(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102811728 A
(43)申请公布日 2012.12.05

(21)申请号 201180013893.8

(22)申请日 2011.03.14

(30)优先权数据
687/CHE/2010 2010.03.15 IN

(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.09.14

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IN2011/000170 2011.03.14

(87)PCT申请的公布数据
WO2011/114350 EN 2011.09.22

(71)申请人 莱拉营养食品有限公司
地址 印度安得拉邦维查雅瓦达市莱比帕特宾达万聚居区 40-15-14

(72)发明人 冈加·拉吉·古卡拉吉
拉玛·拉吉·古卡拉吉
文卡塔·肯纳卡·兰加·拉吉·古卡拉吉
崔姆尔土卢·古兰扣提
吉兰·布帕蒂拉吉

(74)专利代理机构 广州弘邦专利商标事务所有限公司 44236
代理人 张钇斌

(51)Int.Cl.
A61K 36/324(2006.01)
A61K 36/9066(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A23L 1/29(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 2 页

(54)发明名称

用于提高大脑功能的乳香油、其分馏物及组合物

(57)摘要

本发明公开了选自来自于乳香属的树胶脂的乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)、乳香挥发性油分馏物(BVOIL)和乳香油分馏物(BOIL)及它们的组合物，用于改善记忆/心智状况、增强大脑/心智功能如识别、记忆、学习、沟通及大脑健康，用于治疗记忆缺损，及用于预防、控制或治疗记忆和识别相关障碍/疾病。

CN 102811728 A

1. 一种非酸性提取物 / 分馏物，选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）及来自于乳香属树胶脂的乳香油分馏物（BOIL），用于改善心智状况 / 大脑健康，提高大脑功能如认知、记忆、学习、沟通；用于治疗记忆障碍及用于预防、控制或治疗记忆和认知相关的障碍 / 疾病。

2. 包括至少一个选自乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物的组合物，该提取物 / 分馏物选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）及非酸性乳香油分馏物（BOIL）结合至少一个选自生物制剂、植物化学物质、维生素、氨基酸、矿物质、药学上地或饮食上可接受的赋形剂、辅料、载体及稀释剂或其混合物的组分，用于改善心智状况 / 大脑健康；提高大脑功能如认知、记忆、学习、沟通；用于治疗记忆障碍，及用于预防、控制或治疗记忆或认知相关的障碍 / 疾病。

3. 如权利要求 1 和 2 所要求的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物，其中所述乳香属选自齿叶乳香树、卡氏乳香树、乳香枸树、埃米尔乳香树、布拉塔乳香树、达热立乳香树、迪奥斯科里德乳香树、麦草乳香树、科普特乳香树、拉拉乳香树、野乳香树、欧伽登斯乳香树、皮罗塔乳香树、珀珀维拉乳香树、索比亚乳香树、神圣乳香树和索科特拉乳香树。

4. 根据权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物，以预防、控制和治疗记忆和认知相关的障碍 / 疾病，包括但不限于老年性痴呆、多发梗塞性痴呆症、阅读障碍、失语症、器质性脑综合征、重症肌无力、血管性痴呆、轻度认知功能障碍（MCI）、注意缺陷多动障碍（ADHD）、路易体痴呆症、韦尼克 - 科尔萨科夫综合征、阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、低氧、缺氧、脑血管功能不全、癫痫、肌阵挛和低胆碱能神经功能障碍、记忆缺陷障碍及神经退行性疾病。

5. 根据权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物，通过减缓记忆力衰退、功能损失，通过抑制 β - 淀粉样蛋白斑块沉积，通过控制血压和大脑的血液循环来改善心智状况 / 大脑健康。

6. 根据权利要求 2 的组合物，其中用于制备组合物的生物制剂包括一个或多个制剂，选自膳食添加剂、中草药成分、保健营养品、功能性成分、功能性食品和益智剂。

7. 根据权利要求 2 的组合物，其中生物制剂选自天然抗氧化剂、神经保护剂、抗炎剂和免疫调节剂。

8. 用于制备如权利要求 6 的组合物的生物制剂，其中中草药成分选自提取物、分馏物、标准化的提取物 / 分馏物或来自于植物的纯的植物化学物质或它们的混合物。

9. 用于制备如权利要求 2 的组合物的生物制剂是齿叶乳香树衍生的组分，选自包含乳香酸提取物或分馏物乳香酸、选择性富含一个或多个乳香酸的提取物或分馏物、纯的乳香酸化合物或它们的混合物。

10. 用于制备如权利要求 2 的组合物的生物制剂是齿叶乳香树提取物标定的滴定法分析的 30 - 100% 总乳香酸或高效液相色谱法分析的 20 - 100% 总乳香酸。

11. 用于制备如权利要求 2 的组合物的生物活性成分是姜黄衍生组分，选自提取物、分馏物、选择性地富含一个或多个姜黄素的提取物或分馏物、纯的姜黄素化合物或他们的混合。

12. 根据权利要求 6 的益智剂，选自：来自于假马齿苋、睡茄、余甘果、积雪草提取物、分馏物或植物化学物质；浓缩于一个或多个植物化学物质中的提取物 / 分馏物，包含但不限

于假马齿苋皂素 A3、假马齿苋皂苷 II 、假马齿苋皂苷 C 的同分异构体酸枣甙元、假马齿苋皂苷 C、假马齿苋皂素 I、苦艾素、芹菜素、木犀草素及谷甾醇 -D- 葡糖苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素、去甲基姜黄素、二去甲氧基姜黄素、四氢姜黄素、四氢去甲氧基姜黄素、四氢二去甲氧基姜黄素和芳姜黄酮、鼠尾草酸、迷迭香酸、茨酮、咖啡酸、乌索酸、桦木酸、迷迭香二酚、迷迭香酚及它们的盐。

13. 包含至少一个如权利要求 2 所述的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物的组合物，其中所述药学上或饮食上可接受的赋形剂、辅料、稀释剂和载体包括表面活性剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、防腐剂、稳定剂、缓冲液和悬浮液。

14. 根据权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物，其中所述提取物 / 分馏物或其组合物制作为口服试剂如片剂、软胶囊剂、硬胶囊剂、软凝胶胶囊剂、丸剂、颗粒剂、粉剂、乳剂、悬浮液、糖浆剂、微丸、食品、饮料、浓缩丸、滴剂及类似物 ；不经肠道试剂例如注射剂、静脉滴注及类似物 ；栓剂 ；经皮试剂如贴剂、外用药膏及凝胶 ；眼科用药及鼻腔剂。

15. 根据权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或它们的组合物，其中，所述提取物 / 分馏物或它们的组合物通过使用技术以控释剂型形式传递，包括 ：纳米技术、微胶囊、胶体载体系统和其他药物传送系统。

16. 根据权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或它们的组合物，其中所述提取物 / 分馏物或它们的组合物配制成或添加至现有的或新的食品和饮料以作为人的或温血动物的健康食品。

17. 改善大脑健康和大脑功能如认知、记忆、学习、沟通或给有需要的人或温血动物治疗记忆障碍的方法，其中所述方法包括向所述人或温血动物补充有效剂量的如权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物。

18. 预防、控制或治疗有需要的人或温血动物的记忆及认知相关障碍 / 疾病的方法，其中所述方法包括向所述人或温血动物补充有效剂量的如权利要求 1 和 2 的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物。

19. 如权利要求 18 要求的预防、控制或治疗记忆和认知相关障碍 / 疾病的方法，其中记忆和认知相关障碍 / 疾病包括但不限于老年性痴呆、多发梗塞性痴呆症、阅读障碍、失语症、器质性脑综合征、重症肌无力、血管性痴呆、轻度认知功能障碍（MCI）、注意缺陷多动障碍（ADHD）、路易体痴呆症、韦尼克 - 科尔萨科夫综合征、阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、低氧、缺氧、脑血管功能不全、癫痫、肌阵挛和低胆碱能功能障碍、记忆缺陷障碍及神经退行性疾病。

用于提高大脑功能的乳香油、其分馏物及组合物

[0001] 发明领域：

本发明提供了非酸性乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)、乳香挥发性油分馏物(BVOIL)和包含单独的 BLPRE 和 BVOIL 及它们的组合的乳香油分馏物(BOIL)与至少一种生物制剂或益智剂结合，用于预防、控制及治疗脑相关疾病，包括注意缺陷多动障碍(ADHD)及记忆障碍或提高大脑功能例如识别、记忆、学习及交流。更重要的是，本发明的上述分馏物及组合物有助于大脑健康。

[0002] 发明背景：

在印度的医学系统中，齿叶乳香树(橄榄科)的树胶脂一直被印度草医药的从业者用于某些疾病的治疗。在印度的医学系统中，齿叶乳香树(橄榄科)的树胶脂一直被印度草医药的从业者用于某些疾病的治疗。已发现乳香提取物作为强力的抗炎及抗关节炎制剂[Kimmatkar et al; *Phytomedicine*. 2003 10(1): 3-7]。乳香树胶脂及其提取物的抗炎作用归因于从齿叶乳香树的树胶脂中提取的称为乳香脂酸的三萜酸族。乳香脂酸通过抑制 5- 脂氧合酶(5-LOX)发挥抗炎作用。5-LOX 是从花生四烯酸生物合成白三烯的关建酶。3-O- 乙酞基 -11- 酮 -β- 乳香酸(AKBA)是其同类物中生物学上最有效的成分，它能抑制 5-LOX 的 IC_{50} 值为 1.5μM[Sailer, E. R., et. al., British J. Pharmacol., 1996: 117; p 615-618]。

[0003] 乳香树胶脂及其提取物在体外及体内的人类临床实验中也显示出对抗炎效果的显著的治疗改善。[E Ernest, BMJ, 2008; 337: a2813]。

[0004] 世界范围的人口老龄化增加了认知障碍的发生，例如年龄相关的记忆障碍及老年性痴呆，这使得受影响的人的生活受到巨大的破坏性影响。“胆碱能假说”在关于退行性疾病的药物开发中扮演了重要的角色。

[0005] 伴随胆碱乙酰化酶的减少(减少乙酰胆碱的合成)的皮质胆碱能系统的扰乱是在发生神经系统疾病时可特别探测到的生化现象。因此，需要一种药物，其活性物质能减轻这种扰乱并且在靶组织(大脑)是高度可用的，并且要具有很好的耐受性，特别是在长期治疗中。

[0006] 乙酰胆碱酯酶(AChE)是一种重要的将乙酰胆碱水解为胆碱和醋酸的酶，乙酰胆碱是一种介导副交感神经活动的神经递质。AChE 在内质网形成，并在细胞膜中活动和发挥作用。AchE 分布于胆碱能神经附近，特别是在神经肌肉节点处分布较多，并分布于血清、肝脏和其他组织。

[0007] 广泛的证据表明，乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制作用能通过加强皮质胆碱能的神经传递来改善认知功能和心理功能。乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂能增加乙酰胆碱的浓度并帮助神经细胞更好地通讯。乙酰胆碱停留在脑中的时间越长，这些细胞能唤起记忆的时间越长。最早知道的 AchE 抑制剂是毒扁豆碱及他克林。

[0008] 然而，临床研究表明，毒扁豆碱具有不良的口服活性、大脑渗透性及药代动力学参数，而他克林具有肝毒性的副作用。因此，研究集中于寻找克服这两种化合物的缺点的新类型的乙酰胆碱酯酶抑制剂。

[0009] 多奈哌齐和利伐司替明开辟了一类新的 AchE 抑制剂，其具有更长时间及更有选择性的可控的不良反应但对认知障碍的改善较小。加兰他敏（商品名利忆灵），从雪花莲中分离出的一种生物碱，是另一种最近批准的用于治疗阿尔茨海默氏症的 AChE 抑制剂。它是有选择性的、长效的、可逆的、对患者产生有益的影响。同样地，石杉碱甲，从中国药用植物蛇足石杉中发现的一种新的石松属生物碱，它是一种强效的、可逆的及选择性的在动物实验中具有快速吸收并深入大脑的 AChE 抑制剂。它在动物中及临床实验中显示出了记忆增强活性。

[0010] 路易体痴呆（DLB）是一种常见的痴呆原因。已经报道，在 DLB 病人的大脑中存在乙酰胆碱系统的变化，这为在 DLB 中进行乙酰胆碱酯酶抑制剂的试验提供了合理的基础。

[0011] 在对帕金森氏症的痴呆中的目前的治疗是基于深刻的类胆碱缺乏的补偿，如同最近胆碱酯酶抑制剂研究中的加兰他敏、多奈哌齐和卡巴拉汀。它也表明，胆碱酯酶抑制剂可以改善帕金森氏症中的运动功能 [Werber EA and Rabey JM, Journal of Neural Transmission; 108 (11): 1319-1325, 2001]。对患帕金森氏症和痴呆症的患者也进行了胆碱酯酶抑制剂的有益作用的研究 [Dag Aarsland, *J Geriatr Psychiatry Neurol*2004; 17; 164]。

[0012] 研究表明，韦尼克 - 科尔萨科夫综合征与长期的严重的顺行性遗忘症相关，其记忆不从短期向长期转换。它被认为是常发现于酗酒者中的硫胺素缺乏的结果。记忆障碍被归因于大量的脑损伤（乳状体和丘脑背内侧核），前脑胆碱能神经元及含五羟色胺的神经元 [Halliday G., et. al.; Alcohol Alcohol Suppl. 2 p. (245-51), 1994]。许多研究及病例报告启发了乙酰胆碱酯酶抑制剂对于与记忆障碍相关的韦尼克 - 科尔萨科夫综合征的效果。研究也表明，在基底核的神经元是处于硫胺素缺乏酒精的风险中 [K M Cullen et al., *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 1997;63:315 - 320]。

[0013] 美国专利 US5720975 中涉及一种香（乳香），香提取物，含有香的物质，其生理学上可接受的盐，其衍生物和其生理盐，纯乳香酸，其生理学上可接受的盐，其衍生物，其衍生物的盐，用于生产预防或治疗阿尔茨海默氏病的药物。

[0014] 美国专利申请公开 US20060177467A1 涉及乳香（乳香）的氢化产物的应用，其加氢成分及其生理学上可接受的盐及其衍生物，及用于生产预防和 / 或治疗脑缺血、颅 / 脑外伤和 / 或阿尔茨海默氏病的药物的氢化乳香提取物。

[0015] 然而，本发明人所知，现有技术还没有涉及到本发明包括的乳香非酸性油分馏物及其组合物用于预防、控制及治疗与疾病相关的记忆和识别以及提高大脑功能的使用。

[0016] 发明概述：

本发明主要公开了乳香非酸性分馏物的使用，其选自具有新型植物化学成分的乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）和分别包含 BLPRE 和 BVOIL 分馏物或包括它们的组合物的乳香油分馏物（BOIL），用于改善大脑健康及大脑功能，包括但不限于认知、记忆、智力、动机、注意力、专注力、学习能力和更好的沟通及减轻与认知和记忆障碍相关的疾病及类似疾病。

[0017] 本发明另一方面提供了乳香非酸性分馏物的使用，其选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）和分别包含 BLPRE 和 BVOIL 分馏物或包括它们的组合物的乳香油分馏物（BOIL），以用于预防、控制及治疗与大脑疾病 / 障碍，其包括但

不限于老年性痴呆、多发梗塞性痴呆症、阅读障碍、失语症、器质性脑综合征、重症肌无力、血管性痴呆、轻度认知功能障碍(MCI)、路易体痴呆症、韦尼克－科尔萨科夫综合征、阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、注意缺陷多动障碍(ADHD)、低氧、缺氧、脑血管功能不全、癫痫、肌阵挛和低胆碱能神经功能障碍，减缓记忆力衰退、功能丧失和治疗记忆障碍疾病、神经退行性疾病，并在大脑中控制血压和血液循环。

[0018] 在另一方面，本发明提供了组合物，包括至少一个选自乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)、乳香挥发性油分馏物(BVOIL)及由 BLPRE 及 BVOIL 组成的非酸性乳香油分馏物(BOIL)中的组分结合选自生物制剂、益智剂的至少一种成分。

[0019] 在另一方面，本发明提供了包括选自乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)、乳香挥发性油分馏物(BVOIL)及由 BLPRE 及 BVOIL 组成的非酸性乳香油分馏物(BOIL)中的至少一个组分与选自乳香提取物、分馏物、在一个或更多的乳香酸中浓缩的提取物／分馏物及其盐或衍生物中的的至少一种成分结合的组合物。

[0020] 在另一方面，本发明提供了包括选自乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)、乳香挥发性油分馏物(BVOIL)及非酸性乳香油分馏物(BOIL)中的至少一个组分与选自天然抗氧化剂、抗炎剂和免疫调节剂的一个或多个制剂结合的组合物。

[0021] 附图简述：

图 I：图中所示的结构式 1-9 是齿叶乳香树非极性树胶脂提取物(BsLPRE)的典型化合物。

[0022] 图 II：图中所示的 HPLC 色谱显示了齿叶乳香树非极性树胶脂提取物(BsLPRE)的植物化学情况。

[0023] 图 III：图 IIIA、IIIB 及 IIIC 的柱状图显示了在学习阶段分别得到的学习天数、发现饲料的潜伏期及错误进入的数目。柱 1-3 分别代表利用对照、BsLPRE (250 mg/kg)及吡拉西坦(150 mg/kg)的处理。每个柱代表平均值 ± SE，n=8，* 代表 $p < 0.05$ 及代表 ** $p < 0.01$。

[0024] 图 IV：图 IVA 和 IVB 的柱状图显示了在记忆保持阶段分别得到的发现饲料的潜伏期及错误进入的数目。柱 1-3 分别代表利用对照、BsLPRE (250 mg/kg)及吡拉西坦(150 mg/kg)的处理。每个柱代表平均值 ± SE，n=8。

[0025] 发明详述：

1、本文中使用的“乳香油”或“非酸性乳香提取物”或“BOIL”代表包含从任何乳香属的树胶脂得到的非酸性乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)及乳香挥发性油分馏物(BVOIL)的非酸性乳香树胶脂提取物。

[0026] 2、本文中使用的“齿叶乳香树油”或“非酸性齿叶乳香树提取物”或“BsOIL”代表从齿叶乳香树的树胶脂得到的包括非酸性齿叶乳香树低极性树胶脂提取分馏物(BsLPRE)的及齿叶乳香树挥发性油分馏物(BsVOIL)非酸性齿叶乳香树树胶脂提取物。

[0027] 3、本文中使用的“卡氏乳香树油”或“非酸性卡氏乳香树提取物”或“BcOIL”代表包含从任何卡氏乳香树种的树胶脂得到的非酸性卡氏乳香树低极性树胶脂提取分馏物(BcLPRE)及卡氏乳香树挥发性油分馏物(BcVOIL)的非酸性卡氏乳香树胶脂提取物。

[0028] 4、本文中使用的“乳香低极性树胶脂提取分馏物”或“乳香低极性树胶脂提取物”或“BLPRE”代表非酸性乳香树胶脂抽提油分馏物，包括从乳香油中移除了挥发性组分后得

到的倍半萜烯、二萜、三萜类及其他的油性植物化学物质，所述乳香油是从任何乳香属的树胶脂中通过所描述的任何方法得到。

[0029] 5、本文中使用的“齿叶乳香树油低极性树胶脂提取分馏物”或“齿叶乳香树低极性树胶脂提取物”或“BsLPRE”代表非酸性齿叶乳香树树胶脂抽提油分馏物，包括从乳香油中移除了挥发性组分后得到的倍半萜烯、二萜、三萜类及其他的油性植物化学物质，所述乳香油是从齿叶乳香树的树胶脂中通过所描述的任何方法得到。

[0030] 6、本文中使用的“卡氏乳香树低极性树胶脂提取分馏物”或“卡氏乳香树低极性树胶脂提取物”或“BcLPRE”代表非酸性卡氏乳香树树胶脂抽提油分馏物，包括从卡氏乳香树油中移除了挥发性组分后得到的倍半萜烯、二萜、三萜类及其他的油性植物化学物质，所述卡氏乳香树油是从卡氏乳香树种的树胶脂中通过所描述的任何方法得到。

[0031] 7、本文中使用的“乳香挥发性油分馏物”或“乳香挥发性油”或“挥发性油”或“挥发性分馏物或“BVOIL”代表挥发性分馏物 / 提取物，包括通过任意所述的方法从任何乳香属中的树胶脂得到的单烯、二萜、挥发性油及其他的油性植物化学物质。

[0032] 8、本文中使用的“齿叶乳香树挥发性油分馏物”或“齿叶乳香树挥发性油”或“齿叶挥发性油”或“齿叶挥发性分馏物或“BsVOIL”代表挥发性分馏物 / 提取物，包括通过任意所述的方法从齿叶乳香树的树胶脂得到的单烯、二萜、挥发性油及其他的油性植物化学物质。

[0033] 9、本文中使用的“卡氏乳香树挥发性油分馏物”或“卡氏乳香树挥发性油”或“卡氏挥发性油”或“卡氏挥发性分馏物或“BcVOIL”代表挥发性分馏物 / 提取物，包括通过任意所述的方法从任何卡氏乳香树的树胶脂得到的单烯、二萜、挥发性油及其他的油性植物化学物质。

[0034] 10、本文中使用的“树胶”或“树胶脂”或“树脂”代表乳香植物物种的分泌物。

[0035] 11、本文中使用的“植物化学成分”代表从植物中分离的纯的或半纯的化合物。

[0036] 12、认知是指信息的获得、处理和保留。

[0037] 13、认知增强剂是指增强专注力和记忆力的物质。

[0038] 14、益智剂是指声称能提高心智功能如认知、记忆、智力、动机、注意力和专注力的促智药、记忆增强剂和认知增强剂、膳食添加剂、保健营养品、功能性成分和功能性食品。

[0039] 15、生物制剂是指选自从植物 / 动物 / 微生物 / 合成或半合成获得的生物活性成分、抗氧化剂、膳食补充剂、中草药成分、保健营养品、功能性成分、功能性食品、益智剂及油及其混合物的一种或多种制剂。

[0040] 16、“生物活性成分”是指任何药学上或饮食上可接受的活性成分 ；来自于植物、动物或微生物的或通过化学合成 / 半合成方法得到的化合物、抽提物、分馏物、植物化学物、合成物，或它们的盐或它们的混合物。

[0041] 17、“功能性成分”是指来自于植物或动物或微生物或化学合成或半合成的任何中草药成分、膳食补充剂、抗氧化剂、维生素、矿物质、氨基酸、脂肪酸、精油、鱼油、酶、葡萄糖胺、软骨素和益生菌或它们的盐或它们的混合物。

[0042] 从古代开始乳香的树胶脂就已经得到了非常广泛的应用。各种乳香属例如齿叶乳香树、卡氏乳香树或乳香枸树的树胶脂是包括乳香油分馏物（BOIL）、乳香酸、糖类及多糖成分的复杂混合物，其中乳香油分馏物（BOIL）包括精油 / 乳香挥发油分馏物（BVOIL）及非酸性乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）。在国际市场上广泛使用的齿叶乳香树 / 卡氏乳

香树 / 乳香枸树提取物是从树胶脂分离出的酸性分馏物，该分馏物是通过滴定分析法标定的包含 65% 或 85% 的总乳香酸。在对来自于齿叶乳香树 / 卡氏乳香树 / 乳香枸树的常规乳香提取物（85% 总乳香酸）实行商业化过程中，主要包括含乳香酸的三萜酸的酸分馏物是分离自树胶脂的剩余部分。在总乳香酸浓缩过程中，糖及其他的聚合物分离出来进入水相。剩下的水不溶低极性化合物被分离出来成为乳香油分馏物 / 提取物。这些低极性的化合物不存在或以极低浓度低存在于这两者中，商业乳香提取物标定的乳香酸，乳香提取物选择性地浓缩于 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 -β- 乳香酸（AKBA）中。

[0043] 获得非酸性乳香油（BOIL）分馏物的过程：

获得乳香油的一个典型过程包括：a）获取一种或多种植物的树胶脂，所述植物选自但不限于齿叶乳香树或卡氏乳香树或 / 乳香枸树或它们的混合物，b）利用水不溶性有机溶剂萃取树胶脂，c）仔细过滤提取物以移除不溶性的树脂材料，d）利用碱水溶液如氢氧化钾水溶液反复洗涤有机溶剂提取物，

e）利用水和盐水洗涤有机层，f）在真空和高温下蒸发有机层，以得到的油状残留物（BOIL）。

[0044] 获得乳香挥发性油（BVOIL）分馏物的过程：

获得乳香挥发性油（BVOIL）的过程是从乳香树胶脂中通过蒸汽蒸馏或利用高度真空。

[0045] 获得乳香挥发性油的（BVOIL）一典型过程包括：a）获取乳香的树胶脂，及

b）从所述树胶脂中或通过蒸汽蒸馏或在高度真空、低温下蒸馏来分离出挥发性油组份，以得到 BVOIL。

[0046] 在另一个可替换过程中，

a）BOIL 通过上述方法制备，

b）然后将 BOIL 蒸汽蒸馏或真空蒸馏以收集乳香挥发性油（BVOIL）

获得乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）分馏物的过程：

获得乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的一典型过程包括：

a）利用水不溶性有机溶剂萃取乳香树属的树胶脂，然后仔细过滤提取物以移除不溶性的树脂材料，b）利用碱水溶液如氢氧化钾水溶液反复洗涤有机溶剂提取物，

c）利用水和盐水洗涤碱洗后得到的有机层，d）在真空和高温下蒸发所述有机层以得到的油状残留物，

e）在高度真空和极高温度下从所述油状残留物中除去挥发性化合物以得到 BLPRE。

[0047] 获得乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的另一典型过程包括：

a）制备乳香树胶脂的乙醇或氢化乙醇提取物，

b）在碱水溶液与水不溶性有机溶剂之间分离出乙醇提取物，

c）分离有机溶剂层，然后蒸发溶剂以得到油状残留物，

d）在高温和高度真空下从所述油状残留物中除去挥发性化合物以得到 BLPRE。

[0048] 还有另一个获得乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的典型过程包括：

a）利用乙醇或氢化乙醇抽提乳香属的树胶脂，

b）蒸发有机溶剂至总固体物的最佳水平，然后

c）调整 PH 值为碱性，优选的为 PH9-12，

d）利用有机溶剂重复提取溶液，

e）在真空机高温下蒸发有机溶剂以得到油状残留物，

f）在高度真空和高温下从所述油状残留物中蒸发挥发性化合物以得到 BLPRE。

[0049] 获得齿叶乳香树挥发性油（BsVOIL）的一典型过程包括：a）获取齿叶乳香树的树胶脂。

[0050] b）从所述树胶脂中或通过蒸汽蒸馏或在高度真空、低温下蒸馏来分离出挥发性油组份，以得到 BsVOIL。

[0051] 另一个获得卡氏乳香树挥发性油（BcVOIL）的典型过程包括：a）获取卡氏乳香树的树胶脂。

[0052] b）从所述树胶脂中或通过蒸汽蒸馏或在高度真空、低温下蒸馏来分离出挥发性油组份，以得到 BcVOIL。

[0053] 从齿叶乳香树、卡氏乳香树获得乳香挥发性油（BVOIL）的典型方法如上所述。然而，可使用相似的方法或过程来从乳香树属中获得的任何树胶脂以用于制作乳香挥发性油（BVOIL）。

[0054] 获得齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）的典型过程：

a）获取齿叶乳香树的树胶脂。

[0055] b）利用水不溶性有机溶剂萃取，然后通过过滤分离出不溶性的树胶材料并丢弃，

c）利用稀释的碱水溶液反复洗涤有机溶剂提取物以除去酸性化合物，

d)相继用水和盐水洗涤有机层，e)在真空和 60 - 70° C 下蒸发有机层以得到油状残留物，

f）在高度真空和极高温度下从所述油状残留物中除去挥发性组分以得到粘性油，即为本文中的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）。

[0056] 可替换地，BsLPRE 也可通过以下过程制备：

a）制备齿叶乳香树树胶脂的乙醇或氢化乙醇提取物，

b) 在碱水溶液与水不溶性有机溶剂之间分离出乙醇提取物，

c）分离有机溶剂层，然后在真空及 60 - 70° C 下蒸发有机层以得到油状残留物，

d）在高度真空和高温下从所述油状残留物中除去挥发性组分以得到粘性油，即为本文中的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）。

[0057] 获得卡氏乳香树低极性树胶脂提取物（BcLPRE）的另一典型过程包括：

a）获取卡氏乳香树的树胶脂，

b）利用水不溶性有机溶剂萃取树胶脂，然后通过过滤分离出不溶性的树胶材料并丢弃，

c）利用稀释的碱水溶液反复洗涤有机溶剂提取物以除去酸性化合物，

d)相继用水和盐水洗涤有机层，e)在真空和 60 - 70° C 下蒸发有机层以得到油状残留物。

[0058] f）在高度真空和高温下从所述油状残留物中除去挥发性组分以得到粘性油，即为本文中的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物（BcLPRE）。

[0059] 可替换地，BcLPRE 也可通过以下过程制备：

a）制备卡氏乳香树树胶脂的乙醇或氢化乙醇提取物，

b) 在碱水溶液与水不溶性有机溶剂之间分离出乙醇提取物，

c）分离有机溶剂层，然后在真空及 60 - 70° C 下蒸发有机层以得到油状残留物，

d）在高度真空和高温下从所述油状残留物中除去挥发性组分以得到粘性油，即为本文中的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物（BcLPRE）。

[0060] 从齿叶乳香树、卡氏乳香树中获得乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的典型方法如上所述。然而，可使用相似的方法或过程来从乳香树属中获得的任何树胶脂以用于制作乳香低极性树胶脂提取物。

[0061] 所述原本的乳香油（BOIL）或乳香挥发油（BVOIL）或乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）构成了乳香树胶脂的主要成分。然而，它具有有限的商业用途，并且它常常作为废料丢弃。这些分馏物的潜在用途迟迟未被发现。发明者意外地发现从齿叶乳香树油中除去挥发性化合物后得到的分馏物即齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）具有一些有益的性质。

[0062] 在我们之前于 2008 年 9 月 15 日提交的印度专利申请 2229/CHE/2008 及 2009 年 9 月 14 日提交的 PCT 申请 PCT/IN2009/000505 中，我们公开了包含 AKBA 浓缩分馏物及齿叶乳香树非酸性提取物（BNRE）的协同作用组合物。BNRE 组合物及其识别方法也已经一并公开。

[0063] 在我们最近于 2010 年 2 月 15 日提交的印度专利申请 394/CHE/2010 中，我们公开了非乳香酸分馏物及其协同作用组合物。

[0064] 作为开发用于增强大脑 / 心智功能及缓解与识别和记忆障碍相关的疾病的新制剂的一部分，发明者对大量植物提取物，其对乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用，进行了筛选。利用碘代硫代乙酰胆碱作为基底，经细微修改，利用 Ellman 等的方法在体外进行了试验（Lee J. H., et. al. *Arch Pharm Res* 2004, 27(1): 53-56）。意外地发现，非酸性提取物、齿叶乳香树油（BsOIL）、齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）馏分及齿叶乳香树挥发性油（BsVOIL）馏分在体外都是乙酰胆碱酯酶的强效抑制剂。如表 2 所示为 BsLPRE 作为范例强效抑制乙酰胆碱酯酶活性。其在体外对乙酰胆碱酯酶的抑制效果可与商业药物新斯的明相媲美。与 IC50 值为 43.29 ng/mL 的新斯的明相比，BsLPRE 的 IC50 值为 37.01 ng/mL。在大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞中，其乙酰胆碱酯酶抑制活性也通过基于细胞的体外试验进行了测算。在 β - 淀粉样肽诱导的大鼠嗜铬细胞瘤 PC 12 细胞中对 BsLPRE 对酶活性的抑制能力进行了估算。大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞均匀地分布于无酚红的杜尔贝科改良的伊格尔氏红培养基中（DMEM）（Sigma 生命科学，美国），在 24 孔板中，包含 10% 的小牛血清（FBS）。分别用 BLPRE 及阳性对照新斯的明对细胞进行预处理 1h。然后，在 37 ℃利用 1 μg/mL β - 淀粉样多肽（加州生化公司，美国）对细胞进行诱导 24h。24 小时后，收集细胞然后用 1* PBS 洗两次，在 4℃、1200 rpm 离心 5 分钟。在溶解缓冲液中制备得到细胞提取物，细胞溶解产物用于分析乙酰胆碱酯酶（AChE）活性。BsLPRE 在 100ng/mL 的浓度下显示出 25.3% 的抑制率，新斯的明在 20 ng/mL 浓度下显示出 49.1% 的抑制率，以上都在表 4 中总结出。

[0065] 为了解 BsLPRE 的化学成分，发明者反复利用柱色谱法及高效液相色谱（HPLC）对 BsLPRE 进行了大量的分离，并分离出一些二萜类和三萜类化合物。这些化合物的结构可利用 1H NMR, 13C NMR, DEPT, HSQC 及 HMBC、质谱数据进行准确地鉴定。如图 I 所示，获得的化合物经鉴定为愈创奥醇（guiol）(1)、西松烷酚醇

(nephthenol) (2)、锯缘青蟹醇(serratol) (3)、二萜 X (diterpene X) (4)、羽扇豆醇(lupeol) (5)、齐墩果-12-烯-3β-醇(olean-12-ene-3β-ol) (6)、齐墩果-12-烯-3α-醇(olean-12-ene-3α-ol) (7)、羊毛甾-8,24-二烯-3α-醇(lanosta-8,24-diene-3α-ol) (8)和乌苏-12-烯-3α-醇(urs-12-ene-3α-ol) (9)。这些选自 1-9 的三个或更多的植物化学标记化合物可标定齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)。获得的典型结果总结在表 1 中,图 II 所示为 BsLPRE 的典型色谱图。然而,发明者还发现,从任何其他树种获得的 BsLPRE 或任何其他的乳香低极性树胶脂提取物组合物(BLPRE)可能基于某一些因素而变化,如所使用的乳香树树种、植物的年龄、收集树胶脂的季节、地理位置及所应用的制作过程。

[0066] 上述结果表明,BsLPRE 是一种包括倍半萜、二萜、三萜和其他植物化学成分的新型组合物。并不知道初定为双萜 X (4) 和化合物愈创奥醇(guiol) (1)、西松烷酚醇(nephthenol) (2)、羊毛甾-8,24-二烯-3α-醇 (lanosta-8, 24-diene-3α-ol) (8)的化合物是齿叶乳香树树胶脂的代谢物。

[0067] 其他乳香树种的低极性树胶脂提取物包括与齿叶乳香树的低极性树胶脂提取物具有相似性质的组合物。然而,卡氏乳香树的低极性树胶脂提取物(BcLPRE)在体外和体内的研究中已经显示出了与 BsLPRE 相似的生物活性及协同作用。这些实验研究将在实施例中讨论。

[0068] 在基于两个酶的分析及基于细胞的分析中都测定了不同乳香酸的乙酰胆碱酯酶抑制率,抑制活性总结在表 3 及表 5 中。

[0069] 氧化应激诱导的增强的 ROS 对于神经元损伤是非常关键的,这是一个关于大脑健康的严重并发症。有趣地,在 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞中,齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)对活性氧(ROS)的产生显示了有效的抑制性(表 6)。另外,BsLPRE 还显示出了对人神经母细胞瘤细胞的氧化应激诱导的细胞毒性损害的保护作用。在基于细胞的分析中,H2O2 诱导的氧化应激对 IMR32 人神经母细胞瘤细胞的增殖表现出了强烈的细胞毒性效应。然而,BsLPRE 的处理将 IMR32 人神经母细胞瘤细胞的增殖系数显著地降低至正常水平(表 7)。因此,结果表明,低极性树胶脂提取物(BLPRE)对神经元损伤提供了保护并且帮助改善大脑健康。

[0070] BsLPRE 在体内对改善学习及记忆的功效已经在大鼠中通过高架放射臂迷宫(RAM)方法证实。在高架 RAM 模型中,口服给予 BsLPRE (250 mg/kg)显著地(P< 0.01)减少了在所设置条件下大鼠需要学习的天数, 并且显著地(P< 0.05)降低了学习后的大鼠找到食物所需要的时间。阳性对照吡拉西坦(150 mg/kg)也显示出了显著的空间学习的提高,如降低了延迟期及错误进入的数目,当与对照组相比时,结果如下所示(图 IIIA 至 IIIC)。试验物 BsLPRE 还显著提高了识别及记忆保持(图 IVA 及 IVB)。这些结果都证实了 BsLPRE 在体外的效果并表明 BsLPRE 的使用提高空间学习及记忆保持。通过这些发现,BsLPRE 是一种有前景的促进学习及记忆的制剂。

[0071] 包含乳香提取物的协同组合物 :

发明人在广泛分析了乳香提取物标定的乳香酸及齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)、以及其他的中草药提取物的基础上,在体外进行了一些基于细胞的和基于酶的抗乙酰胆碱酯酶的研究。将单独的这些提取物以及这些提取物的不同组合都用于测试抑制

乙酰胆碱酯酶的功效。意外发现，包含齿叶乳香树提取物标定的 85% 的总乳香酸（BSE85%）及齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）的组合物（组合物 -1）显示出对乙酰胆碱酯酶（AChE）强烈的抑制性。

[0072] 因此，上述情况表明，BOIL、BVOIL 和 BLPRE 单独及与乳香酸 / 包括乳香酸或分馏物标定的乳香酸的乳香提取物或分馏物 / 一个或多个益智剂都是有效的乙酰胆碱酯酶抑制剂，并可用作预防、控制和治疗认知障碍及提高记忆力和缓解与认知和记忆障碍相关的病情。

[0073] 纯乳香酸和市售的齿叶乳香树提取物标定的 85% 乳香酸已经用于证实本发明。然而，任何齿叶乳香树通过滴定分析法标定的 40％ -100％的总乳香酸及通过 HPLC 分析法标定的 30%-100% 总乳香酸也均可使用。

[0074] 同样，包含低极性树胶脂提取物（BLPRE）结合 a- 倒捻子素的组合物（组合物 -34）对神经元损伤提供了更好的保护（表 6）并因此可以改善大脑的健康。此外，组合物 -34 在基于细胞的分析中对人类神经母细胞瘤细胞的氧化应激诱导的细胞毒性损害显示了更好的保护作用（表 7）。此结果进一步证实，包含 BsLPRE 的组合物在提高大脑健康方面的潜在作用。

[0075] 本发明的不同的实施例如下面概述 ：

主要方面，本发明提供了非酸性乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）分馏物、乳香挥发性油（BVOIL）分馏物及包含 BLPRE 及 BVOIL 的乳香油分馏物（BOIL），用于改善心智状况 / 大脑健康、治疗记忆障碍及缓解记忆和认知相关的疾病和温血动物中的其他相关疾病。

[0076] 另一主要方面，本发明提供了组合物，其包括至少一个选自乳香油（BOIL）、乳香挥发性油（BVOIL）及乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的分馏物并结合一个或多个生物制剂或益智剂，用于改善心智状况 / 大脑健康、治疗记忆障碍及缓解记忆和认知相关的疾病和温血动物中的其他相关疾病。

[0077] 在另一个实施例中，本发明提供了组合物，包括至少一个选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）及非酸性乳香油分馏物（BOIL）的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物结合至少一个选自生物制剂、植物化学物质、维生素、氨基酸、矿物质、药学上地或饮食上可接受的赋形剂、辅料、载体及稀释剂或其混合物的组分，用于改善心智状况 / 大脑健康，提高大脑功能如认知、记忆、学习、沟通，用于治疗记忆障碍，及用于预防、控制或治疗记忆或认知相关的障碍 / 疾病。

[0078] 在另一实施例中，本发明提供了改善大脑健康及大脑功能如认知、记忆、学习、沟通或治疗有需要的人或温血动物的记忆障碍的方法，其中所述方法包括向人或温血动物提供有效剂量的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物。

[0079] 在另一个实施例中，本发明提供了在有需要的人或温血动物中预防、控制或治疗记忆和认知相关的障碍 / 疾病的方法，其中，所述方法包括给所述人或温血动物提供有效剂量的乳香衍生的非酸性提取物 / 分馏物或其组合物。

[0080] 在另一个实施例中，本发明提供了预防、控制或治疗记忆和认知相关的障碍 / 疾病的方法，其中记忆和认知相关的障碍 / 疾病包括但不限于老年性痴呆、多发梗塞性痴呆症、阅读障碍、失语症、器质性脑综合征、重症肌无力、血管性痴呆、轻度认知功能障碍（MCI）、注意缺陷多动障碍（ADHD）、路易体痴呆症、韦尼克 - 科尔萨科夫综合征、阿尔茨海默

氏症、帕金森氏症、低氧、缺氧、脑血管功能不全、癫痫、肌阵挛和低胆碱能神经功能障碍、记忆缺陷障碍及神经退行性疾病。

[0081] 在另一方面，本发明提供了乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）分馏物、乳香挥发性油（BVOIL）分馏物和分别包含 BLPRE 和 BVOIL 或它们的组合物的乳香油（BOIL）分馏物，用于预防、控制及治疗大脑相关疾病包括注意缺陷多动障碍（ADHD）及记忆障碍或用于提高大脑功能如认知、记忆、学习及沟通。重要地，本发明所述的分馏物及组合物有助于大脑健康。

[0082] 在另一方面，本发明提供了组合物，包含选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）、非酸性乳香油分馏物（BOIL）的至少一个组分结合至少一个药学上 / 饮食上可接受的赋形剂 / 稀释剂，进一步可选地包括选自天然抗氧化剂、抗炎剂及免疫调节剂的一个或多个制剂。

[0083] 在另一个实施例中，本发明提供了组合物，包括至少一个乳香衍生非酸性提取物 / 分馏物结合至少一个药学上 / 饮食上可接受的赋形剂 / 稀释剂，其中所述药学上或饮食上可接受的赋形剂、辅料、载体及稀释剂包括但不限于葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、黄糊精、白糊精、二氧化硅、微晶纤维素粉末、硬脂酸钙、硬脂酸镁、山梨糖醇、甜菊苷、玉米糖浆、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、L- 抗坏血酸、dl-α - 生育酚、甘油、丙二醇、甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、山梨醇酐脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯、阿拉伯胶、卡拉胶、酪蛋白、明胶、果胶、琼脂、烟酰胺、泛酸钙、钙盐、色素、香精、防腐剂、蒸馏水、盐水、含水葡萄糖溶液、乙醇、丙二醇和聚乙二醇、各种动物油和植物油、白软石蜡、石蜡和蜡。

[0084] 在另一方面，本发明提供了乳香非酸性提取物 / 分馏物，其选自乳香低极性树胶脂提取分馏物（BLPRE）、乳香挥发性油分馏物（BVOIL）及非酸性乳香油分馏物（BOIL）及其组合物，用于预防、控制或治疗大脑相关疾病 / 障碍，其包括但不限于老年性痴呆、多发梗塞性痴呆症、阅读障碍、失语症、器质性脑综合征、重症肌无力、血管性痴呆、轻度认知功能障碍（MCI）、路易体痴呆症、韦尼克 - 科尔萨科夫综合征、阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、注意缺陷多动障碍（ADHD）、低氧、缺氧、脑血管功能不全、癫痫、肌阵挛和低胆碱能神经功能障碍、记忆缺陷障碍及神经退行性疾病。

[0085] 在另一个方面，本发明提供了乳香衍生非酸性提取物 / 分馏物或其组合物用于通过减缓记忆力衰退、功能损失、通过抑制 β - 淀粉样蛋白斑块沉积、通过控制血压和大脑的血液循环来改善心智状况 / 大脑健康。

[0086] 在另一方面，用于制备所述组合物的益智剂包括一个或多个选自能提高心智功能如认知、记忆、智力、动机、注意力和专注力的促智药、记忆增强剂和认知增强剂、膳食添加剂、中草药成分、保健营养品、功能性成分和功能性食品的制剂。

[0087] 在另一方面，益智剂选自一个或多个来自于中草药的提取物 / 分馏物的组分，中草药包括但不限于假马齿苋品种、姜黄种或迷迭香属。

[0088] 在另一方面，用于制备组合物的中草药成分选自包括但不限于齿叶乳香树、卡氏乳香树、假马齿苋、姜黄、睡茄、迷迭香、莽吉柿、倒捻子素、番荔枝及绒毛戴星草。

[0089] 本发明的另一方面，益智剂可选自提取物 / 分馏物 / 植物化学物质，浓缩于一个或多个植物化学物中的提取物 / 分馏物，包含但不限于假马齿苋、睡茄、余甘果、积雪草；浓缩于一个或多个植物化学物质中的提取物 / 分馏物，包含但不限于假马齿苋皂素 A3、假马齿苋皂苷 II 、酸枣甙元、假马齿苋皂苷 C、假马齿苋皂素 I、苦艾素、芹菜素、木犀草素及谷甾

醇 -D- 葡糖苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素、去甲基姜黄素、二去甲氧基姜黄素、四氢姜黄素、四氢去甲氧基姜黄素、四氢二去甲氧基姜黄素、芳姜黄酮、鼠尾草酸、迷迭香酸、荻酮、咖啡酸、乌索酸、桦木酸、迷迭香二酚、迷迭香酚及它们的盐。

[0090] 在另一方面，本发明提供组合物用于改善记忆、记忆障碍及缓解记忆和认知障碍相关的疾病和其他相关疾病，该组合物包括有疗效的乳香油（BOIL/ 乳香挥发性油 BVOIL）/ 乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）结合至少一个乳香衍生组分，该组分选自富含一个或多个乳香酸 / 纯乳香酸化合物的提取物、分馏物或益智剂。

[0091] 在另一方面，本发明提供了通过一个或多个生物作用达到提高认知能力的组合物，生物作用包括抑制乙酰胆碱酯酶、增加丁酰胆碱酯酶及抑制 β - 淀粉样蛋白沉积。

[0092] 在另一个方面，本发明进一步提供了用于改善记忆、记忆障碍及缓解记忆和认知的相关疾病和其它相关疾病的组合物，包括乳香油（BOIL）/ 乳香挥发油（BVOIL）/ 乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）及至少一个来自于乳香属的树胶脂的组分，该组分包括但不限于 α - 乳香酸、β - 乳香酸、3-O- 乙酰基 - α - 乳香酸、3-O- 乙酰基 - β - 乳香酸、3-O- 乙酰基 -11- 酮基 - α - 乳香酸和 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 - β - 乳香酸或它们的混合物。

[0093] 在另一重要方面，本发明进一步提供用于增强记忆、改善记忆障碍及缓解记忆和认知的相关疾病和其它相关疾病的组合物，包括齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BLPRE）或 BsVOIL 或 BsOIL 及至少一个乳香衍生组分，选自浓缩于或标定于来自于乳香树胶脂的一个或多个化合物的提取物或分馏物，包括但不限于 α - 乳香酸、β - 乳香酸、3 - 乙酰基 - α - 乳香酸、3- 乙酰基 - β - 乳香酸、3- 乙酰基 -11- 酮基 - α - 乳香酸和 3- 乙酰基 -11- 酮基 - β - 乳香酸及它们的混合物。

[0094] 在另一方面，本发明进一步提供了组合物，包括齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BLPRE）或 BsVOIL 或 BsOIL 及齿叶乳香树提取物标定的通过滴定法分析的 30 - 100 % 总乳香酸或通过 HPLC 分析法分析的 20-100% 总乳香酸。

[0095] 在更优选方面，本发明进一步提供了组合物，包括齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BLPRE）或 BsVOIL 或 BsOIL 及齿叶乳香树提取物标定的通过滴定法分析的 85% 总乳香酸或通过滴定法分析的 65% 总乳香酸。

[0096] 在另一更优选方面，本发明进一步提供了组合物，包括齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BLPRE）或 BsVOIL 或 BsOIL 及可选地浓缩于 AKBA 中的齿叶乳香树提取物，其浓度通过 HPLC 分析法分析在 3-99% 之间变化。

[0097] 在其它优选的实施例中，本发明进一步提供了一种用于制备乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）的方法，其包括利用不溶于水的有机溶剂提取乳香树胶脂，然后利用碱水溶液如氢氧化钾水溶液洗涤有机溶剂提取物，然后利用水及盐水洗涤，最后蒸发有机层以获得油，然后在高度真空及高温下除去挥发性化合物以获得 BLPRE。不溶于水的有机溶剂可选于己烷、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲基异丁基酮，或任何其他的不溶于水的溶剂或其混合物。

[0098] 齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）的制备方法是可变和可替换的，如实施例包括，利用乙醇或氢化乙醇提取树胶脂，然后蒸发有机溶剂至总固体的最适浓度然后调整溶液 PH 至 9-11，然后利用低极性有机溶剂反复提取溶液，然后蒸发有机溶剂，然后在真空高温下除去挥发物以得到 BsLPRE。

[0099] 在进一步的实施例中，齿叶乳香树原油可代替 BsLPRE 用于增强记忆、记忆障碍及缓解记忆和认知相关疾病并用于制备本发明的组合物。

[0100] 在上述方法中的不溶于水的有机溶剂可选自但不限于己烷、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲基异丁基酮、叔丁醇或其他任何与水不混溶的溶剂。

[0101] 齿叶乳香树提取物标定的通过滴定法分析的 30 - 100 % 总乳香酸或通过 HPLC 分析方法分析的 20 - 100 % 总乳香酸可从树胶脂从利用已知的步骤制备或从一组市售的齿叶乳香树提取物标定的乳香酸中得到。

[0102] 在本发明的另一方面，用于证明本发明的非酸性提取物乳香油（BOIL）、乳香挥发性油（BOIL）、乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）可从乳香属获得，乳香属选自齿叶乳香树（*Boswellia serrata*）、卡氏乳香树（*Boswellia carterii*）、乳香枸树（*Boswellia papyrifera*）、埃米尔乳香树（*Boswellia ameero*）、布拉塔乳香树（*Boswellia bullata*）、达热立乳香树（*Boswellia dalzielii*）、迪奥斯科里德乳香树（*Boswellia dioscorides*）、麦草乳香树（*Boswellia elongata*）、科普特乳香树（*Boswellia frereana*）、拉拉乳香树（*Boswellia nana*）、野乳香树（*Boswellia neglecta*）、欧伽登斯乳香树（*Boswellia ogadensis*）、皮罗塔乳香树（*Boswellia pirottae*）、珀珀维拉乳香树（*Boswellia popoviana*）、索比亚乳香树（*Boswellia rivae*）、神圣乳香树（*Boswellia sacra*）和索科特拉乳香树（*Boswellia socotrana*）。

[0103] 在本发明的另一方面，可用于制备本发明组合物的姜黄属选自姜黄（*Curcuma longa*）、郁金（*Curcuma aromatica*）、家郁金（*Curcuma domestica*）、莪术（*Curcuma aeruginosa*）、川郁金（*Curcuma albicoma*）、阿比伏娄爱姜黄（*Curcuma albiflora*）、姜荷花（*Curcuma alismatifolia*）、温郁金（*Curcuma angustifolia*）、大莪术（*Curcuma elata*）、锈色莪术（*Curcuma ferruginea*）、黄花姜黄（*Curcuma flaviflora*）、顶花莪术（*Curcuma yunnanensis*）及莪术（*Curcuma zedoaria*）。

[0104] 在发明的另一方面，BOIL、BVOIL 或 BLPRE 单独或与一个或多个选择性地浓缩于乳香酸 / 市售乳香提取物标定的 50-100% 总乳酸 / 齿叶乳香树提取物的乳香衍生提取物组合，其中 AKBA 浓度在 HPLC 分析法分析的 3-99% 之间变化且可选地包括一个或多个药学上 / 营养学上 / 饮食上可接受的赋形剂、稀释剂、盐、添加剂、天然抗氧化剂或天然抗炎剂。

[0105] 在另一方面，本发明提供了单独使用 BOIL、BVOIL 或 BLPRE 或使用它们的组合物的用法，其作为颗粒或粉末或糊状物或活性成分以粉碎的形式和 / 或以未改性的形式通过加入常规的生物学上或药学上可接受的盐或添加剂或赋形剂来配制为固体、半固体或液体剂型。

[0106] 另一方面，本发明提供了有效剂量的 BOIL、BVOIL 或 BLPRE 单独或其与一个或多个生物制剂或益智剂组合的组合物以特定剂型的给药的使用，如口服、外敷、经皮、非肠道的或以试剂盒的形式向有需要的人或病人提供。本发明组合物制剂的特定剂型包括但不限于口服剂，如片剂、软胶囊剂、硬胶囊剂、软凝胶胶囊剂、丸剂、颗粒剂、粉剂、乳剂、悬浮液、糖浆剂、微丸、食品、饮料、浓缩丸、滴剂及类似物；不经肠道试剂例如注射剂、静脉滴注及类似物；栓剂；经皮试剂如贴剂、外用药膏及凝胶；眼科用药及鼻腔剂。

[0107] 另一方面，本发明提供了组合物，包括至少一个选自 BOIL、BVOIL 或 BLPRE 的提取物 / 分馏物与一个或多个功能性成分结合，功能性成分包括来自于植物或动物或微生物或

化学合成或半合成的中草药成分、膳食补充剂、抗氧化剂、维生素、矿物质、氨基酸、脂肪酸、精油、鱼油、酶、葡萄糖胺、软骨素和益生菌或它们的盐或它们的混合物。

[0108] 在另一方面，本发明提供了单独的BOIL、BVOIL或BLPRE或它们的组合物进一步可选地与有效剂量的一个或多个药学上/营养上/饮食上可接受的试剂组合，包括但不限于抗氧化剂、适应原、抗乙酰胆碱酯酶剂、抗炎剂、抗糖尿病剂、抗肥胖剂、抗动脉粥样硬化剂、生物保护剂和/或生物有效的增强剂和微量金属。

[0109] 本发明中采用的生物学上/药学上可接受的载体的例子包括但不限于，表面活性剂、赋形剂、粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、防腐剂、稳定剂、缓冲液和悬浮液。

[0110] 在本发明可选的方面，BOIL、BVOIL或BLPRE单独或它们的组合物可选地以控释剂型形式传递；并通过使用包括纳米技术、微胶囊、胶体载体系统和其他药物传送系统的技术。所述制剂可设计为每天一次服用或每天多次服用。

[0111] 根据本发明，BOIL、BVOIL或BLPRE单独或它们的组合物还可以配制成添加至现有的或新的食品和饮料的形式及作为健康食品或饮料或饲料的动物饲料。

[0112] 根据本发明，BOIL、BVOIL或BLPRE单独或它们的组合物还可以配制成添加至现有的或新的食品和饮料的形式及作为健康食品或饮料或饲料的动物饲料，用于预防、控制及治疗大脑相关疾病/障碍。

[0113] 在另外的实施例中，组合物包含10%-99%重量的齿叶乳香树衍生组分及90%-10%重量的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物BsLPRE或BsVOIL或BsOIL，齿叶乳香树衍生组分选自富含一个或多个乳香酸、纯乳香酸化合物及其混合物的提取物和分馏物。

[0114] 下述实施例，包括优选的实施例，将说明本发明的具有应用，应理解为这些特例是用于举例说明并仅作为本发明的优选实施例，而不能限制本发明的保护范围。

[0115] 实施例1：

制备非酸性乳香物(BOIL)的过程包括：

a)获取一种或多种植物的树胶脂，所述植物选自但不限于齿叶乳香树或卡氏乳香树或/乳香枸树或它们的混合物，b)利用水不溶性有机溶剂萃取树胶脂，c)仔细过滤提取物以移除不溶性的树脂材料，d)利用碱水溶液如氢氧化钾水溶液反复洗涤有机溶剂提取物，

e)利用水和盐水洗涤有机层，f)在真空和高温下蒸发有机层以得到油状残留物(BOIL)。

[0116] 实施例2：

制备非酸性乳香挥发性油分馏物(BVOIL)的过程：

a)获取一种或多种植物的树胶脂，所述植物选自但不限于齿叶乳香树或卡氏乳香树或/乳香枸树或它们的混合物，

b)从所述树胶脂中或通过蒸汽蒸馏或在高度真空、温度下蒸馏来分离出挥发性油组分，以得到乳香挥发性油分馏物(BVOIL)。

[0117] 实施例3：

制备非酸性乳香低极性树胶脂提取分馏物(BLPRE)的过程包括：

a)获取一种或多种植物的树胶脂，所述植物选自但不限于齿叶乳香树或卡氏乳香树或/乳香枸树或它们的混合物，b)利用水不溶性有机溶剂萃取树胶脂，c)仔细过滤提取物以移除不溶性的树脂材料，d)利用碱水溶液如氢氧化钾水溶液反复洗涤有机溶剂提取物，

e）利用水和盐水洗涤有机层，

f）在真空和高温下蒸发有机层以得到油状残留物（乳香油）。

[0118] g）取所述油状残留物并且在高度真空和高温下除去挥发性化合物以得到乳香低极性树胶脂提取物（BLPRE）。

[0119] 实施例 4：

制备齿叶乳香树低极性树胶脂提取分馏物（BsLPRE）的典型过程：将齿叶乳香树树胶脂（100 g）分散于 600 mL 的甲基异丁基酮（MIBK）溶剂中并在室温下搅拌 60min。不溶性树胶材料通过过滤分离。利用 2% 氢氧化钾溶液（3*200 mL）反复萃取 MIBK 溶液以除去酸性化合物。随后相继利用水（400 mL）和盐水（200 mL）洗涤 MIBK 层。在 60 - 70° C 减压下蒸发 MIBK 层，然后在 75 - 110° C 和高度真空下将挥发性组分从油状残留物中除去以得到粘性油状的 BsLPRE（12 g）。

[0120] 可替换地，从齿叶乳香树中收集的树胶脂（250 g）利用甲醇（300 mL*3）萃取并浓缩收集到的甲醇提取物。将残留物（50 g）溶解于乙酸乙酯（400 mL）中并利用 1N 氢氧化钾（3 *100 mL）萃取。水（2*200 mL）和盐水（200 mL）洗涤有机层然后蒸发以得到乳香油。在真空及高温（75-110° C）下从油中蒸发挥发性化合物以得到 22 g 的 BsLPRE。

[0121] BsLPRE 经过使用从己烷至己烷 / 乙酸乙酯混合物至乙酸乙酯的极性增强的溶的标准硅胶色谱柱。相同的分馏物基于 TLC 集合并将结合的分馏物分别反复经过利用己烷 / 乙酸乙酯或己烷 / 酮作的混合物作为洗液的硅胶柱以获得纯净的化合物。一些不纯的分馏物进一步经过预备的反相 C18 硅胶柱的 HPLC 从而获得纯净的化合物。通过 1H 核磁共振、13C 核磁共振、DEPT、HSQC 和 HMBC 和大量的光谱数据，然后将已知化合物的数据与这些数据进行比较。鉴别出如图 I 所示的九种主要化合物为愈创奥醇（guiol）(1)、西松烷酚醇（nephthenol）（2）、锯缘青蟹醇（serratol）（3）、二萜 X（diterpene X）（4）、羽扇豆醇（lupeol ）（5）、齐墩果 -12- 烯 -3β - 醇（olean-12-ene-3β -ol）（6）、齐墩果 -12- 烯 -3α - 醇（olean-12-ene-3α -ol）(7)、羊毛甾 -8,24- 二烯 -3α - 醇（lanosta-8,24-diene-3α -ol）（8）和乌苏 -12- 烯 -3α - 醇（urs-12-ene-3α -ol）（9）。然后，采用 HPLC 方法利用这些纯净化合物来标准化齿叶乳香树低极性树胶脂提取物（BsLPRE）。基于 HPLC 和保留时间（Rt）分析法对新 BsLPRE 组合物的鉴别如表 1 所示。 BsLPRE 的 HPLC 色谱图如图 II 所示。

[0122]

表 1

齿叶乳香树低极性树胶脂提取分馏物的组合物（BsLPRE）

序号	检测物质	保留时间/分	百分比
1	愈创木醇（guiol）(1)	4.5	0.96
2	西松烷酚醇（nephthenol）（2）	7.087	2.01
3	锯缘青蒿醇（serratol）（3）	8.027	13.32
4	二萜 x（diterpene X）（4）	15.777	0.12
5	羽扇豆醇（lupeol）（5）	26.901	0.06
6	齐墩果-12-烯-3β-醇（olean-12-ene-3β-ol）（6）	31.460	1.29
7	齐墩果-12-烯-3α-醇（olean-12-ene-3α-ol）（7）	33.718	5.36
8	羊毛甾-8,24-二烯-3α-醇（lanosta-8, 24-diene-3α-ol）（8）	35.371	1.34
9	乌苏-12-烯-3α-醇（urs-12-ene-3α-ol）（9）	37.207	4.55

实施例 5

齿叶乳香树提取物标定的 50 - 100% 总乳香酸（滴定法）：齿叶乳香树提取物标定的 85% 或 65% 总乳香酸是市场上可买到的。这些提取物是通过滴定法标定的。这些提取物可利用已知的步骤制备。例如，通过利用不溶于水的溶剂萃取齿叶乳香树的树胶脂，然后选择性地利用碱水溶液通过分相来从有机溶剂提取物中萃取酸性化合物。最后酸化碱性液以沉淀乳香酸，接着真空干燥从而得到齿叶乳香树提取物浓缩的 85% 乳香酸（BE85%）。通过提纯树胶脂或提取物或通过稀释更高级别的材料可得到齿叶乳香树提取物标定的浓度可选的总乳香酸，其浓度为采用滴定法在 40%-100% 之间或采用 HPLC 法在 30%-100% 之间。

[0123] 实施例 6 ：

确定 BsOIL、BsLPRE、BcLPRE、BsVOIL 和不同的乳香酸化合物在体外酶学测定中的乙酰胆碱酯酶抑制活性 ：

乙酰胆碱酯酶活性通过采用碘代硫代乙酰胆碱为底物来测定，其转化为硫代胆碱。硫代胆碱与显色底物二硫代二硝基苯甲酸（DTNB）的反应使形成黄色的阴离子、对硝基苯甲酸，其在 412nm 处具有强吸收。孵育 10 分钟。

[0124] AChE 的测定通过埃尔曼等人的方法经小修改完成，利用碘代硫代乙酰胆碱为底物（Lee J. H., et. al. Arch Pharm Res 2004, 27(1): 53-56）。埃尔曼反应混合物含有 0.5

mM 的碘代硫代乙酰胆碱和于 50mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0)中的 1mM5,5' - 二硫代 - 双 -(2 - 硝基苯甲酸)。测定混合物含有 50μl 的 pH 为 8.0 的 50mM 的磷酸盐缓冲液,50μl 各种浓度的测试物(BsOIL 或 BsLPRE 或 BcLPRE 或 BsVOIL,不同的乳香酸和阳性对照新斯的明)及 20μl (100 mU/mL)的酶。空白酶以磷酸盐缓冲液代替。将反应混合物充分混合,加入 100μl 的埃尔曼试剂,并在室温下孵育 10 分钟。使用酶标仪在 412nm 下测量吸光度。将测试孔与对照孔的 OD 值进行比较,采用以下公式计算出酶活性的抑制百分率。计算 :抑制率% =[(对照品 - 样品)/ 对照品] x 100。 BsOIL、BsLPRE、BcLPRE、BsVOIL 和乳香酸的乙酰胆碱酯酶抑制活性的结果如表 2 和表 3 所示。

[0125] 表 2

BsOIL、BsLPRE、BcLPRE、BsVOIL 的乙酰胆碱酯酶抑制活性

化合物名称	在各浓度下的抑制率%			IC50 ng/mL
	10 ng	25 ng	50 ng	
BsOIL	10.65	17.09	32.69	> 50
BsLPRE	31.5	43.7	57.87	37.01
BcLPRE	15.6	23.18	42.56	> 50
BsVOIL	16.5	25.49	33.01	>50
BSE-85	-	4.22	6.27	
组合物 1				42.7
新斯的明	25.17	37.19	54.69	43.29

表 3

纯乳香酸的乙酰胆碱酯酶抑制活性

产品名称	在各浓度下的抑制率%				IC50 ng/mL
	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng	
11-酮基-β-乳香酸	-	11.82	16.36	24.55	>100
3-O-乙酰基-11-酮基-α-乳香酸	-	9.64	16.07	27.5	>100
α-乳香酸	-	13.85	21.92	39.23	>100
β-乳香酸	-	16.75	21.23	31.37	>100
3-O-乙酰基-α-乳香酸	-	14.86	21.28	33.11	>100
3-O-乙酰基-β-乳香酸	-	36.29	40.32	52.02	91.77
新斯的明	25.17	37.19	54.69	-	43.29

实施例 7：

BsOIL、BsLPRE、BcLPRE、BsVOIL 及乳香酸在 PC 12 细胞细胞中的乙酰胆碱酯酶抑制活性：在 β-淀粉样肽诱导的大鼠嗜铬细胞瘤 PC 12 细胞对酶活性的抑制性进行了分析。

[0126] 大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞均匀地分布于无酚红的杜尔贝科改良的伊格尔氏红培养基中(DMEM)(Sigma 生命科学,美国),在 24 孔板中,包含 10% 的小牛血清(FBS)。分别用检测试剂(BsOIL、BsLPRE、BcLPRE、BsVOIL 及不同的乳香酸和阳性对照新斯的明)进行预处理 1h。然后,在 37 oC 利用 1 μg/mL β-淀粉样多肽(加州生化公司,美国)对细胞进行诱导 24h。24 小时后,收集细胞然后用 1* PBS 洗两次,在 4oC、1200 rpm 离心 5 分钟。在溶解缓冲液(10mM 三羟甲基氨基甲烷,pH 7.2;100mM 氯化钠,50 mM 氯化镁,1% 曲拉通 100)中制备得到细胞提取物。细胞提取物用作样品用于测量乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。

[0127] 在 96 孔微孔板的每个孔中加入细胞提取物样品(100 μl)。五十微升的 DTNB(二硫对硝基苯甲酸)溶液加入到各孔中,并在室温下孵育 5 分钟。孵育后,每孔中加入 50μl 的乙酰胆碱碘溶液,立即在 405nm 处读取吸光度,每次间隔 2 分钟共 12 分钟。通过使用一系列浓度的乙酰胆碱酯酶(0-100mU)来构建标准曲线。通过考马斯亮兰法计算每 100μl 细胞提取物中存在的总蛋白,然后标准化酶活性并将其表示为每毫克蛋白的单位活性。测试样品的功效以 AChE 活性的抑制百分率的形式来表示,并将其与作为阳性对照的新斯的明比较。

[0128] 结果:表 4 和表 5 显示了来自于齿叶乳香树及卡氏乳香树的各种非酸性提取物(BsOIL、BsLPRE、BcLPRE 和 BsVOIL)及不同的乳香酸的乙酰胆碱酯酶抑制活性。一标准药物新斯的明作为阳性对照用于比较乳香产物的 AchE 抑制效果。

[0129] 表 4

BsOIL、BsLPRE、BcLPRE 和 BsVOIL 的乙酰胆碱酯酶抑制特性

测试样品	处理浓度	对 AchE 活性的抑制率%
BsOIL	100 ng/ml	19.92
BsLPRE	100 ng/mL	25.31
BcLPRE	100 ng/mL	18.67
BsVOIL	100 ng/mL	16.46
新斯的明	20 ng/ml	49.09

表 5

不同的乳香酸对抑制乙酰胆碱酯酶活性的效果比较

测试样品	处理浓度	对 AchE 活性的抑制率%
11-酮基-β-乳香酸	100 ng/ml	31.39
3-O-乙酰基-酮基-β-乳香酸	100 ng/ml	41.67
α-乳香酸	100 ng/ml	38.42
β-乳香酸	100 ng/ml	46.54
3-O-乙酰基-α-乳香酸	100 ng/ml	29.22
3-O-乙酰基-β-乳香酸	100 ng/ml	37.34
新斯的明	20 ng/ml	54.65

实施例 8

制备组合物 -1 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -1 ;4 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(4g)和 1 份齿叶乳香树提取物标定的 85％总乳香酸(BSE85％)(1 g)。

[0130] 实施例 9

组合物 -2 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -2 ;1 份的齿叶乳香树挥发性油(BsVOIL)(1g)和 4 份齿叶乳香树提取物标定的 85％总乳香酸(BSE85％)(4 g)。

[0131] 实施例 10

组合物 -3 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -3 ;1 份的齿叶乳香树非酸性油(BsOIL)(1g)和 4 份齿叶乳香树提取物标定的 85％总乳香酸(BSE85％)(4 g)。

[0132] 实施例 11

组合物 -4 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -4 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份齿叶乳香树提取物标定的 85％总乳香酸(BSE85％)(4 g)。

[0133] 实施例 12

组合物 -5 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -5 ;1 份的卡氏乳香树挥发性油(BcVOIL)(1g)和 3 份卡氏乳香树提取物标定的 85％总乳香酸(BSE85％)(3 g)。

[0134] 实施例 13

组合物 -6 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -6 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份富含 20% 的 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 -β- 乳香酸(AKBA)的齿叶乳香树提取物(4 g)。

[0135] 实施例 14

组合物 -7 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -7 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份富含 20% 的 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 -β- 乳香酸(AKBA)的卡氏乳香树提取物(4 g)。

[0136] 实施例 15

组合物 -8 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -8 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份富含 40% 的 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 -β- 乳香酸(AKBA)的齿叶乳香树提取物(4 g)。

[0137] 实施例 16

组合物 -9 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -9 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 3 份富含 40% 的 3-O- 乙酰基 -11- 酮基 -β- 乳香酸(AKBA)的卡氏乳香树提取物(3g)。

[0138] 实施例 17

组合物 -10 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -10 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 3 份假马齿苋标准化提取物(3g)。

[0139] 实施例 18

组合物 -11 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -10 ;1 份的齿叶乳香树挥发性油分馏物(BsVOIL)(1g)和 3 份假马齿苋标准化提取物(3g)。

[0140] 实施例 19

组合物 -12 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -12 ;1 份的非酸性齿叶乳香树油分馏物(BsOIL)(1g)和 3 份假马齿苋标准化提取物(3g)。

[0141] 实施例 20

组合物 -13 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -13 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份假马齿苋水提取物(4g)。

[0142] 实施例 21

组合物 -14 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -14 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份假马齿苋 90% 甲醇提取物(4g)。

[0143] 实施例 22

组合物 -15 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -15 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 3 份假马齿苋标准化提取物(3g)。

[0144] 实施例 23

组合物 -16 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -16 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份假马齿苋提取物标定的 25% 假马齿苋皂苷(4g)。

[0145] 实施例 24

组合物 -17 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -17 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份假马齿苋提取物标定的 25% 假马齿苋皂苷(4g)。

[0146] 实施例 25

组合物 -18 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -18 ;1 份的乳香枸树低极性树胶脂提取物(BpLPRE)(1g)和 4 份假马齿苋提取物标定的 25% 假马齿苋皂苷(4g)。

[0147] 实施例 26

组合物 -19 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -19 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份姜黄提取物标定的 95% 总姜黄素(CLE 95%)(1g)。

[0148] 实施例 27

组合物 -20 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -20 ;1 份的齿叶乳香树挥发性油分馏物(BsVOIL)(1g)和 4 份姜黄提取物标定的 95% 总姜黄素(CLE 95%)(4g)。

[0149] 实施例 28

组合物 -21 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -21 ;1 份的非酸性齿叶乳香树油分馏物(BsOIL)(1g)和 4 份姜黄提取物标定的 95% 总姜黄素(CLE 95%)(4g)。

[0150] 实施例 29

组合物 -22 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -22 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 3 份姜黄素(CLE 95%)(3g)。

[0151] 实施例 30

组合物 -23 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -23 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 3 份双去甲基姜黄素(BDMC)(3g)。

[0152] 实施例 31

组合物 -24 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -24 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份睡茄甲醇提取物(4g)。

[0153] 实施例 32

组合物 -25 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -25 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份标准的睡茄提取物(4g)。

[0154] 实施例 33

组合物 -26 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -26 ;1 份的乳香低极性树胶脂提取物(BLPRE)(1g)和 4 份标准的迷迭香提取物(4g)。

[0155] 实施例 34

组合物 -27 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -27 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份标准的迷迭香提取物(4g)。

[0156] 实施例 35

组合物 -28 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -28 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 4 份标准的迷迭香提取物(4g)。

[0157] 实施例 36

组合物 -29 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -29 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 4 份迷迭香提取物标定的 30% 迷迭香酸(RA 30%)(4g)。

[0158] 实施例 37

组合物 -30 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -30 ;1 份的卡氏乳香树低极性树胶脂提取物(BcLPRE)(1g)和 3 份迷迭香提取物标定的 30% 迷迭香酸(RA 30%)(3g)。

[0159] 实施例 38

组合物 -31 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -31 ;1 份的乳香非酸性油(BOIL)(1g)和 3 份倒捻子甲醇提取物(3g)。

[0160] 实施例 39

组合物 -32 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -32 ;1 份的非酸性齿叶乳香树油(BsOIL)(1g)和 3 份倒捻子甲醇提取物(3g)。

[0161] 实施例 40

组合物 -33 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -33 ;1 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(1g)和 3 份倒捻子甲醇提取物(3g)。

[0162] 实施例 41

组合物 -34 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -34 ;2 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(2g)和 1 份 a- 倒捻子素(1g)。

[0163] 实施例 42

组合物 -35 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -35 ;4 份的齿叶乳香树低极性树胶脂提取物(BsLPRE)(4g)和 1 份 a- 倒捻子素(1g)。

[0164] 实施例 43

组合物 -36 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -40 ;1 份的乳香低极性树胶脂提取物(BLPRE)(1g)和 3 份绒毛戴星草乙酸乙酯提取物(3g)。

[0165] 实施例 44

组合物 -37 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -40 ;1 份的非酸性乳香油分馏物(BOIL)(1g)和 4 份绒毛戴星草乙酸乙酯提取物(4g)。

[0166] 实施例 45

组合物 -38 :通过将以下组份的单位剂量混合制备组合物 -40 ;1 份的乳香挥发性油分馏物(BVOIL)(1g)和 4 份绒毛戴星草乙酸乙酯提取物(4g)。

[0167] 实施例 46

活性氧的测量分析(ROS)

利用荧光探针 DCFH-DA 测量 ROS 的形成。该方法是基于孵育带 DCFH-DA 的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞,其通过细胞膜被动扩散。细胞内的酯酶活性导致形成 DCFH,当其氧化为 20,70- 二氯荧光素(DCF)时发出荧光。简单地说,细胞在 HEPS 缓冲的(20 mM)带葡萄糖(5 mM)的 HBSS ($CaCl_2$ 1.26 mM, KCL 5.37 mM, KH_2PO_4 0.44 mM; $MgCl_2$ 0.49 mM, MgSO4 0.41 mM, NaCl 140 mM, $NaHCO_3$ 4.17 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM)中与

DCFH-DA（5 mM）在 37℃下孵育 15min。然后离心，用新鲜缓冲液替换带 DCFH-DA 的细胞外缓冲液，然后轻轻地混合悬浮液。在有或没有 100 mM H_2O_2 的情况下，将细胞（$2*10^6$/ml，125 ml）转移至含 125ml 缓冲液及不同浓度的测试样品（a- 倒捻子素、BsLPRE、组合物 -34 及组合物 -35）的 250ml 孔（酶标仪，96 孔）中。使用激发波长 485 nm、发射波长 530 nm 在荧光光谱仪（特纳生物系统公司，美国）中记录荧光 120min。以曲线下的面积（AUC）来计算结果，细胞内 ROS 生成的抑制百分比从 H_2O_2 处理的培养基中计算出。这些结果都在表 6 中显示。

[0168] 表 6

中草药产物及其结合物的抗氧化性质

序号	处理	抑制活性氧（ROS）的生成（IC50）
1	α-倒捻子素	49.817 ug/ml
2	BsLPRE	53.879 ug/ml
3	组合物-34	33.342 ug/ml
4	组合物-35	50.776 ug/ml

实施例 47

细胞增殖实验

在氧化应激诱导的 IMR32 人神经母细胞瘤细胞 SW982 人滑膜细胞中，通过采用基于细胞增殖试验的 MTT 来测试 BsLPRE 或 a- 倒捻子素或其组合（组合物 -34）对于细胞增殖的效果。简单地说，IMR32 人神经母细胞瘤细胞孵育于包含 10% 的小牛血清（FBS）的杜尔贝科改良的伊格尔氏红培养基中（DMEM）（Sigma 生命科学，美国）。相同数量的 IMR32 细胞接种于 96 微孔板的每个孔中，并在 5% CO_2、37℃下孵育。在不存在或存在不同浓度的 BsLPRE 或 a- 倒捻子素其组合（组合物 -34）情况下，利用 250 uM H2O2 处理 72 小时。对照孔补充 0.05% DMSO。在处理 72 小时后，每个孔中加入相同体积的 MTT 试剂（R&D 系统公司，美国）并孵育 4 小时。然后，在每个孔中加入 50 μl 溶解缓冲液（R&D 系统公司，美国）以溶解因 MTT 的减少所产生的有色的甲臜晶体。在 24 小时后，采用酶标仪（Bio-Rad，美国）在 550 nm 处检测光密度。在每一次测试中，载体对照及处理都一式四份地进行。将载体对照孔中的平均 OD 值认为是细胞增殖系数 100.。结果如下表 7 所示。

[0169] 表 7

保护人类神经母细胞瘤细胞免受氧化应激诱导的细胞毒性损害

序号	处理	处理浓度	细胞增殖系数
1	载体对照		100.00
2	H2O2	250 uM	78.71
3	α-倒捻子素	10ng/ml	80.32
		25ng/ml	86.78
		50ng/ml	87.21
		100ng/ml	91.78
4	BsLPRE	10ng/ml	87.81
		25ng/ml	92.24
		50ng/ml	95.19
		100ng/ml	97.30
5	组合物-34	10ng/ml	92.81
		25ng/ml	95.82
		50ng/ml	99.05
		100ng/ml	101.33

实施例 48

在 β－淀粉样蛋白诱导的 PC12 细胞中中草药产物及其结合物对乙酰胆碱酯酶活性的抑制：利用实施例 7 所述的步骤对 a- 倒捻子素、BsLPRE 及组合物 -34 的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行了测试。

序号	处理	处理浓度	对乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的抑制率%
1	α-倒捻子素	100ng/ml	26.83
		250ng/ml	29.48
2	BsLPRE	100ng/ml	30.99
		250ng/ml	35.15
3	组合物-34	100ng/ml	37.97
		250ng/ml	40.57

[0170] 实施例 49

采用高架放射臂迷宫方法在大鼠中测试 BsLPRE 对改善学习及记忆的功效：动物研究方案已得到机构动物伦理委员会的批准。将大白鼠适应环境一周并选择健康大鼠进行研究。将选择的大鼠在高架放射臂迷宫（RAM）中预先训练，将适应的大鼠分配于不同的处理组，每组包含 8 只大鼠。完成预训练后，对动物每天进行口服处理持续并持续至两周。在处理期间，大鼠置于 RAM 上，每次 10 分钟以认识存在于三个不同颜色臂上的食物丸。在训练过程中，通过计算不同的参数如需要学习任务的天数、发现食物的潜伏期、错误进入 / 尝试

的次数来测试空间学习能力。在这样处理后，给予所训练的动物一个星期（第三周）的休息而不需要处理或训练。在第四周，对动物给予分配剂量的测试品并且采用相同的同屋通过测试潜伏期及错误进入的数量来进行记忆保持测试。通过 ANOVA 及适当的事后比较来分析数据。

[0171] 结果（空间学习）：

口服 BsLPRE（250 mg/kg）显著（P< 0.01）地减少了在所设置条件下大鼠需要学习的天数，并且显著地（P< 0.05）降低了学习后的大鼠在高架 RAM 模型中找到食物所需要的时间。吡拉西坦（150 mg/kg）显示出了显著的空间学习的提高，以减少潜伏期及错误进入的数量为代表，当与对照组相比时，结果如下所示（图 IIIA 至 IIIC）。测试品 BsLPRE 还显著提高了识别及记忆保持（图 IVA 及 IVB）。这些结果都证实 BsLPRE 的使用提高了空间学习及记忆保持。通过这些发现，BsLPRE 是一种有前景的促进学习及记忆的制剂。

[0172] 应该了解，在本领域中的这些普通技术的改变可以实现上述实施例而没有背离本发明的范围。因此，应当理解，所述的特定实施例或例子不是本发明的限制，而是为了涵盖在本发明所明确的目的和范围内的变型。

图I

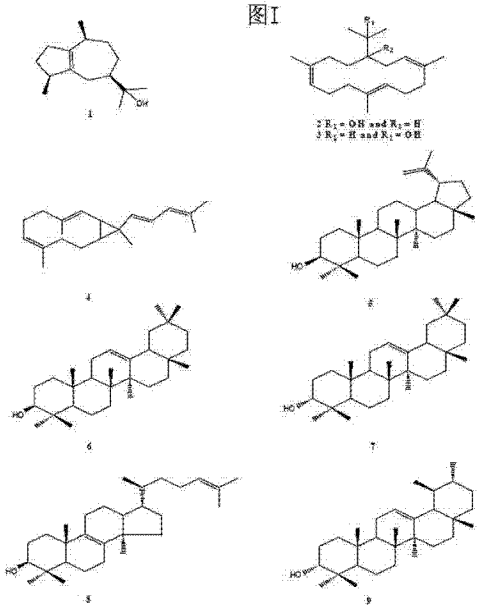


图 1

图II

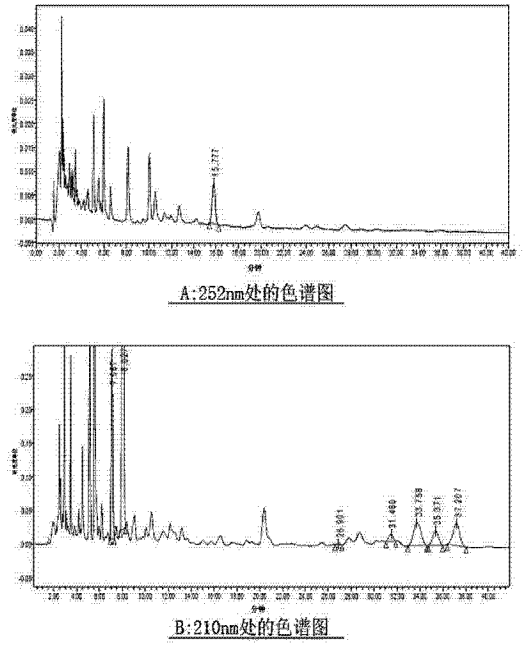


图 2

图III

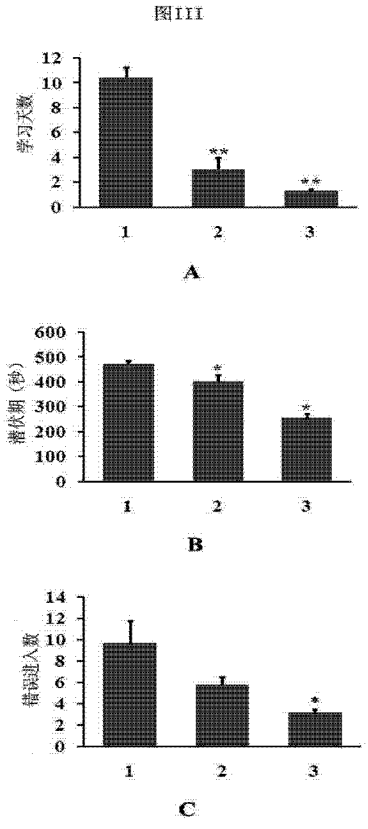


图 3

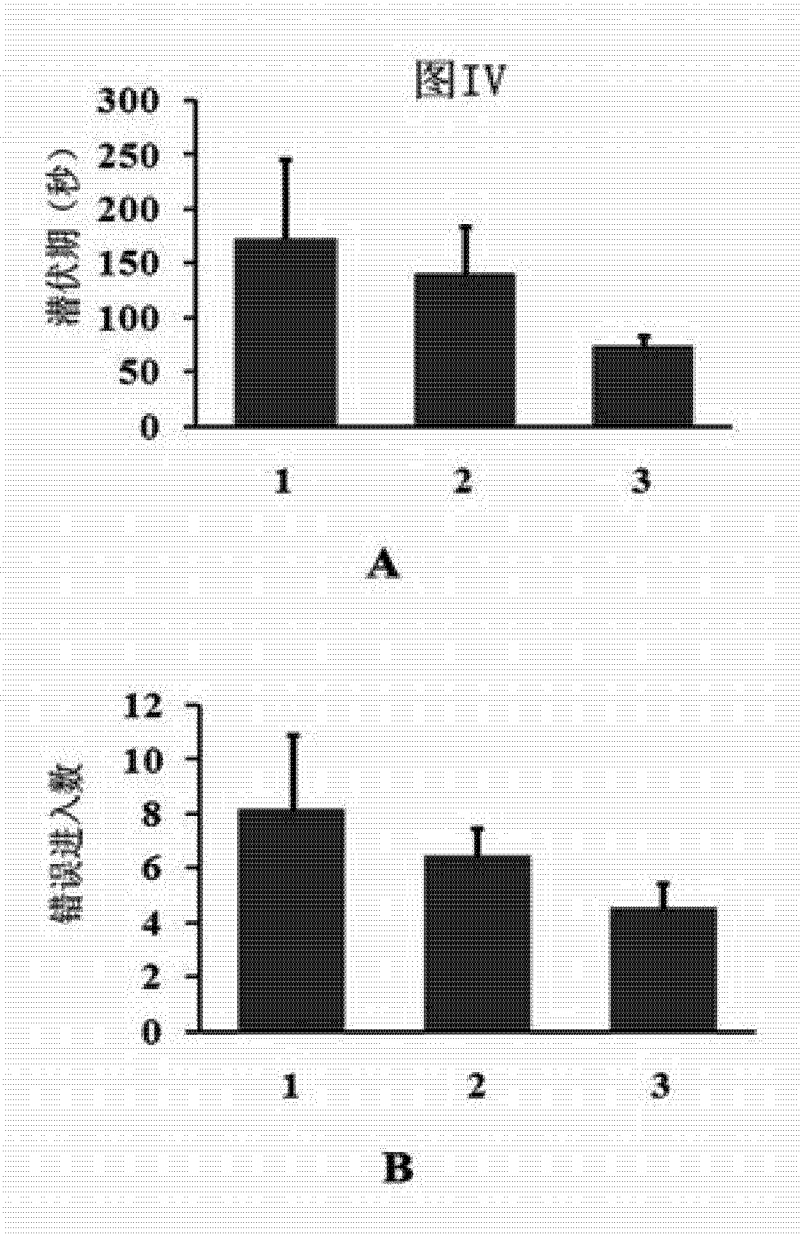


图 4