李志勇 吕武清 刘地发 程帆 蔡永红

(51)Int.Cl.
C07H 17/07(2006.01)
C07H 1/08(2006.01)
A61K 31/7048(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1493578 A,2004.05.05, 说明书第 1 页第 1 段.
CN 1803787 A,2006.07.19, 权利要求 1-3.
李艳等. 贯叶连翘的化学成分及其提取方法研究进展. 《北京工商大学学报(自然科学版)》. 2007, 第 25 卷(第 6 期), 第 6-10 页.
李艳等. 贯叶金丝桃活性成分及其分离纯化与检测方法的研究进展. 《药学进展》. 2008, 第 32 卷(第 1 期), 第 15-20 页.

审查员 李冰

权利要求书 2 页 说明书 10 页

(54)发明名称

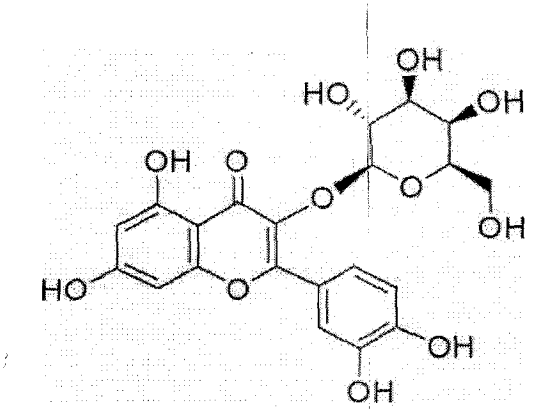
金丝桃苷的提取方法及其制备药物的用途

(57)摘要

本发明涉及一种金丝桃苷的提取方法及其制备药物的用途,所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得:取山香圆叶或贯叶金丝桃,加 5 ～ 15 倍量的 30% 90%乙醇回流提取 1 ～ 3 次,每次回流提取 1 ～ 3 小时,滤过;合并滤液,回收乙醇,水溶液通过大孔吸附树脂柱洗脱,收集洗脱部分,减压浓缩,干燥,得金丝桃苷的混合总苷,经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离,合并金丝桃苷流份,结晶,得到金丝桃苷纯品,金丝桃苷可作神经氨酸酶抑制剂用在预防和治疗流感,制成药学上可以接受的剂型。

CN 101891785 B

1. 一种金丝桃苷的提取方法，其中所述金丝桃苷的分子式：$C_{21}H_{20}O_{12}$，分子量：464.38，所述金丝桃苷的结构式如下：



所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶或贯叶金丝桃，加 5 ～ 15 倍量的 30％～ 90％乙醇回流提取 1 ～ 3 次，每次回流提取 1 ～ 3 小时，滤过；合并滤液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％～ 10％乙醇、35％～ 55％乙醇、0.5 ～ 1.5％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％～ 55％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得金丝桃苷的混合总苷，混合总苷经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷纯品。

2. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

3. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、1.2％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

4. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、0.8％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

5. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 10 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 8 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、7％乙醇、40％乙醇、1.3％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

6. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 8 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 7 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、45％乙醇、1.4％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

7. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯

叶金丝桃，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、0.6％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

8. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯叶金丝桃，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、0.9％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

9. 如权利要求 1 所述的提取方法，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯叶金丝桃，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、1.1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

金丝桃苷的提取方法及其制备药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种金丝桃苷的提取方法及其制备药物的用途。

背景技术

[0002] 目前流行性感冒病毒日益严重，并且流行性感冒病毒与呼吸道疾病及引起的全身性疾病密切相关，我国是流感高发国家之一，不但人口众多，而且生活习惯也有利于流感病毒的转播，每年人平均发病次数达到 0.3 ～ 0.7 次不等，重点人群达到 2 ～ 4 次。流感对人类存在严重威胁，尤其是新发品种流感病毒，其不但引起继发性其它微生物感染，而且会直接导致器官破坏和变态反应致人死亡。但目前并没有有效的治疗流行性感冒病毒及其疾病（流感）的方法和治疗手段，如针对临床症状进行炎症反应治疗，治标不治本。目前最常见的预防和治疗流行性感冒病毒的方法是使用流感病毒疫苗接种，非特异性抗病毒中药或西药磷酸奥司他韦（达菲）- 神经氨酸酶抑制剂。然而流感病毒疫苗预防接种弊端在于接种人群有选择性，不是人人可以接种。此外，流感病毒疫苗保护率不高，保护时间也较短 (3 ～ 6 个月）。目前大多数非特异性抗病毒中药虽然宣称有抗病毒作用，但是并非针对流感病毒，且抗病毒作用机理不清楚。在我们以往研究的许多种治疗外感风寒，西医所认为的感冒的中药组方并没有直接抗流感病毒的作用。简单的说，不是所有的治疗感冒的中药组方都有明确的抑制流感病毒的作用。西药“磷酸奥司他韦（达菲，(3R,4R,5S)-4- 乙酰胺 -5- 氨基 -3(1- 丙氧乙酯）-1- 环己烯 -1 羧酸乙酯磷酸盐）”是神经氨酸酶抑制剂，对流感病毒进入细胞有特异性抑制作用，但是不仅价格昂贵，而且有一些患者服用后出现呕吐、恶心、失眠、头痛、腹痛、腹泻、头晕、疲劳、鼻塞、咽痛和咳嗽等副反应。达菲是在体内被位于肝脏和肠道的酯酶转化为活性代谢产物而起着抑制神经氨酸酶作用，如果患者肝脏和肠道器官功能不正常也将影响其药效。此外，肾功能不全患者也要慎用。

[0003] 传统的中医学认为山香圆叶具有清热解毒，利咽消肿，活血止痛。临床用于乳蛾喉痹，咽喉肿痛，疮疡肿毒，跌扑伤痛；贯叶金丝桃具有舒肝解郁，清热利湿，消肿止痛。用于情志不畅，气滞郁闷，关节肿痛，小便不利。金丝桃苷是山香圆叶和贯叶金丝桃的主要成分之一，金丝桃苷对心肌缺血再灌注，脑缺血再灌注，脑梗塞都显示良好的保护作用，还具有镇痛，抗氧化，保护心肌、肝脏作用。但并未发现其具有抑制流感病毒感染、复制的作用，也未发现其具有抑制神经氨酸酶的作用，并且金丝桃苷是从中药黄蜀葵花进行提取，如申请号 200810195922.7 中所提到的。

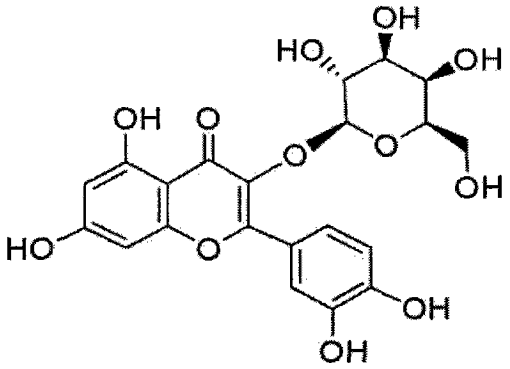
发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种金丝桃苷，其可以抑制流感病毒神经氨酸酶水解细胞表面唾液酸，导致流感病毒不能与细胞表面受体结合而进入细胞内，以及减少流感病毒在细胞内的产生，从而有效地针对性地抑制流感病毒复制，更重要地是本发明提供的金丝桃苷可以克服现有药物的副反应弊端。

[0005] 本发明提供的所述金丝桃苷的分子式：$C_{21}H_{20}O_{12}$，分子量：464.38，所述金丝桃苷的

结构式如下：

[0006]



[0007] 所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶或贯叶金丝桃，加 5 ～ 15 倍量的 30％～ 90％乙醇回流提取 1 ～ 3 次，每次回流提取 1 ～ 3 小时，滤过；合并滤液，回收乙醇，水溶液通过大孔吸附树脂柱洗脱，收集洗脱部分，减压浓缩，干燥，得金丝桃苷的混合总苷，经分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷纯品。

[0008] 优选的，其中水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％～ 10％乙醇、35％～ 55％乙醇、0.5 ～ 1.5％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％～ 55％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0009] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0010] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、1.2％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0011] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、0.8％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0012] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 10 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 8 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、7％乙醇、40％乙醇、1.3％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0013] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取山香圆叶，加 8 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 7 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、45％乙醇、1.4％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0014] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯叶金丝桃，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、0.6％氢

氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0015] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯叶金丝桃，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、0.9％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0016] 优选的，其中所述金丝桃苷采用如下的提取方法获得：取贯叶金丝桃，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、1.1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥。

[0017] 优选的，其中水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱洗脱，混合总苷经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷纯品。

[0018] 本发明的另一目的是提供了金丝桃苷制备预防和治疗流感及其并发症疾病的药物的用途。

[0019] 优选的，金丝桃苷用于抑制流感病毒。

[0020] 优选的，金丝桃苷用于抑制流感病毒 FM1。

[0021] 优选的，金丝桃苷用于抑制神经氨酸酶。

[0022] 优选的，其并发症是指肾功能衰竭。

[0023] 优选的，其并发症是指脾损伤或 / 和肺损伤。

[0024] 最后，本发明还提供了一种金丝桃苷制剂，该制剂以本发明上述的金丝桃苷为主要活性成分。

[0025] 本发明所述的金丝桃苷可以是从含金丝桃苷的各种药材中如山香圆叶、贯叶金丝桃中提取获得金丝桃苷粗品或金丝桃苷单体化合物。

[0026] 实验数据证明，本发明的金丝桃苷是有效的抑制神经氨酸酶成分，金丝桃苷随着使用剂量大小变化，其抑制神经氨酸酶活性的能力，即神经氨酸酶抑制率的高低也相应发生变化，并且成正相关，金丝桃苷能够通过抑制流感病毒表面神经氨酸酶，进而抑制流感病毒进入细胞里面、抑制已经进入细胞里面的流感病毒复制、增殖，从而减少了流感病毒对细胞的感染、生长，以及预防和治疗流感及其并发症，还可以抑制流感病毒神经氨酸酶水解细胞表面唾液酸，导致流感病毒不能与细胞表面受体结合而进入细胞内，以及减少流感病毒在细胞内的产生，更重要地是本发明提供的金丝桃苷可以克服现有药物的副反应弊端。

[0027] 而医学和药学研究人员无法预先在不做抑制流感病毒感染、复制，或抑制神经氨酸酶的实验的前提下，预先得知金丝桃苷具有预防和治疗流感病毒性感冒的良好效果，综上所述，本发明提供的金丝桃苷及其用途带来显著的技术效果。

具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 取山香圆叶 1000g，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20

柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（0.75g，纯度：98.5％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0030] 实施例 2

[0031] 取山香圆叶 1000g，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、1.2％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（0.82g，纯度：98.7％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0032] 实施例 3

[0033] 取山香圆叶 1000g，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、0.8％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（0.73g，纯度：98.4％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0034] 实施例 4

[0035] 取山香圆叶 1000g，加 10 倍量 70％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 8 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、7％乙醇、40％乙醇、1.3％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（0.74g，纯度：98.9％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0036] 实施例 5

[0037] 取山香圆叶 1000g，加 8 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 7 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、45％乙醇、1.4％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（0.63g，纯度：98.5％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0038] 实施例 6

[0039] 取贯叶金丝桃 1000g，加 12 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，滤渣再加 10 倍量 70％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、10％乙醇、45％乙醇、0.6％氢氧化钠溶液洗脱，收集 45％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷（8.5g，纯度：98.6％）纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0040] 实施例 7

[0041] 取贯叶金丝桃 1000g，加 15 倍量 60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量

60％乙醇回流提取 2 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、8％乙醇、40％乙醇、0.9％氢氧化钠溶液洗脱，收集 40％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷 (9.2g，纯度 :98.5％) 纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0042] 实施例 8

[0043] 取贯叶金丝桃 1000g，加 9 倍量 65％乙醇回流提取 2 小时，滤过，滤渣再加 9 倍量 65％乙醇回流提取 1.5 小时，滤过，合并两次提取液，回收乙醇，水溶液通过已处理好的 D101 大孔树脂柱，分别用水、5％乙醇、35％乙醇、1.1％氢氧化钠溶液洗脱，收集 35％乙醇洗脱部分，减压浓缩，干燥，得 30％以上金丝桃苷的混合总苷，经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析分离，合并金丝桃苷流份，结晶，得到金丝桃苷 (8.3g，纯度 :98.9％) 纯品，经分别与金丝桃苷标准品的 UV、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 比较，确定了金丝桃苷的结构。

[0044] 实验数据 1 :金丝桃苷对神经氨酸酶活性的抑制作用

[0045] 取实施例 1 制备方法所获得的金丝桃苷，加适量水使溶解，应用神经氨酸酶抑制剂鉴定试剂盒测定金丝桃苷抑制神经氨酸酶 (N1) 的效价见表 1。

[0046] (1). 标准曲线准备 :a. 在 96 孔荧光酶标板内每孔加入 70μl 神经氨酸酶检测缓冲液 ;b. 每孔再分别加入 0、1、2、5、7.5、10μl H5N1 神经氨酸酶 ;c. 每孔再加入 0 ～ 20μl Milli-Q 水。

[0047] (2). 样品检测的准备 :a. 在 96 孔荧光酶标板内每孔加入 70μl 神经氨酸酶检测缓冲液 ;b. 每孔再加入 10μl H5N1 神经氨酸酶 ;c. 每孔再加入 0 ～ 10μl 金丝桃苷样品 ; d. 每孔再加入 0 ～ 10μl Milli-Q 水。

[0048] (3). 检测步骤 :

[0049] a. 振动混匀约 1min ;

[0050] b.37℃孵育 2min 使抑制剂和 H5N1 神经氨酸酶充分相互作用，做标准曲线的样品也一起孵育 ;

[0051] c. 每孔加入 10μl 神经氨酸酶荧光底物 ;

[0052] d. 再振动混匀约 1min ;

[0053] e.37℃孵育 20 ～ 30min 后进行荧光测定。激发波长为 360nm，发射波长为 440nm。

[0054] (4). 根据标准曲线计算出样品对于 H5N1 神经氨酸酶的抑制百分比，以及做浓度曲线后计算出金丝桃苷对于 H5N1 神经氨酸酶的 IC50。金丝桃苷达到对神经氨酸酶的抑制率 IC50 为 0.05g/L。见表 1。

[0055] 表 1. 金丝桃苷抑制神经氨酸酶的活性

[0056]

化合物	检测靶酶	靶酶底物	化合物浓度	酶抑制率（效价）
金丝桃苷	神经氨酸酶（N1）	神经氨酸酶荧光底物	0.25mg/L	75.9%
			0.05mg/L	50.0%
			0.01mg/L	29.7%

[0057] 根据上述实验结果可以清楚地看到 :

[0058] (1). 金丝桃苷能够提取出有效的抑制神经氨酸酶成分；

[0059] (2). 金丝桃苷随着使用剂量大小变化，其抑制神经氨酸酶活性的能力，即神经氨酸酶抑制率的高低也相应发生变化，并且成正相关；

[0060] (3). 由上述实验可见，金丝桃苷能够通过抑制流感病毒表面神经氨酸酶，进而抑制流感病毒进入细胞里面、抑制已经进入细胞里面的流感病毒复制、增殖，从而减少了流感病毒对细胞的感染、生长，以及预防和治疗流感及其并发症。医学和药学研究人员无法预先在不做抑制流感病毒感染、复制，或抑制神经氨酸酶的实验的前提下，预先得知金丝桃苷具有预防和治疗流感病毒性感冒的良好效果。

[0061] 实验数据 2：金丝桃苷对流感病毒感染鸡胚的抑制作用

[0062] 取实施例 1 制备方法所获得的金丝桃苷，应用流感病毒亚甲型鼠肺适应株 (FM1) (H1N1) 鉴定金丝桃苷抑制 FM1 流感病毒在鸡胚中复制和抑制的能力。(1). 将 FM1 流感病毒液接种于 10d 龄无特定病原体鸡胚尿囊腔内，每胚 0.2ml，37℃孵育 72h，观察并计算半数鸡胚感染量 (EID50)。(2). 金丝桃苷对鸡胚的毒性作用采用，无菌生理盐水对金丝桃苷作系列稀释后接种于 10d 龄无特定病原体鸡胚尿囊腔内，每胚 0.2ml，每个浓度接种 6 胚，37℃孵育，观察鸡胚生长发育情况，以鸡胚可存活 96h 的最大浓度作为药物的 TD。(3). 金丝桃苷在鸡胚中对流感病毒的抑制作用采用，0.1ml 的流感病毒液和不同稀释度的金丝桃苷混合，37℃作用 2h，接种于 10d 龄无特定病原体鸡胚尿囊腔，每组接种 6 胚，37℃孵育 72h。病毒攻击量为 50EID50，同时设病毒对照、无菌生理盐水正常对照，计算金丝桃苷对病毒抑制作用的半数有效剂量 (ED50)。

[0063] (1). FM1 流感病毒对鸡胚的毒力经 Reed-Muench 法计算，其 EID50 为 $10^{-5.07}$。(2). 金丝桃苷接种于鸡胚后，其生长发育与正常对照组基本一致。96h 鸡胚均存活。鸡胚给予金丝桃苷原液未见鸡胚死亡，所以可认为 TD0 为 2.0g/L。(3). 金丝桃苷在鸡胚中对流感病毒的抑制作用见表 2。

[0064] 表 2. 金丝桃苷对流感病毒感染鸡胚的抑制作用

化合物	药物浓度 (g/L)	有病毒感染/例	无病毒感染/例	感染率 (%)
[0065] 金丝桃苷	0.5	0	8	0.0*
	0.25	0	8	0.0*
	0.125	0	8	0.0*
	0.0625	5	3	62.5*
	0.03125	8	0	100.0
病毒对照组	0.0	8	0	100.0
正常对照组	0.0	0	8	0.0

[0066] 与病毒对照组比较：*$P < 0.05$

[0067] 由表 2 可知，金丝桃苷在 0.0625 ～ 0.5g/L 对流感病毒有显著的抑制作用 (P

＜0.05)，ED_{50} 为 0.0976g±0.0035g/L，TI 为 61.48±2.27。

[0068] 实验数据 3：金丝桃苷对 FM1 流感病毒影响

[0069] 取实施例 1 制备方法所获得的金丝桃苷，应用流感病毒亚甲型鼠肺适应株 (FM1)(H1N1) 鉴定金丝桃苷抑制 FM1 流感病毒毒力的能力。(1). FM1 对狗肾传代细胞 (MDCK) 的毒力测定采用细胞半数感染量 (TCID50) 微量法。(2). 金丝桃苷对 MDCK 细胞的毒性测定采用无血清的 DMEM 对金丝桃苷作系列稀释后接种于已形成单层的 MDCK 细胞孔中，每孔 100μl，每个稀释度重复 4 个孔，同时设正常细胞对照。将培养板置 37℃、5% CO_2 培养箱内培养，每日观察细胞病变 (CPE)，连续观察 3d，以“+ ～ ++++”记录结果，按 Reed-Muench 法计算药物半数中毒浓度 (TD50) 和最大无毒浓度 (TD0)。(3). 金丝桃苷抑制 FM1 流感病毒作用测定：MDCK 细胞 5×10^5/ml，每孔 100μl，分别于 96 孔板中，37℃、5% CO2 培养箱内培养，次日吸去孔中培养液，加入 100TCID50 流感病毒液，每孔 100μl，37℃吸附 1h 后吸去上清液。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次，以药物的 TD0 为第 1 孔，再用无血清的 DMEM 液对金丝桃苷作系列稀释，分别加入上述已感染病毒的细胞中，同时设病毒对照和正常对照组，37℃、5% CO_2 温箱内培养，每日观察流感病毒产生的 MDCK 细胞病变特征，即单层细胞变性变圆等，连续 3d，计算出药物的 50％抑制病变浓度 (IC50) 及治疗指数 (TI)。TI 的计算：TI ＝ TD50/IC50，TI 值越大，表明药物的安全范围越大。以 Kmskal-Walis 和 Mann-Whitney 检验法比较试验组与病毒对照组细胞病变的差异，对药物剂量和对病毒感染细胞避免发生细胞病变 (CPE) 的抑制率进行相关性分析，判断是否存在量效反应关系。

[0070] (1). FM1 流感病毒对 MDCK 细胞的毒力经 Reed-Muench 法计算，其 TCID50 为 $10^{-4.81}$。(2). 金丝桃苷 MDCK 细胞的 TD0 分别为 0.80g±0.03g/L。(3). 将金丝桃苷作系列稀释后，对 100TCID50 流感病毒进行抑制试验，计算药物的半数有效量 IC50 及 TI 值大小，结果见表 3。

[0071] 表 3. 金丝桃苷对 FM1 流感病毒的 IC_{50}(g/L) 及 TI(x±s)

[0072]

化合物	靶病毒	病毒靶细胞	流感病毒 IC_{50} (g/L)	流感病毒 TI
金丝桃苷	FM1 流感株	MDCK	0.16±0.008	23.75±3.18

[0073] 由表 3 可知，金丝桃苷的 IC50 低，TI 高。金丝桃苷抑制 FM1 流感病毒致细胞病变的作用均随着药物剂量的增加而增强。对药物剂量和药物对 CPE 的抑制率进行的相关性分析表明，金丝桃苷的剂量与药物对 CPE 抑制率之间呈明显的正相关。

[0074] 实验数据 4：金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株的脾指数和肺指数的影响

[0075] 取实施例 1 制备方法所获得的金丝桃苷，应用流感病毒亚甲型鼠肺适应株 (FM1)(H1N1) 鉴定金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株的死亡保护作用。(1). 流感病毒 FM1 株病毒做 10 倍倍比稀释后分别接种每组 10 只 BALB/C 小鼠，雌雄各半。乙醚轻度麻醉后，每组分别给与不同稀释度的病毒，每只小鼠滴鼻接种 20μl。观察 10d 的小鼠死亡情况，按 Reed-Muench 法计算 LD50 为 $10^{-1.36}$。故确定实验所用的造模浓度为 10LD50。(2). 金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株的死亡保护作用：正常对照组、流感病毒 FM1 株病毒对照组、金丝桃苷 0.125g/L、0.25g/L、0.5g/L、1.0g/L 剂量组等分别灌胃，灌胃容量均为 0.4ml/

只。3d 后，除正常对照组外各组在乙醚轻度麻醉下用 10LD50 流感病毒 FM1 株滴鼻感染小鼠 20μl/ 只。同时正常对照组给予同体积的生理盐水。给药的 4 组继续给药，正常对照组和流感病毒 FM1 株病毒对照组给生理盐水 8 天，剂量同上。逐日观察动物发病和记录死亡数，共观察 14 天，计算死亡率（死亡率＝每组死亡数 / 每组小鼠总数 ×100%），结果见表 4。

(3). 金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株肺指数的影响：正常对照组、流感病毒 FM1 株病毒对照组、金丝桃苷 0.125g/L、0.25g/L、0.5g/L、1.0g/L 剂量组等分别灌胃，灌胃容量均为 0.4ml/ 只。3 天后，除正常对照组外各组在乙醚轻度麻醉下用 1.0LD50 流感病毒 FM1 株滴鼻感染小鼠 20μl/ 只。同时正常对照组给予同体积的生理盐水。给药的 4 组继续给药，正常对照组和流感病毒 FM1 株病毒对照组给生理盐水 8 天，剂量同上。于病毒感染后第 8 天处死小鼠，称体重，取肺称肺重，计算肺指数（肺指数＝肺质量 / 体质量 ×100%）；此外，取脾称脾重，计算脾指数（脾指数＝脾质量 / 体质量 ×100%），结果见表 5。

[0076] 表 4. 金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株的死亡保护结果

组别	动物数（只）	攻毒剂量（LD_{50}）	观察天数（天）	死亡数量（只）	死亡率（%）	平均死亡天数（天）
正常对照组	10	--	14	0	0	-----
流感病毒模型组	10	10	14	9	90	4.9
[0077] 金丝桃苷						
1.0g/L 组	10	10	14	1	10※※	9.0
0.5g/L 组	10	10	14	2	20※※	7.9
0.25g/L 组	10	10	14	7	70※	6.6
0.125g/L 组	10	10	14	8	80	5.8

[0078] 注：※※P ＜ 0.01VS 流感病毒模型组 ※P ＜ 0.05VS 流感病毒模型组

[0079] 表 5. 金丝桃苷对小鼠体内感染流感病毒 FM1 株的脾指数和肺指数的影响

[0080]

组别	动物数量（只）	攻毒剂量（LD_{50}）	观察天数（天）	脾指数	肺指数	肺指数抑制率（%）
正常对照组	10	-	8	0.35±0.04	0.97±0.105	17.8
流感病毒模型组	10	1	8	0.45±0.13#	1.18±0.103#	---
金丝桃苷						
1.0g/L 组	10	1	8	0.34±0.06※	0.98±0.078※	16.9※※
0.5g/L 组	10	1	8	0.34±0.33※	1.09±0.221※	7.6※
0.25g/L 组	10	1	8	0.35±0.18※	1.11±0.186	5.9
0.125g/L 组	10	1	8	0.35±0.05※	1.14±0.126#	3.4

[0081] 注：#P ＜ 0.05VS 正常对照组注：※※p ＜ 0.001VS 流感病毒模型组 ※p ＜ 0.05VS 流感病毒模型组

[0082] (1). 由表 4 可知，金丝桃苷在 0.25 ～ 1.0g/L 对流感病毒感染小鼠有显著的保护作用 (p ＜ 0.01)。

[0083] (2). 由表 5 可知，金丝桃苷在 0.5 ～ 1.0g/L 对流感病毒感染小鼠的肺指数抑制率有显著的作用 (p ＜ 0.01)。

[0084] 实验数据 5：金丝桃苷对肾功能损伤的影响

[0085] 1) SD 大鼠，200 ～ 240g，上海西普尔－必凯实验动物责任有限公司，动物合格证号：SCXK (沪) 2003-0002

[0086] 2) 试剂及药物腺嘌呤，腺嘌呤，(含量＞ 98％，为进口分装，中国上海，批号 20010520)，实施例 1 制备方法所获得的金丝桃苷；

[0087] 3) 试验方法：雄性 SD 大鼠，体重 220g 左右，先用普通饲料喂养 10 天正常生长后，按体重随机分为正常对照组、给药实验组和造模对照组，每组 13 ～ 15 只。给药实验组和造模对照组用腺嘌呤灌胃制作慢性肾功能衰竭 (CRF) 模型，以腺嘌呤 320mg/(kg•d) 灌胃，用蒸馏水制成混悬液约 2ml/ 只，共 20 天；20 天后给药，给药实验组以金丝桃苷 2.0g/(kg•d) 灌胃，金丝桃苷以蒸馏水制成混悬溶液 (0.25g/ml)，每次约 2ml/ 只，分次灌胃，正常对照组和造模对照组以等体积水灌胃，给药 35 天后将大鼠用乙醚麻醉，鼠尾动脉采血观察各项指标。

[0088] 4) 结果：

[0089] 表 6. 金丝桃苷对 CRF 大鼠肾功能的影响

[0090]

组别	动物数 (只)	BUN (mmol/L)	SCr (μmol/L)	Hb (g/L)	Ret (%)
正常对照组	15	7.45±1.21	23.88±3.60	112.47±6.06	13.06±3.04
造模对照组	13	32.16±3.43	84.16±0.93*	99.58±8.09	20.58±6.19
给药实验组	14	9.24±1.97**	25.05±1.17**	110.58±5.11**	14.79±3.83**

[0091] 注：经 T 检验，给药金丝桃苷与造模对照组和正常对照组比较“*”表示 P ＜ 0.05，“**”表示 P ＜ 0.01

[0092] 本实验用腺瞟呤灌胃建立大鼠 CRF 模型后，造模对照组大鼠精神萎靡，体重明显降低，血清 Bun、Ser 明显升高，Hb 明显下降，Ret 明显升高，表明大鼠肾功能受损，经给予金丝桃苷后大鼠与正常对照组差异不显著，而与模型组比较差异十分显著，故金丝桃苷对肾脏无毒性作用。

[0093] 综上实验数据证明，本发明的金丝桃苷是有效的抑制神经氨酸酶成分，金丝桃苷随着使用剂量大小变化，其抑制神经氨酸酶活性的能力，即神经氨酸酶抑制率的高低也相应发生变化，并且成正相关，金丝桃苷能够通过抑制流感病毒表面神经氨酸酶，进而抑制流感病毒进入细胞里面、抑制已经进入细胞里面的流感病毒复制、增殖，从而减少了流感病毒对细胞的感染、生长，以及预防和治疗流感及其并发症，还可以抑制流感病毒神经氨酸酶水

解细胞表面唾液酸，导致流感病毒不能与细胞表面受体结合而进入细胞内，以及减少流感病毒在细胞内的产生，更重要地是本发明提供的金丝桃苷可以克服现有药物的副反应弊端。

[0094] 而医学和药学研究人员无法预先在不做抑制流感病毒感染、复制，或抑制神经氨酸酶的实验的前提下，预先得知金丝桃苷具有预防和治疗流感病毒性感冒的良好效果。