



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101856468 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 02

(21) 申请号 200910081784. 4

审查员 谢京晶

(22) 申请日 2009. 04. 10

(73) 专利权人 北京天科仁祥医药科技有限公司  
地址 100101 北京市南沙滩 2 号院天和人家  
2-3-201

(72) 发明人 伍荣林

(51) Int. Cl.

A61K 36/8988(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101732578 A, 2010. 06. 16, 实施例 9 和 12.

莫志贤等. 钩藤临床运用的新进展. 《时珍国医国药》. 2006, 第 17 卷 (第 5 期), 684-685.

李文兰等. 大孔吸附树脂法对天麻中天麻苷和总苷的分离纯化. 《中国医院药学杂志》. 2007, 第 27 卷 (第 1 期), 18-21.

王盟等. 钩藤总生物碱的研究进展. 《实用医药杂志》. 2008, 第 25 卷 (第 3 期), 360-362.

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

一种治疗老年痴呆的药物组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种治疗老年痴呆的药物组合物及其制备方法, 本发明药物组合物含有作为活性成分的天麻总苷和钩藤总生物碱及药学上可接受的载体及赋形剂。该药物组合物对血管性老年痴呆具有良好的疗效。

1. 一种治疗老年痴呆的药物组合物,其特征在于该药物组合物由以下重量配比的活性成分天麻总苷 3 重量份,钩藤总生物碱 4 重量份及药学上可接受的载体及赋形剂组成;

其中所述天麻总苷的制备包含如下方法和步骤:

取天麻药材予以粉碎,用 50-90%乙醇 4-10 倍量回流提取 2 到 3 次,每次 1-3 小时,滤液合并,减压回收乙醇,浓缩至 80℃下相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏,加水稀释至密度为 1.05,将溶液加于 1.7 倍药液量已处理好的 X-5 型大孔吸附树脂柱,流速 8mL/min,先用树脂重量 10 倍的水 V/W 洗脱至洗脱液澄清,再 10 倍的 70%乙醇 V/W 洗脱,收集 70%乙醇洗脱液,回收乙醇、浓缩至干,得天麻总苷,所述天麻总苷含量大于 50%;

所述钩藤总生物碱的制备包含如下方法和步骤:

取钩藤药材加饱和石灰水润湿,晾干,粉碎成粗粉,用 50-90%乙醇 6-14 倍量回流提取 2 到 3 次,每次 1-3 小时,合并提取液,减压回收乙醇,浓缩至 80℃下相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏,用稀盐酸调 pH 至 2.0,滤过,收集滤液,滤液加到 2 倍已处理好的 001×7 型阳离子树脂柱上,用去离子水洗至流出液中性,再用乙醇洗至流出液无色,用 10 倍柱体积的含 0.5%氨水的乙醇作为解吸附剂,洗脱至流出液无生物碱反应,合并洗脱液,减压回收乙醇至无醇味,用三氯甲烷提取 2-3 次,每次 1/3 水液体积,合并三氯甲烷提取液,低温减压回收溶剂至干,得钩藤总生物碱,所述总生物碱含量大于 50%。

2. 一种治疗老年痴呆的药物组合物,其特征在于以天麻总苷 1.5 重量份,钩藤总生物碱 3 重量份替换权利要求 1 中药物活性成分重量配比。

3. 一种治疗老年痴呆的药物组合物,其特征在于以天麻总苷 2 重量份,钩藤总生物碱 6 重量份替换权利要求 1 中药物活性成分重量配比。

4. 如权利要求 1-3 任一所述药物组合物,其中药物组合物为颗粒剂、丸剂、胶囊剂、片剂、口服液体制剂或冻干粉针剂。

5. 如权利要求 1-3 任一所述的药物组合物,其特征是活性成分天麻总苷的制备包含如下方法和步骤:

取天麻药材予以粉碎,用 70%乙醇回流提取 3 次,第一次 8 倍量提取 2 小时,第二次 7 倍量提取 1.5 小时,第三次 6 倍量提取 1 小时,滤液合并,减压回收乙醇,浓缩至 80℃下相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏,加水稀释至密度为 1.05 左右,将溶液加于 1.7 倍药液量已处理好的 X-5 型大孔吸附树脂柱,流速 8mL/min,先用树脂重量 10 倍的水 V/W 洗脱至洗脱液澄清,再 10 倍的 70%乙醇 V/W 洗脱,收集 70%乙醇洗脱液,回收乙醇、浓缩至干,得天麻总苷,所述天麻总苷含量大于 50%。

6. 如权利要求 1-3 任一所述的药物组合物,其特征是活性成分钩藤总生物碱的制备包含如下方法和步骤:

取钩藤药材加饱和石灰水润湿,晾干,粉碎成粗粉,加 10 倍量 70%乙醇提取 3 次,每次回流 1 小时,合并提取液,减压回收乙醇,浓缩至 80℃下相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏,用稀盐酸调 pH 至 2.0,滤过,收集滤液,滤液加到 2 倍已处理好的 001×7 型阳离子树脂柱上,用去离子水洗至流出液中性,再用乙醇洗至流出液无色,用 10 倍柱体积的含 0.5%氨水的乙醇作为解吸附剂,洗脱至流出液无生物碱反应,合并洗脱液,减压回收乙醇至无醇味,用三氯甲烷提取 3 次,每次 1/3 水液体积,合并三氯甲烷提取液,低温减压回收溶剂至干,得钩藤总生物碱,所述总生物碱含量大于 50%。

## 一种治疗老年痴呆的药物组合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种药物组合及其制备方法,特别是涉及一种治疗老年痴呆的药物组合物及其制备方法,属于新药技术领域。

### 背景技术

[0002] 老年痴呆已成为老年人四大常见疾病之一,成为继心脏病、肿瘤和卒中之后的第四位死亡原因。随着社会人口的不断老龄化,老年痴呆患者的发病率有逐年增高的趋势,它也将成为我国的一个严重的公共卫生问题。关于老年痴呆的发病率,欧美文献报道 60 岁以上人群的痴呆患病率高达 16 ~ 29%,血管性痴呆占全部痴呆的 12 ~ 37.2%;在日本,血管性痴呆占有老年痴呆的 60%左右;在我国,据流行病学调查表明,65 岁以上老年人中痴呆患病率为 3.9 ~ 6.8%,其中血管性痴呆占 68.5%。由于其发病率、致残率、病死率均较高,故已成为威胁高龄人群生命的重要疾病之一,并给社会和家庭带来沉重的负担。因此,探索血管性痴呆早期预防措施及开发出安全有效的治疗药物已成为现代科学研究及临床实践的重要课题。

[0003] 西医对血管性痴呆患者的治疗以改善大脑血液循环、促进大脑代谢、增强神经传递功能为主要途径。总体而言,这些药物对轻度痴呆患者能在一定程度上改善痴呆症状或延缓痴呆进展,但收效并不明显,并且存在较大的毒副作用,病人耐受性差。常用的药物主要为神经递质(乙酰胆碱类)激活剂、血管扩张剂(包括钙离子阻断剂、海得琴 Hydergine 等)和脑细胞激活剂(脑活素等)。它们虽为畅销药,但目前唯一被美国 FDA 评定为“有效”的脑代谢改善剂只有海得琴,而其在长期疗效和毒副作用方面也存在着许多问题。

[0004] 国内外关于血管性痴呆的中药研究仍在摸索中,近年来,中药提供了一些在血管性痴呆治疗上的成果,但存在起效慢,效果不显著的缺陷,如天麻促进剂、复方人参大黄制剂仅仅显示了一定的疗效,被认为认知症状改善较好的中药提取物如加兰他敏、石杉碱甲等,临床应用显示其对记忆障碍的改善程度较低,并且上述制剂在临床应用中存在腹泻、厌食、失眠等一系列不良反应。

[0005] 总之,已经上市的一些西药和中药,长期服用往往疗效欠佳、出现一些病人无法耐受的毒副反应,并且价格昂贵。研究开发出疗效好,副作用少且廉价的新药就显得非常迫切和必要。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于公开一种治疗老年痴呆的药物组合物及其制备方法。

[0007] 本发明目的是通过如下技术方案实现的:

[0008] 本发明药物组合物的活性成分重量配比如下:

[0009] 天麻总苷 1-5 重量份,钩藤总生物碱 2-6 重量份。

[0010] 本发明药物组合物的活性成分,优选重量配比如下:

[0011] 天麻总苷 3 重量份,钩藤总生物碱 4 重量份。

[0012] 本发明药物组合物的活性成分,优选重量配比如下:

[0013] 天麻总苷 1.5 重量份,钩藤总生物碱 3 重量份。

[0014] 本发明药物组合物的活性成分,优选重量配比如下:

[0015] 天麻总苷 2 重量份,钩藤总生物碱 6 重量份。

[0016] 该活性成分天麻总苷的制备方法包括如下步骤:

[0017] 取天麻药材予以粉碎,用 50-90%乙醇 4-10 倍量回流提取 2 到 3 次,每次 1-3 小时,滤液合并,减压回收乙醇,浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃),加水稀释至密度为 1.05 左右,将溶液加于 1.7 倍药液量已处理好的 X-5 型大孔吸附树脂柱 (流速约 8mL/min),先用树脂重量 10 倍 (V/W) 的水洗脱至洗脱液澄清,再 10 倍 (V/W) 的 70%乙醇洗脱,收集 70%乙醇洗脱液,回收乙醇、浓缩至干,得天麻总苷 (总生物碱含量大于 50%)。

[0018] 该活性成分天麻总苷的优选制备方法包括如下步骤:

[0019] 取天麻药材予以粉碎,用 70%乙醇回流提取三次,第一次 8 倍量提取 2 小时,第二次 7 倍量提取 1.5 小时,第三次 6 倍量提取 1 小时,滤液合并,减压回收乙醇,浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃),加水稀释至密度为 1.05 左右,将溶液加于 1.7 倍药液量已处理好的 X-5 型大孔吸附树脂柱 (流速约 8mL/min),先用树脂重量 10 倍 (V/W) 的水洗脱至洗脱液澄清,再 10 倍 (V/W) 的 70%乙醇洗脱,收集 70%乙醇洗脱液,回收乙醇、浓缩至干,得天麻总苷 (总生物碱含量大于 50%)。

[0020] 该活性成分钩藤总生物碱的制备方法包括如下步骤:

[0021] 钩藤药材加饱和石灰水润湿,晾干,粉碎成粗粉,用 50-90%乙醇 6-14 倍量回流提取 2 到 3 次,每次 1-3 小时,合并提取液。减压回收乙醇,浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃测),用稀盐酸调 pH 至 2.0,滤过,收集滤液。滤液加到 2 倍已处理好的 001×7 型阳离子树脂柱上,用去离子水洗至流出液中性,再用乙醇洗至流出液无色。用含 0.5%氨水的乙醇作为解吸附剂,洗脱至流出液无生物碱反应 (约 10 倍柱体积),合并洗脱液,减压回收乙醇至无醇味,用三氯甲烷提取 2-3 次,每次 1/3 水液体积,合并三氯甲烷提取液,低温减压回收溶剂至干,得钩藤总生物碱 (总生物碱含量大于 50%)。

[0022] 该活性成分钩藤总生物碱的优选制备方法包括如下步骤:

[0023] 钩藤药材加饱和石灰水润湿,晾干,粉碎成粗粉,加 10 倍量 70%乙醇提取 3 次,每次回流 1 小时,合并提取液。减压回收乙醇,浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃测),用稀盐酸调 pH 至 2.0,滤过,收集滤液。滤液加到 2 倍已处理好的 001×7 型阳离子树脂柱上,用去离子水洗至流出液中性,再用乙醇洗至流出液无色。用含 0.5%氨水的乙醇作为解吸附剂,洗脱至流出液无生物碱反应 (约 10 倍柱体积),合并洗脱液,减压回收乙醇至无醇味,用三氯甲烷提取 3 次,每次 1/3 水液体积,合并三氯甲烷提取液,低温减压回收溶剂至干,得钩藤总生物碱 (总生物碱含量大于 50%)。

[0024] 取上述活性成分,加入适量药学上常用辅料,制成药物组合物制剂,包括颗粒剂、丸剂、胶囊剂、片剂、口服液体制剂等口服制剂或冻干粉针剂。该药物组合物对血管性老年痴呆具有良好的疗效。

[0025] 下述实验例和实施例进一步证明但不限于本发明。

[0026] 实验例 1:本发明实施例 3 方法制备的药物组合物对颈动脉注入栓子所致大鼠血管性痴呆模型的保护作用

### [0027] 1、试验动物分组与造模

[0028] 实验大鼠按体重随机分组,包括假手术组、模型对照组、本发明药物组合物低、中、高剂量组,25、50、100mg/kg,以及阳性对照药尼莫地平组。各组动物造模当天开始给药,连续46天,给药容积5mL/kg。假手术组和模型对照组灌服等容积溶媒。

### [0029] 2、造模方法

[0030] 按吴彦,张爱林等所建方法<sup>[1,2]</sup>:同批大鼠颈总动脉采血,于烘箱37℃干燥48h后,将干燥血凝块研细,过200um筛孔制成栓子,备用。造模时,以生理盐水配成30g/L混悬液应用,临用新制。

[0031] 大鼠腹腔注射100g/L水合氯醛溶液(0.35g/kg)麻醉,常规消毒后颈正中切口,分离肌肉组织和筋膜,暴露左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。暂时夹闭颈外动脉与颈内动脉分支处的颈外动脉近心端和颈总动脉近心端,由颈总动脉远心端将栓子混悬液0.5mL推入颈内动脉,粘合血管伤口。立即打开颈总动脉恢复血流供应使栓子通过颈内动脉入大脑前、中动脉及其侧支,打开颈外动脉恢复血供。逐层缝合肌肉与皮肤,腹腔注射庆大霉素。大鼠回笼饲养。假手术组除以推注生理盐水代替栓子混悬液外,余同模型组。

### [0032] 3、学习记忆能力测定

[0033] 造模给药41天开始Morris水迷宫测试,行为学测试时间依大鼠的学习情况而定。测试时,将平台放在西南象限(第三象限)正中距池壁22cm处,迷宫中加入高于安全平台1cm的牛奶液,温度(22±0.5)℃。实验室温度保持25℃。训练期间环境安静,迷宫外参照物不变。

#### [0034] 3.1、定位航行试验

[0035] 测量大鼠对学习记忆的获取能力。实验历时4d,受试动物每天分别从东北、西北两个象限入水点依次进行训练,将大鼠面向池壁放入水中,记录其逃避潜伏期(从入水至找到安全平台的时间)。测试前2天为保证实验动物皆有可能找到平台,故逃避潜伏期最长设为90s,在后两天的测试中,设为60s。超过60s和90s者,分别以60s和90s计。

#### [0036] 3.2、空间搜索试验

[0037] 测量大鼠对平台空间位置记忆的保持能力。行为测试第5天撤除平台,由东北象限入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录其首次穿越目标区时间,超过60s以60s计。

### [0038] 4、脑组织生化代谢测定

[0039] 造模给药46天,断头取脑,于冰盘上迅速取下皮层及海马,制备100g/L脑匀浆备用,发色底物法测定海马和皮质脑区的LA含量和AChE活力。

### [0040] 5、脑组织病理形态学观察

[0041] 造模给药46d,断头取脑,将脑组织用10%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规HE染色。

### [0042] 6、结果与结论

[0043] MDI模型大鼠学习记忆能力明显减退,表现为在定位航行试验中,模型组大鼠逃避潜伏期与假手术组相比,在第二天和第三天有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),空间搜索实验中,模型组大鼠首次穿越平台的时间与假手术组相比,明显延长( $P < 0.05$ )。本发明药物组合物低、中、高剂量组,25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg连续给药可以不同程度地缩短MID模型大鼠定位航行试验中第二日和第三日的逃避潜伏期和空间搜索实验中首次穿越平台

的时间,从而提高 MDI 大鼠在水迷宫测试中对学习记忆的获取能力以及对平台空间位置的记忆保持能力 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果见表 1。

[0044] MID 模型大鼠脑组织生化代谢紊乱,表现为皮质和海马区 LA 含量增加,而 AChE 活力明显下降,与假手术组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )。本发明药物组合物低、中、高剂量组,25mgk/g、50mg/kg、100mg/kg 连续给药 46d 可以不同程度地逆转模型大鼠上述生化指标的异常变化,表现为明显降低模型大鼠两脑区的 LA 含量,增强 AChE 活力 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )。结果见表 2。

[0045] HE 染色结果可见,假手术组大鼠皮层神经细胞层次清晰,结构清楚,胞质呈淡红色,核呈深蓝色。模型组大鼠脑皮质可见多处散在梗塞灶,可浸及皮质下结构,细胞失去层次排列,呈萎缩变性,数量明显减少,血管明显扩张。与模型组相比,阳性对照尼莫地平组、本发明药物组合物低、中、高剂量组,25mgk/g、50mg/kg、100mg/kg 组大鼠脑皮质内梗塞灶数量、面积减少,细胞数量明显增加,血管扩张程度减轻。

[0046] 表 1 本发明药物组合物对 MID 大鼠学习记忆能力的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ )

[0047]

组别	剂量 (mg/kg)	N	首次穿越平台时间 (s)	逃避潜伏期 (s)			
				第一天	第二天	第三天	第四天
假手术	—	11	19±16	73±17	46±21	23±10	18±12
模型	—	12	36±16 <sup>△</sup>	88±22	66±22 <sup>△</sup>	45±18 <sup>△△</sup>	28±18
本发明药物组合物	25	11	26±19	78±20	55±27	26±18*	22±17
	50	12	18±18*	74±22	45±23	22±16**	20±16
	100	12	17±17*	72±18	34±20*	18±18**	18±18
尼莫地平	20	12	18±18*	73±19	38±20*	22±18**	18±16

[0048] 注:与模型组相比:\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与假手术组比较:<sup>△</sup> $P < 0.05$ ; <sup>△△</sup> $P < 0.01$

[0049] 表 2 本发明药物组合物对 MID 大鼠脑组织生化代谢的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ )

[0050]

组别	剂量 (mg/kg)	N	皮层		海马	
			LA 含量 (mmol/g)	AchE 活性 (U/mg)	LA 含量 (mmol/g)	AchE 活性 (U/mg)
假手术	—	11	0.50±0.15	0.35±0.12	0.52±0.10	0.58±0.17
模型	—	12	0.65±0.10 <sub>△</sub>	0.20±0.06 <sub>△</sub>	0.66±0.12 <sub>△</sub>	0.41±0.13 <sub>△</sub>
本发明药物 组合物	25	11	0.55±0.12	0.28±0.12	0.55±0.06**	0.53±0.10*
	50	12	0.51±0.10*	0.35±0.10**	0.53±0.08**	0.58±0.08**
	100	12	0.48±0.08* <sub>*</sub>	0.33±0.12**	0.50±0.07**	0.63±0.12**
尼莫地平	20	12	0.50±0.13*	0.30±0.09*	0.50±0.10**	0.59±0.10**

[0051] 注：与模型组相比： $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ；与假手术组比较： $^{\Delta}P < 0.05$ ； $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

[0052] 实验例 2. 本发明实施例 3 方法制备的药物组合物对神经细胞损伤的保护作用

[0053] 1、大鼠大脑皮层神经细胞的原代培养，神经细胞缺糖缺氧损伤及给药

[0054] 按文献方法进行乳大鼠大脑皮层神经细胞原代培养和拟缺糖缺氧损伤<sup>[3]</sup>，取培养 10 天的神经细胞，吸去原培养液，用无糖 Earle's 液洗二遍后，加入无糖 Earle's 液，培养 30 分钟。各组分别加入  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  终浓度为 0.5mmol/L。正常对照组用含葡萄糖 Earle's 液（无糖 Earle's 液加 Glucose 5.5）孵育，为消除连  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  在水中的分解产物的影响，另设非低氧溶液对照组，即预先配制 100mmol/L 的缺氧  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  贮备液（3 天以上）稀释至终浓度 1mmol/L，即为  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  常氧溶液对照组。连二亚硫酸钠（即  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ）作用 24h，本发明药物组合物大中小剂量组和阳性药尼莫地平组在损伤处理前按照各自浓度分别加入，每组 6 孔。

[0055] 2、LDH 漏出率测定：

[0056] 损伤 24h 后，一半孔收集培养液上清液 150  $\mu\text{l}$ ，剩余培养液 -20 度冰箱冻存 5h，之后拿出化冻后，按试剂盒说明书分别测定原上清液乳酸脱氢酶（LDH）的活性和培养板中剩余培养液冻融后的 LDH 活性，计算 LDH 漏出率。漏出率 = 上清液 LDH 活性 / 冻融后细胞培养液中 LDH 活性  $\times 100\%$ 。

[0057] 3、MTT 法测定细胞活性

[0058] 另一半孔实验结束前 4h 加入 MTT（终浓度为 0.5g  $\text{kg}^{-1}$ ），吸去培养液，每孔加入二甲基亚砷 200  $\mu\text{l}$ ，待孔内颗粒完全溶解后，移入 96 孔培养板中，用酶联免疫检测仪测定 570nm 处的光密度（OD）。

[0059] 4、结果

[0060] 拟缺血损伤 24h 后，模型组细胞出现细胞活性降低，LDH 漏出增加，与对照组和常氧对照组比较有统计学意义（ $p < 0.05$ ； $p < 0.01$ ）。本发明药物组合物各剂量组能明显提高模型细胞的活性，减少 LDH 漏出，与模型组比较有统计学意义（ $P < 0.05$ ； $P < 0.01$ ）。表明其可显著减轻拟缺糖缺氧对神经细胞的损伤，结果见表 3。

[0061] 表 3 本发明药物组合物对大鼠神经细胞拟缺糖缺氧损伤的影响（ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ）

[0062]

组别	n	浓度 (ug/mL)	MTT (A570)	LDH 漏出率 (%)
对照组	6	—	1.68±0.22	22.55±5.51
常氧对照组	6	—	1.60±0.20	28.29±6.21
模型组	6	—	1.28±0.12 <sup>△</sup>	70.15±9.77 <sup>△△</sup>
本发明药物组合物	6	50	1.42±0.20	57.55±8.55*
	6	100	1.65±0.31*	54.20±11.56*
	6	200	1.58±0.21*	51.84±14.40**
尼莫地平	6	0.02	1.56±0.18*	40.17±11.54**

[0063] 注：与模型组相比：\*P < 0.05, \*\*P < 0.01；与对照与常氧对照比较：<sup>△</sup>P < 0.05；<sup>△△</sup>P < 0.01

[0064] 实验例 3. 本发明实施例 3 方法制备的药物组合物对不同诱导剂（胶原、PAF、ADP）诱导豚鼠血小板聚集的影响

[0065] 1、分组及给药

[0066] 实验豚鼠按体重随机分组，即空白对照组、本发明药物组合物，25、50、100mg/kg、尼莫地平 20mg/kg。实验动物连续灌胃给药 5d。末次给药 1h 后采血测定。空白对照组灌服等容积的溶媒。

[0067] 2、血小板聚集率测定

[0068] 末次给药 1h 后颈总动脉采血，以 3.8% 枸橼酸钠抗凝，混匀后，800rpm 离心 10min 两次，合并两次上清液作为富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP)，并在血小板计数仪上作血小板计数。余下血浆以 3000rpm 离心 6min，取上清为贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP)。以 PPP 调零，取 PRP300ul 加入比浊管，37℃ 温育 5min，分别加入不同诱导剂（胶原、APF、ADP），聚集不同时间，记录血小板最大聚集率，并计算血小板聚集抑制率。

[0069] 3、结果

[0070] 加入不同诱导剂（胶原、PAF、ADP）后，分别聚集 10min、5min、5min，血小板出现明显聚集，并有峰值（即血小板最大聚集率），本发明药物组合物各剂量组能抑制三种诱导剂诱导的豚鼠血小板聚集，降低其最大聚集率 (P < 0.05；P < 0.01)，结果见表 4。

[0071] 表 4 本发明药物组合物对不同诱导剂诱导豚鼠血小板聚集的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ ) n = 10

[0072]

组别	剂量 (mg/kg)	血小板最大聚集率 (%)		
		胶原	ATP	PAF
对照组	—	64.23±8.65	70.23±17.65	72.45±18.67
本发明药物组合 物	25	52.64±10.12*	64.45±15.56	59.22±15.64
	50	48.22±12.41**	50.22±14.58**	50.17±14.55*
	100	40.26±10.65**	44.24±12.35**	44.25±12.15**
尼莫地平	20	43.34±12.24**	47.21±12.55**	48.42±14.55**

[0073] 注：与对照相比：\*P < 0.05, \*\*P < 0.01

[0074] 实验 4. 例本发明实施例 3 方法制备的药物组合物对脐静脉内皮细胞的作用

[0075] 参照文献方法<sup>[4]</sup>, 内皮细胞接种到 96 孔板上, 每孔  $2 \times 10^4$  个细胞, 培养成单层后, PBS 洗涤, 换用 5% 血清 M199 培养 12h, 加入含不同组分及组分对的培养液继续培养一定时间, 再加入  $H_2O_2$  ( $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) 刺激细胞 4h。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 小心洗涤细胞后, 加入含 0.1% MTT 的 M199 培养液  $100 \mu L$ ,  $37^\circ C$  孵育 4h 后移出培养液, 每孔加入二甲基亚砷  $100 \mu L$ ,  $37^\circ C$  振摇 10min, 570nm 处测吸光度 ( $A_{570nm}$ ) 值, 计算 HUVEC 存活率。

[0076] 不同浓度本发明药物组合物及尼莫地平预处理 6h,  $H_2O_2$  ( $200 \mu mol/L$ ) 刺激 HUVEC4h 后。收集孔中培养液, 加入 1% TritonX-100 裂解细胞。按试剂盒说明操作, 450nm 处测吸光度值, 并计算细胞培养液和裂解液中 LDH 的活性。LDH 的释放率按以下公式计算: LDH 释放率 (%) =  $100\% \times$  培养液 LDH 活性 / (培养液 LDH 活性 + 细胞裂解液 LDH 活性)

[0077] 结果显示:  $H_2O_2$  刺激 HUVEC4h 后明显抑制细胞活性, 显著增加 LDH 的释放率 ( $P < 0.01$ )。不同浓度本发明药物组合物组分预孵 HUVEC6h、可明显减轻  $H_2O_2$  引起的细胞活性降低, 降低 LDH 释放率 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ), 结果见表 5。

[0078] 表 5 本发明药物组合物对  $H_2O_2$  损伤人 HUVEC 的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ )  $n = 9$

组别	浓度 (ug/mL)	A570	LDH 漏出率 (%)
对照组	—	$0.140 \pm 0.00$ 7**	$16.6 \pm 2.4$ **
模型组		$0.085 \pm 0.00$ 5	$38.5 \pm 4.8$
[0079] 本发明药物 组合物	50	$0.110 \pm 0.01$ 2**	$31.7 \pm 4.7$ *
	100	$0.098 \pm 0.00$ 9**	$29.5 \pm 3.5$ **
	200	$0.085 \pm 0.00$ 7	$26.6 \pm 3.9$ **
尼莫地平	0.02	$0.102 \pm 0.00$ 6**	$22.5 \pm 4.8$ **

[0080] 注：与模型相比：\*P < 0.05, \*\*P < 0.01

[0081] 试验结果表明：本发明药物组合物可显著改善拟血管性痴呆大鼠学习记忆能力，

改善其脑内生化指标的变化及病例组织学改变；体外实验表明本发明药物组合物对神经细胞拟缺血缺氧损伤就有良好的保护作用；机制分析显示，本发明药物组合物对于多种诱导剂诱导的豚鼠血小板聚集有明显抑制作用，对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 损伤具有良好的内皮保护作用。

[0082] 以上结果显示：本发明药物组合物体内外血管性痴呆模型动物具有良好保护作用，其机理可能通过改善脑缺血损伤后脑内生化代谢变化，保护脑血管内皮细胞，抑制脑血管意外后血小板聚集性的加强等因素有关，而且可能对神经细胞有直接保护作用。

### 具体实施方式

[0083] 下述实施例均能实现上述实验例的效果。

[0084] 实施例 1：天麻总苷提取方法

[0085] 取天麻药材予以粉碎，用 70% 乙醇回流提取三次，第一次 8 倍量提取 2 小时，第二次 7 倍量提取 1.5 小时，第三次 6 倍量提取 1 小时，滤液合并，减压回收乙醇，浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃)，加水稀释至密度为 1.05 左右，将溶液加于 1.7 倍药液量已处理好的 X-5 型大孔吸附树脂柱 (流速约 8mL/min)，先用树脂重量 10 倍 (V/W) 的水洗脱至洗脱液澄清，再 10 倍 (V/W) 的 70% 乙醇洗脱，收集 70% 乙醇洗脱液，回收乙醇、浓缩至干，得天麻总苷。

[0086] 实施例 2：钩藤总生物碱提取方法

[0087] 钩藤药材加饱和石灰水润湿，晾干，粉碎成粗粉，加 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次，每次回流 1 小时，合并提取液。减压回收乙醇，浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.09 的清膏 (80℃ 测)，用稀盐酸调 pH 至 2.0，滤过，收集滤液。滤液加到 2 倍已处理好的 001×7 型阳离子树脂柱上，用去离子水洗至流出液中性，再用乙醇洗至流出液无色。用含 0.5% 氨水的乙醇作为解吸附剂，洗脱至流出液无生物碱反应 (约 10 倍柱体积)，合并洗脱液，减压回收乙醇至无醇味，用三氯甲烷提取 3 次，每次 1/3 水液体积，合并三氯甲烷提取液，低温减压回收溶剂至干，得钩藤总生物碱。

[0088] 实施例 3：片剂

[0089] 天麻总苷 90g

[0090] 钩藤总生物碱 120g

[0091] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀，加入淀粉 490g，混匀，以 80% 乙醇制粒，干燥，压片，制成片剂 3500 片。

[0092] 实施例 4：胶囊剂

[0093] 天麻总苷 70g

[0094] 钩藤总生物碱 140g

[0095] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀，加入淀粉 490g，混匀，制成胶囊剂。

[0096] 实施例 5：丸剂

[0097] 天麻总苷 53g

[0098] 钩藤总生物碱 157g

[0099] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀，加入丸剂所用的常用辅料，采用常规方法制成丸剂。

[0100] 实施例 6 :颗粒剂

[0101] 天麻总苷 90g

[0102] 钩藤总生物碱 120g

[0103] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀,加入颗粒剂所用的常用辅料,采用常规方法制成颗粒剂。

[0104] 实施例 7 :口服液

[0105] 天麻总苷 90g

[0106] 钩藤总生物碱 120g

[0107] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀,加入口服液所用的常用辅料,采用常规方法制成口服液。

[0108] 实施例 8 :冻干粉针剂

[0109] 天麻总苷 90g

[0110] 钩藤总生物碱 120g

[0111] 取天麻总苷、钩藤总生物碱混匀,加入常规辅料,采用常规方法制成冻干粉针剂。