(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 103083306 A
(43)申请公布日 2013.05.08

(21)申请号 201210490347.X

(22)申请日 2012.11.20

(71)申请人 蒋春红
地址 100011 北京市西城区黄寺大街23号院阳光丽景北区1804室

(72)发明人 文萍 钟阳桂 蒋春红 杨小玲 李志勇 刘地发 曾发林

(51)Int.Cl.
A61K 31/343(2006.01)
A61K 31/216(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)
C07C 69/732(2006.01)
C07C 67/30(2006.01)

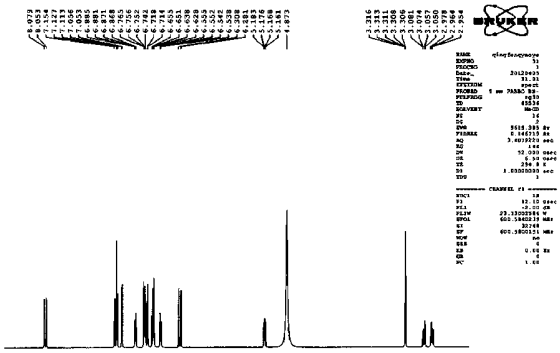
权利要求书2页 说明书61页 附图9页

(54)发明名称

丹酚酸A组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途

(57)摘要

本发明涉及一种丹酚酸A组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途，该组合物由丹酚酸A、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸B、丹酚酸C组成，其中所述的组合物是由下列重量配比制成：丹酚酸A90%～99%，紫草酸0.1%～3%，迷迭香酸0.1%～3%，丹酚酸B0.1%～3%，丹酚酸C0.1%～5%。



CN 103083306 A

1. 丹酚酸 A 组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途，其中所述的组合物中丹酚酸 A94％～97％，紫草酸 0.1％～1.5％，迷迭香酸 0.1％～1.5％，丹酚酸 B0.1％～1.5％，丹酚酸 C0.1％～2.0％，所述丹酚酸 A 组合物采用下制备方法获得：

取丹参药材，切成饮片或粉碎成直径约 1mm～5mm 颗粒，每次加 3～15 倍量、45～95℃水温浸提取，同时以 10～50 转 / 分速度搅拌，或加 3～15 倍量水煎煮提取，共提取 1～3 次，每次提取 1～4 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.0～1.25(60℃)，加入乙醇使含醇量在 50％～85％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味，得丹参提取液；或者

取丹参药材，切成饮片或粉碎成直径约 1mm～5mm 颗粒，每次加 3～15 倍量 30％～60％乙醇回流提取，每次提取 1～4 小时，共提取 1～3 次；减压回收乙醇并浓缩至无醇味，得丹参提取液；

上述丹参提取液加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B1～30mg，水溶液用碱调 pH 至 3.5～6.5，加入与丹酚酸 B 摩尔百分比 0.1～3％氯化锌作为催化剂，在 100～140℃温度加热转化 1～6 小时；

转化液调 pH 值至 2.5～4.5，静置、离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A1～10mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1：35～1：70，树脂柱径高比为 1：4～1：30，分别用 1～8 倍柱体积水、1～10 倍柱体积 10％～40％乙醇洗脱，除去杂质，再用 2～10 倍柱体积 20％～60％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 20％～60％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；

水溶液浓缩至每 1ml 含 1-10mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1：5～1：25，树脂柱径高比为 1：4～1：25，分别用 1～10 倍柱体积水、5～20 倍柱体积 20％～60％乙醇溶液洗脱除杂，再用 4～15 倍柱体积 40％～90％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 40％～90％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味水溶液；

水溶液浓缩，调酸 pH 至 2.0～4.0，用水溶液 1-8 倍量的叔丁基甲基醚，分 2～6 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A1g～10g 的萃取液，加入 1～3 倍量硅胶，搅拌，挥干；

把搅拌样硅胶加到已装好的 5～20 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1：4～1：25，以正戊烷－叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷－叔丁基甲基醚 (4：6) 洗脱 6～30 倍柱体积，正戊烷－叔丁基甲基醚 (6：4) 洗脱 6～30 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 5～20 倍量水溶解，微波真空干燥，得所述丹酚酸 A 组合物。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于抑制脑组织神经细胞凋亡的用途。

3. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于增强脑组织内源性神经营养因子表达的用途。

4. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于抑制脑组织炎症损伤的用途。

5. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于抑制脑组织神经细胞内 Ca^{2+} 超载的用途。

6. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于改善脑组织内单胺类神经递质紊乱的用途。

7. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于抑制脑组织兴奋性氨基酸毒性的用途。

8. 根据权利要求 1 所述的用途，还包括用于抑制脑组织氧自由基损伤的用途。

9. 根据权利要求 1 ～ 8 任一项所述的用途，其中所述组合物是由下列重量配比制成：丹酚酸 A95％～ 96％，紫草酸 0.1％～ 1.2％，迷迭香酸 0.1％～ 1.2％，丹酚酸 B0.1％～ 1.2％，丹酚酸 C0.1％～ 1.5％。

10. 根据权利要求 1 ～ 8 任一项所述的用途，其中微波真空干燥温度：20-100℃，回差温度 1-5℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 1-100KW，干燥 10-200 分钟。

11. 根据权利要求 10 所述的用途，其中微波真空干燥温度：50-85℃，回差温度 2-4℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 10-80KW，干燥 100-150 分钟。

12. 根据权利要求 11 所述的用途，其中微波真空干燥温度：55-80℃，回差温度 2-3℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 25-60KW，干燥 120-140 分钟。

13. 根据权利要求 1 ～ 12 任一项所述的用途，其特征在于采用高效液相色谱法测定丹酚酸 A，紫草酸，迷迭香酸，丹酚酸 B，丹酚酸 C 含量，测定条件如下：

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；

检测波长 286nm；流速 1.0ml/min；柱温 30℃；

理论塔板数按丹酚酸 A 计应不低于 10000；

对照品溶液的制备精密称取丹酚酸 A、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 对照品适量至容量瓶中，加甲醇制成混合对照品溶液；

供试品溶液的制备：精密称取样品 10mg 到 100ml 容量瓶中，加甲醇溶解摇匀，并稀释至刻度，即得；

洗脱以甲醇为流动相 A，以 0.1 ～ 0.5％磷酸为流动相 B，按下述条件进行梯度洗脱，运行 60 分钟；

0 ～ 10 分钟时，甲醇的比例由 30％升至 40％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 70％降至 60％；

10 ～ 30 分钟时，甲醇的比例由 40％升至 55％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 50％降至 45％；

30 ～ 60 分钟时，甲醇的比例由 55％升至 80％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 45％降至 20％。

测定法：分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定，计算丹酚酸 A、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的含量。

丹酚酸A组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种丹酚酸A组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途。

技术背景

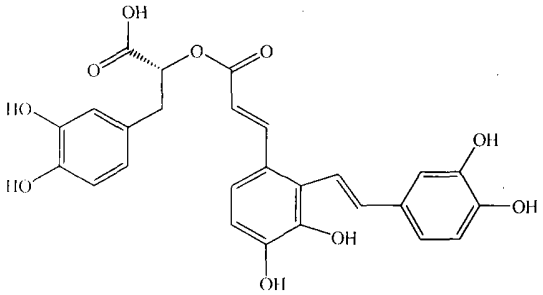
[0002] 脑血管病又称脑卒中，是由各种病因使供应脑部血液的血管发生病变所致的一种神经系统疾病。其主要病因为脑动脉系统病损（如脑动脉硬化）等原因导致的脑动脉管腔狭窄、血管痉挛、闭塞或破裂、血流减少或完全阻塞，脑部血液循环和功能障碍，脑组织受损而发生的一系列症状。主要包括缺血性和出血性脑血管病。其中（ICVD，又称缺血性卒中）占80％左右。

[0003] 缺血性脑血管病是指局部脑组织包括神经细胞、胶质细胞及联系纤维由于供血障碍发生的变性、坏死或一过性的功能丧失。血管内血栓形成、栓塞、血管狭窄导致的脑动脉阻塞是缺血性脑卒中的主要原因。缺血引起脑神经细胞损伤和死亡的作用机制多样、复杂，缺血性脑卒中（即脑缺血）后，由于脑部缺乏血液和氧气的供应，导致大脑能量代谢失衡，产生一系列病理性损伤，如氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、钙超载、炎症反应等，从而导致神经元的大量死亡。它是临床上的常见病、多发病，死亡率及致残率很高，现已经成为世界公认的三大致死疾病之一。临床上治疗主要是溶栓、挽救缺血区域（半暗带）的濒临死亡的神经元和促进损伤后神经功能的恢复。防治缺血性脑血管疾病是目前人类迫切需要解决的医学难题。目前美国FDA仅批准了组织纤溶酶原活化因子（tPA）用于中风后的溶栓治疗，但其治疗时间窗很窄，只有在中风4.5小时内使用才有效；而且还存在出血以及缺血再灌加重脑损伤的危险性。而目前针对缺血性中风治疗的神经保护药包括钙通道阻断剂如尼莫地平、谷氨酸受体拮抗剂如地佐环平（dizocilPine）、抗氧化剂或自由基清除剂如依达拉奉、NO信号传导通路调节剂芦贝鲁哩（Lubeluzole）以及炎症抑制剂恩莫单抗（enlimomab）等。但它们中有的治疗作用不确切或特异性不强，有的毒副作用较大、耐受性小，有的还处于临床前或临床研究阶段，很难在防治缺血性脑卒中发挥积极影响。因而，研发出快速有效、安全稳定的防治脑缺血药物迫在眉睫。在此领域中医药发挥了不可忽视的积极作用。

[0004] 丹参制剂是我国心脑血管疾病的基本治疗药物，因疗效确切，丹参已成为我国用量最大、销售额最高、制剂生产厂最多，临床剂型最全的中药之一。

[0005] 丹参有效化学成分主要有两大类：脂溶性丹参酮类化合物和水溶性酚酸类化合物。研究表明：丹酚酸类在抗肝脏损伤、抗动脉粥样硬化及细胞凋亡以及改善记忆功能障碍等方面有着显著的活性。其中又以丹酚酸A（Salvianolic acid A）抗氧化活性最强，丹酚酸A结构如下：

[0006]



[0007] 但是，采用心脑血管疾病现有相关制剂均一味追求提高制剂中丹酚酸 A 的纯度或含量，而忽略了尝试探讨丹酚酸 A 及其他相关成份组合是否可以起到同样甚至更好的效果。

[0008] 然而，丹酚酸 A 的天然含量极低（约为丹参药材的 0.01-0.06％），使得原药材成本过高，分离纯化难度过大，严重制约着药物的开发和研究，成为其产业化的瓶颈。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种丹酚酸 A 组合物用于制备抑制脑组织神经元损伤或死亡药物的用途，其中所述的组合物中丹酚酸 A94％～97％，紫草酸 0.1％～1.5％，迷迭香酸 0.1％～1.5％，丹酚酸 B0.1％～1.5％，丹酚酸 C0.1％～2.0％，所述丹酚酸 A 组合物采用下制备方法获得：

[0010] 取丹参药材，切成饮片或粉碎成直径约 1mm～5mm 颗粒，每次加 3～15 倍量、45～95℃水温浸提取，同时以 10～50 转 / 分速度搅拌，或加 3～15 倍量水煎煮提取，共提取 1～3 次，每次提取 1～4 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.0～1.25(60℃)，加入乙醇使含醇量在 50％～85％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味，得丹参提取液；或者

[0011] 取丹参药材，切成饮片或粉碎成直径约 1mm～5mm 颗粒，每次加 3～15 倍量 30％～60％乙醇回流提取，每次提取 1～4 小时，共提取 1～3 次；减压回收乙醇并浓缩至无醇味，得丹参提取液；

[0012] 上述丹参提取液加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B1～30mg，水溶液用碱调 pH 至 3.5～6.5，加入与丹酚酸 B 摩尔百分比 0.1～3％氯化锌作为催化剂，在 100～140℃温度加热转化 1～6 小时；

[0013] 转化液调 pH 值至 2.5～4.5，静置、离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A1～10mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1：35～1：70，树脂柱径高比为 1：4～1：30，分别用 1～8 倍柱体积水、1～10 倍柱体积 10％～40％乙醇洗脱，除去杂质，再用 2～10 倍柱体积 20％～60％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 20％～60％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；

[0014] 水溶液浓缩至每 1ml 含 1-10mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1：5～1：25，树脂柱径高比为 1：4～1：25，分别用 1～10 倍柱体积水、5～20 倍柱体积 20％～60％乙醇溶液洗脱除杂，再用 4～15 倍柱体积 40％～90％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 40％～90％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味水溶液；

[0015] 水溶液浓缩，调酸 pH 至 2.0～4.0，用水溶液 1-8 倍量的叔丁基甲基醚，分 2～6 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A1g～10g 的萃取液，加

入 1 ～ 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；

[0016] 把搅拌样硅胶加到已装好的 5 ～ 20 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 4 ～ 1 ： 25，以正戊烷 - 叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 6 ～ 30 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 6 ～ 30 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 5 ～ 20 倍量水溶解，微波真空干燥，得所述丹酚酸 A 组合物。

[0017] 优选的，还包括用于抑制脑组织神经细胞凋亡的用途。

[0018] 优选的，还包括用于增强脑组织内源性神经营养因子表达的用途。

[0019] 优选的，还包括用于抑制脑组织炎症损伤的用途。

[0020] 优选的，还包括用于抑制脑组织神经细胞内 Ca^{2+} 超载的用途。

[0021] 优选的，还包括用于改善脑组织内单胺类神经递质紊乱的用途。

[0022] 优选的，还包括用于抑制脑组织兴奋性氨基酸毒性的用途。

[0023] 优选的，还包括用于抑制脑组织氧自由基损伤的用途。

[0024] 优选的，其中所述组合物是由下列重量配比制成：丹酚酸 A95％～ 96％，紫草酸 0.1％～ 1.2％，迷迭香酸 0.1％～ 1.2％，丹酚酸 B0.1％～ 1.2％，丹酚酸 C0.1％～ 1.5％。

[0025] 优选的，其中微波真空干燥温度：20-100℃，回差温度 1-5℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 1-100KW，干燥 10-200 分钟。

[0026] 优选的，微波真空干燥温度：50-85℃，回差温度 2-4℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 10-80KW，干燥 100-150 分钟。

[0027] 优选的，其中微波真空干燥温度：55-80℃，回差温度 2-3℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 25-60KW，干燥 120-140 分钟。

[0028] 优选的，采用高效液相色谱法测定丹酚酸 A，紫草酸，迷迭香酸，丹酚酸 B，丹酚酸 C 含量，测定条件如下：

[0029] 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；

[0030] 检测波长 286nm；流速 1.0ml/min；柱温 30℃；

[0031] 理论塔板数按丹酚酸 A 计应不低于 10000；

[0032] 对照品溶液的制备精密称取丹酚酸 A、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 对照品适量至容量瓶中，加甲醇制成混合对照品溶液；

[0033] 供试品溶液的制备：精密称取样品 10mg 到 100ml 容量瓶中，加甲醇溶解摇匀，并稀释至刻度，即得；

[0034] 洗脱以甲醇为流动相 A，以 0.1 ～ 0.5％磷酸为流动相 B，按下述条件进行梯度洗脱，运行 60 分钟；

[0035] 0 ～ 10 分钟时，甲醇的比例由 30％升至 40％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 70％降至 60％；

[0036] 10 ～ 30 分钟时，甲醇的比例由 40％升至 55％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 50％降至 45％；

[0037] 30 ～ 60 分钟时，甲醇的比例由 55％升至 80％，0.1 ～ 0.5％磷酸水溶液的比例由 45％降至 20％。

[0038] 测定法：分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，

测定，计算丹酚酸 A、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的含量。

[0039] 本发明通过对丹参的提取、转化、纯化、干燥工艺，得到了以丹酚酸 A 为主的化合物：经过系统的筛选和优化，首先比较确定了起始原料丹酚酸 B 的提取溶剂和提取方法，由于丹酚酸 B 水溶性较好，确定了采用水提取或低浓度醇提取，又由于丹酚酸 B 热稳定性较差，确定了采用热水温浸提取并加搅拌提取方法，或用低浓度乙醇回流提取，使提取溶度低于 100℃，保持丹酚酸 B 不被破坏，通过正交实验确定了最佳溶剂用量和提取时间，得到了适应工业化生产的丹酚酸 B 最佳提取工艺的。

[0040] 本发明与现有技术对比表明：起始原料用丹参药材直接提取即可进行投料转化，不需对丹酚酸 B 进行纯化后再进行转化，即本发明催化转化反应中，反应原料丹酚酸 B 不需要高纯度，例如不需要丹酚酸 B 的纯度≥ 50％。一般认为反应原料越纯越好，然而，本发明的催化转化反应中，丹酚酸 B 的纯度高低对转化反应效果没有影响。相反，丹酚酸 B 纯度＞50％时不但产生大量杂质，且没有提高转化率，因此，本发明取得了预料不到的技术效果。

[0041] 另外，本发明还可以将低浓度与高浓度的丹酚酸 B 混合，只需配成合适的起始转化浓度即可，同样可以达到转化成丹酚酸 A 组合物的目的。因此，这种转化原料的制备工艺非常简单，生产成本降低的同时也非常适于实际产业中的应用。

[0042] 再者，本发明通过反复实验比较，首先确定了对丹酚酸 A 组合物产率产生重要影响的因素如转化前丹酚酸类化合物的浓度、pH 值、温度、时间等。在此基础上，又通过付出大量的时间、物质和精力反复实验对温度、pH 值、时间、丹酚酸 B 的浓度及其他相关条件进行了研究，以及这些因素彼此之间如何协同作用共同对丹酚酸 A 产率产生影响，从而确定了丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 的需要控制的最佳温度、pH 值、时间等，并将丹酚酸 B 起始浓度控制在 1mg/ml ～ 30mg/ml，从而使得本发明丹酚酸 A 转化率更加明显优于其他转化条件。化学反应中，反应物的纯度与浓度常常影响反应的效果。一般情况下对反应物有浓度要求，且认为浓度高比浓度低好。本发明的催化转化反应中，丹酚酸 B 的浓度高低对转化反应效果没有影响。相反，实验证明含丹酚酸 B 水溶液中丹酚酸 B 的浓度并非越高越好，30mg/ml 以上浓度转化率反而低，效果更差。因此，本发明在节约成本和生产周期方面，取得了预料不到的技术效果，具有创造性。在现有技术没有给出任何技术启示的情况下，本领域技术人员如果仅从理论上推断，是不可能得出在上述各条件参数下将丹酸 B 转化成丹酚酸 A 具有更好的转化效果的结论。

[0043] 更为重要的是，本发明通过创造性的劳动，发现氯化锌作为催化剂能显著提高丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物的转化率，转化率非常稳定的能达到接近 60％，多数情况都可以超过 60％，这在以往任何一项现有技术中都是不可能的，因此，取得了预料不到的技术效果。

[0044] 由于丹酚酸 A 组合物含量较低，经转化后丹酚酸 A 组合物含量大提高，但还含大量杂质，因此，分别选择了弱极性和非极性大孔吸附树脂进行粗分离，再选择聚酰胺、溶剂萃取、硅胶分离，并对不同流份进行测定，去除杂质部分后，将丹酚酸 A 组合物中的丹酚酸 A 含量从 10％左右提高到 80％，至 90％，至 93％，至 96％。

[0045] 进一步，在显著提高转化率的同时，本发明通过适于实际产业应用的纯化步骤，尤其是通过一系列的分离、洗脱处理等步骤后，没有采用传统的常温干燥，并从真空干燥、喷雾干燥、微波真空干燥方法中优选了微波真空干燥，从而彻底克服了以往干燥温度过高，干

燥时间过长，对丹酚酸 A 组合物的破坏大的缺陷；以及冷冻干燥时间过长，成本极高且冷冻干燥所得的组合物有机溶剂残留严重的问题。

[0046] 本发明丹酚酸A组合物中除主要含丹酚酸A外，还含少量丹酚酸B、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C；丹酚酸 A 通过清除自由基，减轻膜脂质过氧化引起的流动性和通透性变化，阻止离子的异常通透和酶的漏出，从而降低了由于脑缺血再灌注而引起的损伤，对脑缺血有保护作用。丹酚酸 A 组合物可剂量依赖性地抑制腺苷二磷酸 (ADP)、凝血酶、花生四烯酸、胶原或 U46619 诱导的血小板聚集，降低血小板中 cAMP 水平，以及减少 ADP 引起的血小板 P 选择素的表达和纤维蛋白原结合，从而阻止 ADP 引起的血小板白细胞聚集，对动脉粥样硬化及栓塞形成有防治作用；丹酚酸 A 组合物改善大鼠大脑中动脉阻塞模型大鼠神经功能缺陷状态，缩小梗塞面积，减轻脑水肿，降低相关脑区神经元损伤程度，对脑缺血损伤有保护作用，对学习记忆损伤的保护作用。

[0047] 丹酚酸 A 组合物中的丹酚酸 B 是丹参及其制剂丹参注射液、香丹注射液的主要有效成分，与丹酚酸 A 组合物一样对脑缺血有保护作用，对动脉粥样硬化及栓塞形成有防治作用；对脑缺血损伤有保护作用，紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C 作用与丹酚酸 A 类同，均有较强的抗氧化作用，能清除氧自由基，抑制脂质过氧化反应，其作用强度高于维生素 C、维生素 E，是目前已知的抗氧化作用最强的天然产物之一，明显抑制 ADP、花生四烯酸、胶原诱导的家兔血小板的聚集反应，及抑制血栓形成的作用，并能延长缺氧条件下动物的存活时间。能明显改善脑缺血再灌损伤大鼠的神经功能缺陷，改善行为障碍，明显缩小脑梗死面积，明显改善 $FeCl_3$ 所致的大鼠脑缺血造成的动物神经功能损伤，使其障碍的改善，并能缩小脑梗死面积；迷迭香酸还有助于防止自由基造成的细胞受损，因此降低了癌症和动脉硬化的风险。

[0048] 丹酚酸 A 组合物中的紫草酸还有抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移，预防动脉粥样硬化、血管狭窄和血管内膜增生，具有扩血管作用。能抑制尿酸和过超氧阴离子自由基的形成、抑制过氧化物的产生，有消炎和降尿酸的作用。体外能抑制促黄体激素释放的作用。

[0049] 丹酚酸 A 组合物中的丹酚酸 C 还通过抑制微管蛋白聚合诱导细胞有丝分裂阻滞从而诱导凋亡，具有抗肿瘤细胞增殖活性。

[0050] 丹酚酸 A 组合物中的丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C 组合后具有共同的对脑血管有保护作用、对动脉粥样硬化及栓塞形成有防治作用、对脑缺血损伤有保护作用，使其比丹酚酸 A 单体化合物单独使用作用更强，同时还有消炎和降尿酸的作用、降低了癌症和动脉硬化的风险。

[0051] 另一方面，本发明还提供了其用于预防和或治疗缺血性脑血管病方面的用途，并且通过大量实验证明：

[0052] 经过实验数据对比可知，易卒中型肾血管性高血压大鼠大脑中动脉阻塞 (MCAO) 术后麻醉苏醒评分，模型组苏醒后 (12h 内) 的神经行为评分 (自发活动、四肢运动的对称性、前肢伸展爬行动作的对称性、爬笼壁、推躯干反应、触须对刺激的反应等) 显著低于假手术组，说明脑血栓缺血后易卒中型肾血管性高血压大鼠 (RHRSP) 神经功能受损严重，且在持续的 72h 内，神经行为评分持续明显低于假手术组；尼莫地平组和丹酚酸 A 单体化合物组以及丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组相比，大鼠苏醒后的神经行为有不同程度的升高，以尼莫地平组以及丹酚酸 A 组合物中、高剂量组最为明显，且其缺血后 24h 的神经行为已基本接近假手术组水平；至缺血后 72h 丹酚酸 A 组合物各剂量组大鼠神经行为已恢复正

常，且同剂量丹酚酸A组合物组大鼠的整体状态比丹酚酸A单体化合物组恢复得快且稍好，神经行为有更优的趋势。提示丹酚酸A组合物能改善RHRSP脑血栓缺血后神经行为，具有保护及改善脑缺血后神经症状的作用，效果优于尼莫地平，且有优于同剂量丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0053] 经过脑组织病理检查实验数据对比可知，假手术组脑组织双侧对称，未见病变，模型组血管内血栓附着严重。与模型组比较，镜下观察丹酚酸A组合物各剂量组大鼠缺血侧大脑中动脉（MCA）局部血栓的长度缩短，在动脉壁附着面积减小，以高、中剂量组最为明显。TTC染色可见梗死脑组织呈白色，丹酚酸A组合物各剂量组中被染成白色的脑组织范围比模型对照组显著缩小。HE染色可见模型组缺血侧皮层MCA供血区（以额顶皮质为中心）梗死灶内有明显的脑组织软化，细胞坏死，局部坏死组织脱落等现象，丹酚酸A组合物高剂量组大鼠此处未见组织萎缩脱落现象；丹酚酸A组合物各剂量组和模型对照组的HE染色显示灶内、灶周均有小血管增生，但是丹酚酸A组合物各剂量组与模型组比较增生的小血管数目显著增多；另外，HE染色显示模型对照组可见大小不等的灶状出血，丹酚酸A组合物高、中剂量组并无发现有灶状出血现象。结果显示丹酚酸A组合物能明显改善RHRSP脑血栓缺血后脑组织病理状态，降低血栓附着面积、减少梗死面积，增加梗死区内及周围脑组织的小血管数、减少脑出血现象、从而保护脑组织坏死脱落，具有保护脑血栓缺血致脑组织损伤的作用，且优于丹酚酸A单体化合物。

[0054] 经过实验数据对比可知，脑血栓后脑组织血脑屏障破坏，通透性增加，伊文思蓝（EB）结合白蛋白可通过开放的血脑屏障（BBB）进入脑组织。丹酚酸A组合物给药后，各剂量组大鼠脑组织显微镜下EB光斑数以及脑组织EB检出含量明显减少，且少于同剂量的丹酚酸A单体化合物组，与模型组比较均有显著差异，说明丹酚酸A组合物对脑组织损伤致血脑屏障通透性增加具有抑制作用，能保护血脑屏障，而保护脑组织进一步受损伤，作用效果强于丹酚酸A单体化合物。

[0055] 经过实验数据对比可知，通过对RHRSP脑血栓大鼠模型组比较，假手术组未见梗死脑组织；丹酚酸A组合物各剂量组脑组织梗死体积及脑含水量明显小于模型对照组，且剂量越大，梗死体积越小，脑含水量越少。丹酚酸A组合物低、中、高剂量组梗死体积及脑含水量均低于尼莫地平组；且比同剂量的丹酚酸A单体化合物组要低。说明丹酚酸A组合物可加速病灶的修复，减小RHRSP脑血栓后缺血脑组织梗死范围，减轻脑组织水肿，具有修复和保护缺血后脑组织损伤的作用，优于丹酚酸A单体化合物及尼莫地平。

[0056] 经过实验数据对比可知，与RHRSP脑血栓缺血模型组比较，缺血治疗后，丹酚酸A组合物各剂量组脑组织缺血半暗带区MVD和血管场面积不同程度地显著增高，较尼莫地平和同剂量丹酚酸A单体化合物更为明显，且7d内比较稳定。表明丹酚酸A组合物能增加脑组织缺血半暗带的MVD和血管场面积比，提示丹酚酸A组合物有促进缺血脑组织微血管新生和侧枝循环建立的作用，且效果优于丹酚酸A单体化合物和尼莫地平。

[0057] 经过实验数据对比可知，RHRSP脑血栓缺血模型组血管内皮生长因子信使核糖核酸（VEGFmRNA）表达水平较假手术组有明显升高，说明脑组织缺血缺氧后能刺激脑组织内VEGF的表达增加，提示脑梗死后机体自身会出现一种对抗缺血性损伤的保护性反应，使VEGF的表达增加，在缺血后出现自身“代偿性血管再生”。丹酚酸A组合物各剂量组与模型组组比较，VEGFmRNA表达水平显著升高，表明丹酚酸A组合物能显著促进缺血脑组织血管

新生，促进侧枝循环代偿的建立，挽救缺血半暗带，保护缺血导致的脑组织损伤，且存在一定的量效关系，有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物的趋势。

[0058] 经过实验数据对比可知，RHRSP 脑血栓缺血模型组大鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 蛋白表达较假手术组有明显升高，但随缺血时间的延长，有下降的趋势，提示脑组织缺血缺氧后，机体自身产生短暂的保护应激反应，可刺激脑组织 bFGF 蛋白表达增加。丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组比较，各时间段的 bFGF 蛋白表达显著增高；各剂量组自身各时间段比较显示，bFGF 蛋白表达持续稳定；提示丹酚酸 A 组合物能增加缺血脑组织原发和继发 bFGF 蛋白表达，具有很好的神经细胞保护作用和促进血管生成的作用，有助于侧枝循环的建立，挽救缺血半暗带，且作用效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0059] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物能减轻脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损症状，有利于其神经行为的恢复，丹酚酸 A 组合物具有改善脑组织损伤后神经功能的作用，且作用效果比丹酚酸 A 单体化合物明显。

[0060] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物各剂量组与缺血再灌注损伤模型组相比：脑梗死体积比显著减少，脑指数以及脑含水量均明显减少，表明丹酚酸 A 组合物能减少脑缺血再灌注大鼠脑组织梗塞范围，能减轻脑缺血再灌注损伤后的脑组织水肿程度，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0061] 经过实验数据对比可知，局灶性脑缺血大鼠，给予不同剂量丹酚酸 A10min 始，各药物组较自身给药前缺血半暗带局部脑血流量 (rCBF) 有明显上升，且以丹酚酸 A 组合物高、中剂量组尤为显著；丹酚酸 A 组合物各剂量组相比，有良好的量效关系；丹酚酸 A 组合物中剂量组各时段的 rCBF 与尼莫地平组相当。由此可知，丹酚酸 A 组合物有增加脑缺血大鼠脑组织缺血半暗带 rCBF 的作用，有利于挽救缺血半暗带濒临死亡的脑组织，发挥治疗脑缺血的作用，且有优于丹酚酸 A 单体化合物的趋势。

[0062] 经过实验数据对比可知，在大鼠持续缺血 2h 恢复再灌后，各组大鼠缺血半暗带 rCBF 均有不同程度的增加。但局灶性脑缺血再灌模型组大鼠缺血再灌 3h 内血流灌注极不稳定，在恢复再灌 1 ～ 1.5h 内，缺血半暗带 rCBF 升至最高水平，但仍在缺血前的 50％以下，脑组织仍呈低灌注状态，且此后又急剧下降至缺血前 40％以下，脑组织因再灌而加剧受损。而再灌后，尼莫地平、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组大鼠 rCBF 明显增高，各时间段 rCBF 与模型组相比都有极显著差异。再灌后 1h，尼莫地平和丹酚酸 A 组合物高剂量组 rCBF 恢复至接近原 rCBF 的 76％、丹酚酸 A 组合物中剂量组恢复至约为原 rCBF 的 70％，尼莫地平组恢复至约为原 rCBF 的 69％，10mg/kg 丹酚酸 A 单体化合物组恢复至原 rCBF 的 65％左右，丹酚酸 A 组合物低剂量组恢复至约为原 rCBF 的 62％，且至再灌注 3h 内，各药物组 rCBF 都维持在相对稳定的范围内。结果表明丹酚酸 A 组合物能明显改善大鼠缺血再灌注后缺血半暗带脑组织的脑血流量，恢复脑细胞血供，从而挽救缺血半暗带，防止脑组织进一步损伤甚至死亡，且效果优于丹酚酸 A 单体化合物，对缺血性脑血管病有很好的治疗作用。

[0063] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物能升高缺血脑组织三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、(单磷酸腺苷)AMP、磷酸肌酸 (PC) 的含量，降低脑组织乳酸 (LA) 含量，能显著改善大鼠脑缺血以及缺血再灌注的能量代谢。丹酚酸 A 组合物可通过改善缺血后脑组织的能量代谢，增加脑组织能量物质的供应，增强脑细胞的生存能力，挽救脑缺血后的缺血半暗带濒临死亡的脑细胞，防止脑组织进一步损伤甚至死亡，且作用效果较丹酚酸 A 单体

化合物和尼莫地平明显，可很好地用于治疗缺血性脑血管病。

[0064] 经过实验数据对比可知，大鼠脑缺血 2h 再灌 24h 后，神经细胞凋亡严重；而尼莫地平和不同剂量丹酚酸 A 组合物干预后，与模型组比较，大鼠脑组织内神经细胞凋亡显著减少（$P < 0.001$ 或 $P < 0.01$）；且以丹酚酸 A 组合物高、中剂量组的凋亡率最低；表明丹酚酸 A 组合物具有抑制脑缺血损伤大鼠脑组织神经元死亡、抑制神经细胞凋亡的作用，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0065] 神经营养因子是神经元生长与存活必需的一组蛋白质分子，对神经元生长、发育以及功能的完整性起支持作用。神经生长因子（NGF）、脑源性神经营养因子（BDNF）、神经营养因子 -3（NT-3）是神经营养因子家族的一部分，可以维持神经元存活和促进神经细胞分化和诱导轴突生长；能保护神经元、促进神经元修复以及抑制迟发性神经元死亡，从而对抗脑缺血、保护脑缺血损伤。大鼠脑缺血再灌后，大鼠脑组织内较假手术组有所增高，提示脑缺血再灌损伤后，脑组织内 NGF、BDNF 表达应激保护性增加；但缺血后脑组织内 NT-3 含量明显减少。经过实验数据对比可知，与模型对照组比较，丹酚酸 A 组合物各剂量组 NGF、BDNF、NT-3 蛋白表达均明显增强，且有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物以及尼莫地平的趋势。提示丹酚酸 A 组合物能增强缺血损伤脑组织内源性神经营养因子 NGF、BDNF、NT-3 的表达，为神经元存活提供条件，而达到神经元保护的作用。

[0066] 大鼠脑缺血再灌注后，脑组织内炎症细胞因子白细胞介素 -1β（IL-1β）、白细胞介素 -6（IL-6）、白细胞介素 -8（IL-8）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、细胞间粘附分子 -1（ICAM-1）含量均极显著增加；经过实验数据对比可知，给予丹酚酸 A 组合物各剂量组的大鼠脑组织各炎症细胞因子含量较模型组明显降低，且较同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组以及尼莫地平组显著。提示丹酚酸 A 组合物可以抑制缺血损伤脑组织炎症细胞因子的表达，抑制脑组织炎症反应的发生，抑制炎性反应介导的神经元及脑组织级联损伤，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0067] 细胞内 Ca^{2+} 超载是脑缺血过程中介导继发性脑损害的重要机理之一，是缺血、缺氧产生不可逆神经元损伤的最后共同途径。Ca^{2+} 超载可通过激发作为第二信使的激活蛋白酶、激活磷脂酶、激活内切核酸酶等一系列酶反应对细胞产生损害，诱导细胞凋亡，导致急性细胞死亡和迟发性神经元坏死。K^+、Mg^{2+} 均为 Ca^{2+} 拮抗剂。K^+ 作为神经细胞极化状态必不可少的阳离子，可以抑制钙离子的内流进而减轻钙超载；Mg^{2+} 可激活机体内多种酶系，在脑组织内参与细胞多种重要的代谢活动，影响神经传导、离子转运、蛋白合成及能量代谢诸多方面，能缓解血管平滑肌的痉挛，改善微循环，改善脑损伤后缺血缺氧，阻滞颅脑损伤后神经细胞内钙超载。经过实验数据对比可知，脑缺血再灌注模型组与假手术组比较脑组织 Ca^{2+} 含量极显著增高，K^+、Mg^{2+} 含量显著降低；与模型组比较，尼莫地平组、丹酚酸 A 单体化合物组和丹酚酸 A 组合物各剂量组能显著降低脑组织中 Ca^{2+} 含量、升高 K^+、Mg^{2+} 含量，且以丹酚酸 A 组合物效果最为显著。说明丹酚酸 A 组合物能抑制 Ca^{2+} 内流减轻钙超载，从而可抑制 Ca^{2+} 超载诱导的神经元细胞凋亡。

[0068] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物能明显提高脑缺血再灌注损伤大鼠的大脑皮层和纹状体单胺类递质 5- 羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）的含量，升高大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织中 γ- 氨基丁酸（GABA）、牛磺酸（Tau）含量、显著降低脑组织中谷氨酸（Glu）、天门冬氨酸（Asp）、甘氨酸（Gly）的含量以及氨基酸兴奋毒性指数。且剂

量增加，作用增强。结合脑组织病理病理学检查显示的丹酚酸A组合物能明显减轻脑水肿，改善神经元细胞形态的结果，表明丹酚酸A组合物能抑制单胺类神经递质过度释放，改善单胺类神经进质紊乱；抑制脑缺血再灌注中兴奋性氨基酸的堆积，稳定兴奋性氨基酸－抑制性氨基酸递质的平衡，减轻兴奋性氨基酸毒性；从而抑制单胺类神经递质紊乱和兴奋性氨基酸毒性诱导的神经元细胞凋亡，且效果较同剂量丹酚酸A单体化合物以及尼莫地平更具有优势。

[0069] 经过实验数据对比可知，丹酚酸A组合物各剂量组与缺血再灌注模型组相比，大鼠脑组织中脂质过氧化物(LPO)含量显著降低，且低于同剂量的丹酚酸A单体化合物组；超氧化物歧化酶(SOD)以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著升高，且有高于同剂量丹酚酸A单体化合物组的趋势，效果较尼莫地平组也更明显；说明丹酚酸A组合物能增加缺血再灌注损伤脑组织中过氧化物清除酶的活性、抑制过氧化物的产生，从而对抗氧自由基对神经元细胞和脑组织的损伤，其抗氧化作用有优于同剂量的丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0070] 经过实验数据对比可知，脑血栓缺血模型组各时间段的脑血管内皮细胞凋亡数目显著高于假手术组，脑组织缺血后6h，内皮细胞凋亡就已明显增多，至缺血后24小时达高峰。与模型组比较，丹酚酸A组合物各剂量组的各时间段的细胞凋亡数显著减少，且少于同剂量的丹酚酸A单体化合物和尼莫地平组。说明丹酚酸A组合物能抑制脑缺血后脑血管内皮细胞凋亡，提高脑血管内皮细胞存活率，从而保证脑血管内皮细胞功能的正常，维持缺血损伤后脑血管结构和功能的完整而增强对抗脑缺血损伤的能力，发挥治疗缺血性脑血管病作用。

[0071] 经过实验数据对比可知，经丹酚酸A组合物和尼莫地平作用后，缺氧及缺氧－复氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞存活率显著升高，且丹酚酸A组合物组存活率显著高于尼莫地平组，且比同剂量的丹酚酸A单体化合物组的细胞存活率也要高。提示丹酚酸A组合物能保护脑微血管内皮细胞缺氧及缺氧－复氧损伤，增强其耐缺氧能力，提高缺氧损伤以及缺氧－复氧损伤的脑微血管内皮细胞存活率，且优于尼莫地平和丹酚酸A单体化合物。

[0072] 经过实验数据对比可知，缺氧－复氧损伤，能造成大鼠脑微血管内皮细胞各期凋亡率显著增加。与模型组比较，丹酚酸A组合物各剂量组、丹酚酸A单体化合物组及尼莫地平组均可显著减低细胞早、晚期及总凋亡率；丹酚酸A组合物各剂量组之间且呈一定的量效关系。且丹酚酸A组合物10μmol/L剂量组与尼莫地平40μmol/L剂量组效果相当，同剂量的丹酚酸A组合物优于丹酚酸A单体化合物。提示丹酚酸A组合物具有良好的抗缺氧－复氧损伤导致的大鼠脑微血管内皮细胞凋亡的作用。

[0073] 不同剂量丹酚酸A组合物、丹酚酸A单体化合物和尼莫地平组作用后，缺氧－复氧损伤的大鼠脑微血管内皮细胞分泌组织纤维酶原激活物(t-PA)和一氧化氮(NO)的分泌量较模型组显著升高($P<0.01$或$P<0.001$)，其中丹酚酸A组合物中、高剂量组升至接近正常对照组水平；各给药组t-PA/PAI和NO/ET比值也较模型组显著提高。实验结果提示丹酚酸A组合物能改善缺氧－复氧损伤后脑微血管内皮细胞的分泌功能，作用效果显著优于尼莫地平，且有优于同剂量丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0074] 缺氧－复氧损伤后，BMVEC胞内Ca^{2+}浓度显著增高。经过实验数据对比可知，与模型组比较，各药物组Ca^{2+}浓度极显著降低，以丹酚酸A组合物中、高剂量组效果最为显著，且细胞内钙离子浓度显著低于尼莫地平40μmol/L剂量组，且优于同剂量的丹酚酸A单体化

合物。提示丹酚酸 A 组合物具有抑制缺氧 - 复氧损伤致 BMVEC 胞内 Ca^{2+} 浓度的作用。

[0075] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物对大鼠动脉血栓形成时间的影响与生理盐水对照组比较，丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组的血栓形成时间显著延长；低剂量组 (0.5mg/kg) 血栓形成时间与 20mg/kg 阿司匹林组相当；中剂量组比同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组血栓形成时间延长；表明丹酚酸 A 组合物能延长血栓形成时间，预防动脉血栓的形成，预防血栓而致的缺血性脑血管病。

[0076] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物对大鼠血栓形成的影响与生理盐水组比较，丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组大鼠血栓湿、干重均显著减轻。且低剂量组与 20mg/kg 阿司匹林组效果相当。说明丹酚酸 A 组合物具有很好的抑制血栓形成的作用，能用于预防或治疗血栓所致的缺血性脑血管病，且比丹酚酸 A 单体化合物效果明显。

[0077] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物对大鼠静脉栓塞的影响与生理盐水组比较，丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组大鼠静脉血栓湿、干重显著减轻，低剂量组 (0.5mg/kg) 与 20mg/kg 阿司匹林组效果相当 ($P > 0.05$)；中剂量组较同剂量的丹酚酸 A 单体化合物效果明显。表明丹酚酸 A 组合物有抑制静脉血栓形成的作用，可用于预防急性缺血性脑血管病发生后的静脉血栓栓塞。

[0078] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物对大鼠体外血栓形成与生理盐水组比较，丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组大鼠体外血栓形成的长度显著缩短，血栓湿、干重显著减轻，低剂量组 (0.5mg/kg) 与 20mg/kg 阿司匹林组效果相当；表明丹酚酸 A 组合物对体外血栓形成具有较好的抑制作用，且有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物的趋势。

[0079] 经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物对体内已形成的血栓的影响与生理盐水组比较，生理盐水组均持续栓塞，且无出现再通现象；各药物组持续栓塞的动物数少，与生理盐水组相比均有极显著差异；丹酚酸 A 组合物中剂量组，其血管开放程度与 5mg/kg 丹酚酸 A 单体化合物组及 2000U/kg 尿激酶组相似，其再通率相当，但其血管开放状态较丹酚酸 A 单体化合物和尿激酶组有更稳定的趋势；丹酚酸 A 组合物高剂量组持续再通率以及再通率均高于尿激酶组，且再栓率明显低于尿激酶组；丹酚酸 A 组合物低剂量组再通率虽低于尿激酶组，但其再栓率与尿激酶组相当，且有低于尿激酶再栓率的趋势。说明丹酚酸 A 组合物有较好的溶栓以及防止溶栓后再栓塞的作用，且作用较稳定。

[0080] 脑血栓后，大鼠全血粘度、血浆粘度显著增高，红细胞压积也显著升高，经过实验数据对比可知，丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组比较，其全血粘度和血浆粘度以及红细胞压积均明显降低；结果提示丹酚酸 A 组合物能加快微血流流速，降低血液粘度，改善血液流变学而有效对抗脑血栓的作用，且较尼莫地平组效果更显著，亦有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物的趋势。

[0081] 缩上所述，本发明的丹酚酸 A 组合物对缺血性脑血管病具有明显的治疗效果，本发明中所述缺血性脑血管病包括各种病因形成的影响脑循环的病变及其导致的以神经元死亡和神经功能的缺损为主的缺血性脑组织损害。主要包括一下的任何一种或几种：(1) 脑血栓：由来自心脏的栓子如人工瓣膜、房颤、心室血栓、扩张性心肌病、动 / 静脉血管炎等形成栓子随血液流入脑部血管，导致构成整个脑部血循环的前循环和后循环的各级血管的任何一部位和 / 或多部位血栓。(2) 脑缺血再灌注损伤 (3) 脑栓塞。(4) 颅外颈动脉和脑基底动脉的粥样硬化或狭窄 (5) 腔隙性脑梗塞。(6) 短暂性脑缺血性发作 (7) 血管性痴呆。

[0082] 医学和药学研究人员无法预先在不做相关实验的前提下，预先得知丹酚酸 A 组合物具有上述的良好用途。

附图说明

[0083] 图 1. 丹酚酸 A 核磁共振氧谱图；

[0084] 图 2. 丹酚酸 A 核磁共振碳谱图；

[0085] 图 3. 紫草酸核磁共振氢谱图；

[0086] 图 4. 紫草酸核磁共振碳谱图；

[0087] 图 5. 迷迭香酸核磁共振氢谱图；

[0088] 图 6. 迷迭香酸核磁共振碳谱图；

[0089] 图 7. 丹酚酸 B 核磁共振氢谱图；

[0090] 图 8. 丹酚酸 B 核磁共振碳谱图；

[0091] 图 9. 丹酚酸 C 核磁共振氢谱图；

[0092] 图 10. 丹酚酸 C 核磁共振碳谱图；

[0093] 图 11. 混合对照品溶液 HPLC 图；

[0094] 图 12. 紫草酸对照品溶液 HPLC 图；

[0095] 图 13. 迷达香酸对照品溶液 HPLC 图；

[0096] 图 14. 丹酚酸 B 对照品溶液 HPLC 图；

[0097] 图 15. 丹酚酸 A 对照品溶液 HPLC 图；

[0098] 图 16. 丹酚酸 C 对照品溶液 HPLC 图；

[0099] 图 17. 丹酚酸 A 组合物样品 HPLC 图；

具体实施方式

[0100] 实施例 1

[0101] 取丹参药材，粉碎成 6 目颗粒，每次加 7 倍量 92℃水，温浸提取 3 次，同时以 25 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.20(60℃)，加入乙醇使含醇量在 70％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B20mg，水溶液用 10％氢氧化钠调 pH 至 4.0，加入 0.5％ $ZnCl_2$ 作为催化剂，120℃温度加热转化 4 小时，转化液用 20％磷酸调 pH 值至 2.5，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A3mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样最与大孔吸附树脂比为 1 ： 50，树脂柱径高比为 1 ： 10，分别用 3 倍柱体积水、5 倍柱体积 25％乙醇洗脱，除去杂质，再用 4 倍柱体积 40％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 40％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 5mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 10，树脂柱径高比为 1 ： 8，分别用 3 倍柱体积水、12 倍柱体积 40％乙醇溶液洗脱除杂，再用 8 倍柱体积 60％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 60％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A15mg 水溶液；水溶液用 20％磷酸调 pH 至 2.5，用水溶液 3 倍量的叔丁基甲基醚，分 3 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.5g 的萃取液，加入 1 ～ 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 15 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 10，以正戊烷 - 叔丁基甲基醚为洗

脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷：叔丁基甲基醚（4 ： 6）洗脱 10 倍柱体积，正戊烷：叔丁基甲基醚（6 ： 4）洗脱 10 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 12 倍量水溶解，用微波真空干燥（干燥温度 50℃，回差温度 4℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 60KW）130 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0102] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.57%，紫草酸含量 0.663%；迷迭香酸含量 1.16%；丹酚酸 B 含量 1.24%；丹酚酸 C 含量 1.48%。

[0103] 实施例 2

[0104] 取丹参药材，粉碎成直径约 2mm 颗粒，每次加 7 倍量 90℃水，温浸提取 3 次，同时以 25 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.17(60℃)，加入乙醇使含醇量在 70%，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B20mg，水溶液用 10%氢氧化钠调 pH 至 3.5，加入 0.5% $ZnCl_2$ 作为催化剂，120℃温度加热转化 4 小时，转化液用 20%磷酸调 pH 值至 2.5，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A3mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 50，树脂柱径高比为 1 ： 10，分别用 3 倍柱体积水、5 倍柱体积 25%乙醇洗脱，除去杂质，再用 4 倍柱体积 40%乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 40%乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 5mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 10，树脂柱径高比为 1 ： 8，分别用 3 倍柱体积水、12 倍柱体积 40%乙醇溶液洗脱除杂，再用 8 倍柱体积 60%乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 60%乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A15mg 水溶液；水溶液用 20%磷酸调 pH 至 2.5，用水溶液 3 倍量的的叔丁基甲基醚，分 3 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.5g 的萃取液，加入 1 ～ 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 15 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 10，以正戊烷 - 叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚（4 ： 6）洗脱 10 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚（6 ： 4）洗脱 10 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 10 倍量水溶解，用微波真空干燥（干燥温度 60℃，回差温度 2℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 40KW）110 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0105] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.63%，紫草酸含量 0.69%；迷迭香酸含量 1.12%；丹酚酸 B 含量 1.20%；丹酚酸 C 含量 1.48%。

[0106] 实施例 3

[0107] 取丹参药材，切成饮片，每次加 8 倍量 85℃水温浸提取 3 次，同时以 20 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 2.5 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.18(60℃)，加入乙醇使含醇量在 75%，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B15mg，水溶液用 10%氢氧化钾调 pH 至 5.0，加入 0.6% $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 120℃温度加热转化 3.5 小时，转化液用 15%盐酸调 pH 值至 2.5，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A5mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 45，树脂柱径高比为 1 ： 8，分别用 3.5 倍柱体积水、4 倍柱体积 25%乙醇洗脱，除去杂质，再用 5 倍柱体积 45%乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 45%乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 5mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 9，树脂柱径高比为 1 ： 7，分别用 4 倍柱体积水、10 倍柱体

积 40％乙醇溶液洗脱除杂，再用 8 倍柱体积 65％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 65％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A12mg 水溶液；水溶液用 15％盐酸调 pH 至 2.6，用 4 倍量的叔丁基甲基醚，分 4 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.8g 的萃取液，加入 2 ～ 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 13 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 8，以正戊烷叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 8 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 8 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 8 倍量水溶解，用微波真空干燥（干燥温度 50℃，回差温度 5℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 80KW)90 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0108] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.68％，紫草酸含量 0.68％；迷迭香酸含量 1.07％；丹酚酸 B 含量 1.19％；丹酚酸 C 含量 1.47％。

[0109] 实施例 4

[0110] 取丹参药材，粉碎成直径约 2mm 颗粒，每次加 9 倍量 85℃水温浸提取 2 次，同时以 30 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3.5 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.20(60℃)，加入乙醇使含醇量在 75％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B18mg，水溶液用 10％碳酸钠调 pH 至 5.2，加入 0.6％ $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 123℃温度加热转化 4.5 小时，转化液用 15％硝酸调 pH 值至 2.8，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A6mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 40，树脂柱径高比为 1 ： 7，分别用 4 倍柱体积水、4 倍柱体积 25％乙醇洗脱，除去杂质，再用 5 倍柱体积 40％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 40％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 6mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 8，树脂柱径高比为 1 ： 8，分别用 4 倍柱体积水、9 倍柱体积 40％乙醇溶液洗脱除杂，再用 7 倍柱体积 65％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 65％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A10mg 水溶液；水溶液用 15％硝酸调 pH 至 2.6，用 4 倍量的叔丁基甲基醚，分 4 次萃取，分离有机层，减压回收乙酸甲酯，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.7g 的萃取液，加入 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 10 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 7，以正戊烷 - 叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 8 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 9 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 8 倍量水溶解，用微波真空干燥（干燥温度 70℃，回差温度 1℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 20KW)100 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0111] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.72％，紫草酸含量 0.62％；迷迭香酸含量 1.10％；丹酚酸 B 含量 1.28％；丹酚酸 C 含量 1.46％。

[0112] 实施例 5

[0113] 取丹参药材，切成饮片，每次加 10 倍量 80℃水温浸提取 3 次，同时以 15 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.19(60℃)，加入乙醇使含醇量在 70％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B20mg，水溶液用 10％碳酸氢钠调 pH 至 4.4，加入 0.8％ $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 128℃温度加热转化 4.0 小时，转化液用 20％硫酸调 pH 值至 2.6，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A5mg，

经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 40，树脂柱径高比为 1 ： 7，分别用 4 倍柱体积水、4 倍柱体积 25％乙醇洗脱，除去杂质，再用 5 倍柱体积 40％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 40％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 6mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 10，树脂柱径高比为 1 ： 15，分别用 4 倍柱体积水、7 倍柱体积 35％乙醇溶液洗脱除杂，再用 6 倍柱体积 60％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酸 A 的 60％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A12mg 水溶液；水溶液用 20％硫酸调 pH 至 2.8，用 4 倍量的叔丁基甲基醚，分 4 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.5g 的萃取液，加入 2.5 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 9 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 8，以正戊烷：叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 8 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 8 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 10 倍量水溶解，用微波真空干燥 (干燥温度 50℃，回差温度 2℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 30KW)110 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0114] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 96.13％，紫草酸含量 0.55％；迷迭香酸含量 1.00％；丹酚酸 B 含量 1.02％；丹酚酸 C 含量 1.34％。

[0115] 实施例 6

[0116] 取丹参药材，粉碎成直径约 2mm 颗粒，每次加 9 倍量 85℃水温浸提取 3 次，同时以 20 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 2.5 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.25(60℃)，加入乙醇使含醇量在 70％，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B10mg，水溶液用 20％柠檬酸钠调 pH 至 5.5，加入 0.4％ $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 132℃温度加热转化 3.5 小时，转化液用 20％醋酸调 pH 值至 2.6，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A5mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 35，树脂柱径高比为 1 ： 8，分别用 3 倍柱体积水、4.5 倍柱体积 25％乙醇洗脱，除去杂质，再用 6 倍柱体积 40％乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 40％乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 8mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 12，树脂柱径高比为 1 ： 18，分别用 4 倍柱体积水、8 倍柱体积 30％乙醇溶液洗脱除杂，再用 5 倍柱体积 65％乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 65％乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A15mg 水溶液；水溶液用 20％醋酸调 pH 至 2.7，用 5 倍量的叔丁基甲基醚，分 5 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.5g 的萃取液，加入 2 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 10 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 10，以正戊烷、叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 8 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 8 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 12 倍量水溶解，用微波真空干燥 (干燥温度 65℃，回差温度 5℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 90KW)80 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0117] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.64％，紫草酸含量 0.69％；迷迭香酸含量 1.05％；丹酚酸 B 含量 1.11％；丹酚酸 C 含量 1.47％。

[0118] 实施例 7

[0119] 取丹参药材，粉碎成直径约 2mm 颗粒，每次加 9 倍量 88℃水温浸提取 3 次，同时以 22 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3.5 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.23(60℃)，加入乙醇使含醇量在 75%，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B13mg，水溶液用 10%氢氧化钠调 pH 至 3.6，加入 0.5% $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 133℃温度加热转化 4.5 小时，转化液用 10%盐酸调 pH 值至 2.7，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A5mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 40，树脂柱径高比为 1 ： 9，分别用 4 倍柱体积水、4 倍柱体积 22%乙醇洗脱，除去杂质，再用 6 倍柱体积 43%乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 43%乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 ml 含 10mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 15，树脂柱径高比为 1 ： 20，分别用 4 倍柱体积水、8 倍柱体积 30%乙醇溶液洗脱除杂，再用 5 倍柱体积 60%乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 60%乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A12mg 水溶液；水溶液用 10%盐酸调 pH 至 2.8，用 5 倍量的叔丁基甲基醚，分 5 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.5g 的萃取液，加入 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 12 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 10，以正戊烷、叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 6 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 7 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 10 倍量水溶解，用微波真空干燥 (干燥温度 55℃，回差温度 3℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 50KW)120 分钟，得丹酚酸 A 组合物。

[0120] 经测定，所述丹酚酸 A 组合物中丹酚酸 A 含量为 94.72%，紫草酸含量 0.70%；迷迭香酸含量 1.16%；丹酚酸 B 含量 1.24%；丹酚酸 C 含量 1.47%。

[0121] 实施例 8

[0122] 取丹参药材，切成饮片，每次加 9 倍量 90℃水温浸提取 3 次，同时以 25 转 / 分速度搅拌，每次温浸提取 3 小时；提取液减压浓缩至相对密度 1.08(60℃)，加入乙醇使含醇量在 75%，静置，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味；加水稀释至每 1ml 含丹酚酸 B20mg，水溶液用 10%碳酸钠调 pH 至 3.5，加入 1.0% $ZnCl_2$ 作为催化剂，在 135℃温度加热转化 4.5 小时，转化液用 15%硫酸调 pH 值至 3.0，离心，上清液减压浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A5mg，经 HPD-100 大孔树脂柱层析分离，丹酚酸 A 上样量与大孔吸附树脂比为 1 ： 36，树脂柱径高比为 1 ： 9，分别用 3 倍柱体积水、4 倍柱体积 25%乙醇洗脱，除去杂质，再用 5 倍柱体积 45%乙醇洗脱，HPLC 检测，收集含有丹酚酸 A 的 45%乙醇洗脱部分，减压回收乙醇并浓缩至无醇味；水溶液浓缩至每 1ml 含 6mg 丹酚酸 A 的溶液，通过聚酰胺层析柱分离，丹酚酸 A 上样量与聚酰胺比为 1 ： 10，树脂柱径高比为 1 ： 10，分别用 4 倍柱体积水、8 倍柱体积 45%乙醇溶液洗脱除杂，再用 8 倍柱体积 65%乙醇溶液洗脱，收集含有丹酚酸 A 的 65%乙醇溶液部分，减压回收乙醇并浓缩至每 1ml 含丹酚酸 A10mg 水溶液；水溶液用 15%硫酸调 pH 至 2.7，用 4 倍量的叔丁基甲基醚，分 4 次萃取，分离有机层，减压回收叔丁基甲基醚，制成每 1ml 含丹酚酸 A0.6g 的萃取液，加入 3 倍量硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的 10 倍量干硅胶柱上，硅胶柱径高比为 1 ： 8，以正戊烷、叔丁基甲基醚为洗脱剂，梯度洗脱，分别用正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (4 ： 6) 洗脱 8 倍柱体积，正戊烷 - 叔丁基甲基醚 (6 ： 4) 洗脱 8 倍柱体积，减压回收洗脱剂，回收有机溶剂后的丹酚酸 A 加 8 倍显水溶解，用微波真空干燥

(干燥温度 50℃,回差温度 2℃,真空度 -0.07Mpa 以上,微波功率 60KW)120 分钟,得丹酚酸 A 组合物。

[0123] 经测定,所述丹酚酸 A 组组合物中丹酚酸 A 含量为 94.84%,紫草酸含量 0.63%;迷迭香酸含量 1.12%;丹酚酸 B 含量 1.25%;丹酚酸 C 含量 1.47%。

[0124] 实验例 1:丹酚酸 A 组合物分析方法及分离、结构鉴定研究

[0125] 一、丹酚酸 A 组合物分析方法研究

[0126] 1. 仪器与试药

[0127] 仪器:Waters e2695 高效液相色谱仪,Empower2 色谱工作站,2998 二极管阵列检测器;Sartorius cp225D 十万分之一电子天平。

[0128] 色谱柱:YMC C_{18} 色谱柱(250×4.6mm,5μm);

[0129] 试剂:甲醇为色谱纯,水为 Millipore 制备的超纯水,其他试剂均为分析纯。

[0130] 迷迭香酸对照品、丹酚酸 B 对照品均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用;紫草酸对照品、丹酚酸 C 对照品均购自上海海灿生物科技有限公司,丹酚酸 A 对照品为自制,经纯度标化含量为 99.52%。

[0131] 2. 对照品溶液及供试品溶液的制备

[0132] 2.1 对照品溶液的制备:分别精密称取紫草酸对照品约 10.00mg、迷迭香酸对照品约 10.00mg、丹酚酸 B 对照品约 10.00mg、丹酚酸 C 对照品约 10.00mg、丹酚酸 A 对照品约 10.00mg,置不同 100ml 量瓶中,分别加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取紫草酸对照品、迷迭香酸对照品、丹酚酸 B 对照品、丹酚酸 C 对照品各 10ml,置不同 100ml 量瓶中,分别加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备溶液。精密吸取上述储备溶液各 10ml,置同一 100ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。

[0133] 2.3 供试品溶液的制备精密称取实施例 1 样品约 10.00mg,置 50ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,精密吸取 10ml 至 100ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

[0134] 3. 色谱条件与系统适用性试验

[0135] 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流速 1.0ml/min;检测波长:286nm;柱温 30℃;理论板数按丹酚酸 A 峰计算应不低于 10000。

[0136] 0 ~ 10 分钟时,甲醇的比例由 30%升至 40%,0.1 ~ 0.5%磷酸水溶液的比例由 70%降至 60%;10 ~ 30 分钟时,甲醇的比例由 40%升至 55%,0.1 ~ 0.5%磷酸水溶液的比例由 50%降至 45%;30 ~ 60 分钟时,甲醇的比例由 55%升至 80%,0.1 ~ 0.5%磷酸水溶液的比例由 45%降至 20%。

[0137] 在上述条件下,5 个对照品的色谱峰保留时间见表 1,HPLC 图谱见图 11 ~ 17。

[0138] 表 1. 各对照品的色谱峰保留时间结果

[0139]

组 分	保留时间(min)
紫草酸	19.352
迷迭香酸	20.525
丹酚酸 B	21.306
丹酚酸 A	26.106
丹酚酸 C	37.332

[0140] 4. 线性关系的考察

[0141] 精密吸取上述混合对照品溶液 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml，分别置 10ml 量瓶中，加甲醇稀释成系列标准溶液。精密吸取上述标准溶液各 10μl 注入液相色谱仪，按“3. 色谱条件与系统适用性试验”项下色谱条件计算峰面积，分别以峰面积积分值为纵坐标，各浓度对照品进样量为横坐标，绘制标准曲线。结果表明混合对照品溶液在如下范围内成良好的线性关系，见表 2。

[0142] 表 2. 混合对照品溶液线性关系结果

[0143]

组 分	回归方程	R^2	线性范围/μg
紫草酸	y=133388.26x+11.99	0.9997	0.001012~0.0506
迷迭香酸	y=2101205.94x+274.55	0.9995	0.001015~0.05075
丹酚酸 B	y=735129.3x+232.5	0.9993	0.000998~0.0499
丹酚酸 A	y=368492.28x-1397.29	0.9995	0.01002~0.501
丹酚酸 C	y=2618359.4x+3.45	0.9995	0.001016~0.0508

[0144] 5. 精密度试验

[0145] 取混合对照品溶液，照“3. 色谱条件与系统适用性试验”项下色谱条件测定，重复进样 6 次。结果表明该方法的精密度良好，见表 3。

[0146] 表 3 精密度试验结果

[0147]

组 分	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	平均峰面积	RSD（%）
紫草酸	1441	1438	1442	1445	1432	1451	1441	0.44
迷迭香酸	4364	4421	4451	4455	4438	4467	4432.7	0.84
丹酚酸 B	1513	1546	1527	1545	1552	1528	1535.2	0.97
丹酚酸 A	69831	69543	69277	69458	69326	68911	69391	0.44
丹酚酸 C	5428	5521	5526	5499	5501	5527	5500.3	0.68

[0148] 6. 稳定性试验

[0149] 取供试品溶液，照“3. 色谱条件与系统适用性试验”项下色谱条件测定，每隔一定时间进样一次，结果供试品溶液中各成分在 24 小时内峰面积无明显变化，表明供试品溶液的稳定性良好，见表 4。

[0150] 表 4 稳定性试验结果

[0151]

组 分	0h 峰面积	2h 峰面积	4h 峰面积	8h 峰面积	12h 峰面积	24h 峰面积	平均峰面积	RSD（%）
紫草酸	1492	1486	1501	1489	1496	1495	1493.2	0.36
迷迭香酸	2765	2728	2795	2738	2761	2750	2756.2	0.85
丹酚酸 B	2937	2933	2908	2946	2950	2899	2928.8	0.71
丹酚酸 A	3710558	3704167	3710228	3702059	3700576	3700605	3704698.8	0.12

[0152]

丹酚酸 C	3615	3620	3615	3689	3627	3657	3637.2	0.82

[0153] 7. 重复性试验

[0154] 取本丹酚酸 A 组合物，加甲醇制成供试品溶液 6 份，照“3. 色谱条件与系统适用性试验”项下色谱条件测定。结果表明该方法重复性良好，见表 5。

[0155] 表 5. 重复性试验结果

[0156]

组 分	含量 1 (%)	含量 2 (%)	含量 3 (%)	含量 4 (%)	含量 5 (%)	含量 6 (%)	平均含量 (%)	RSD (%)
紫草酸	0.65	0.66	0.67	0.64	0.66	0.65	0.66	1.60
迷迭香酸	1.03	1.05	1.02	1.05	1.01	1.04	1.03	1.58
丹酚酸 B	1.20	1.19	1.17	1.18	1.18	1.16	1.18	1.20
丹酚酸 A	94.51	94.83	95.02	94.11	94.24	94.28	94.50	0.38
丹酚酸 C	1.46	1.43	1.48	1.45	1.44	1.46	1.45	1.20

[0157] 8. 回收率试验

[0158] 采用加柱回收试验，取已知含量的丹酚酸 A 组合物 10mg，精密称定，平行 6 份，分别按各组分含量等比例加入相应的对照品溶液，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，测定并计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果表明该方法的准确度良好，见表 6。

[0159] 表 6. 回收率试验结果

[0160]

组分	含量(μg)	加入量 (μg)	测得总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率(%)	RSD (%)
紫草酸	0.105	0.102	0.204	97.06	97.71	1.22
	0.105	0.102	0.206	99.02		
	0.105	0.102	0.206	99.02		
	0.105	0.102	0.204	97.06		
	0.105	0.102	0.203	96.08		
	0.105	0.102	0.205	98.04		
迷迭香酸	5.87	5.82	11.64	99.14	97.88	0.95
	5.87	5.82	11.59	98.28		
	5.87	5.82	11.61	98.63		
	5.87	5.82	11.53	97.25		
	5.87	5.82	11.51	96.91		
	5.87	5.82	11.52	97.08		
丹酚酸 B	5.66	5.72	11.39	100.17	97.96	1.50
	5.66	5.72	11.22	97.20		

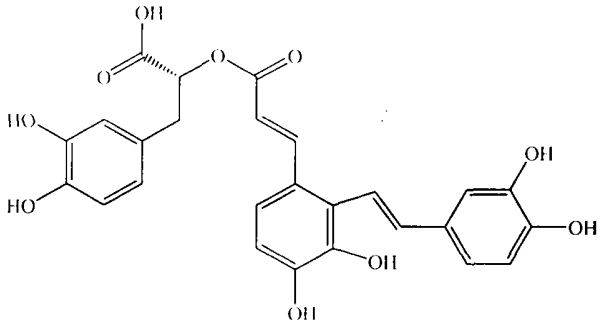
[0161]

	5.66	5.72	11.17	96.33		
	5.66	5.72	11.33	99.13		
	5.66	5.72	11.27	98.08		
	5.66	5.72	11.20	96.85		
	98.7	100.5	198.7	99.50		
	98.7	100.5	198.8	99.60		
丹酚酸	98.7	100.5	197.1	97.91	98.74	0.85
A	98.7	100.5	198.6	99.40		
	98.7	100.5	197.3	98.11		
	98.7	100.5	197.1	97.91		
	7.85	8.05	15.64	96.77		
	7.85	8.05	15.88	99.75		
丹酚酸	7.85	8.05	15.70	97.52	98.49	1.19
C	7.85	8.05	15.77	98.39		
	7.85	8.05	15.79	98.63		
	7.85	8.05	15.87	99.63		

[0162] 二、丹酚酸A组合物分离、结构鉴定研究

[0163] 将实施例1得到上述丹酚酸A组合物分别以CG161M大孔吸附树脂、ODS、Sephadex LH-20柱层析分离，以水：乙醇梯度洗脱，水的比例为80～20%，乙醇的比例为20～80%，分段收集洗脱液，合并相同组分，结晶，可以得到丹酚酸A，紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸B、丹酚酸C的单体化合物，测定所述单体化合物结构，其中，丹酚酸A，分子式：$C_{26}H_{222}O_{10}$，分子量：494.45，结构如下：

[0164]



[0165] 丹酚酸A理化性质及波谱数据，参见图1，2。

[0166] 丹酚酸A(Salvianolic acid A)，淡黄色粉末，易容易甲醇、水。ESIMS m/z：493[M-H]$^-$，518[M+Na]$^+$，分子式：$C_{26}H_{22}O_{10}$，分子量：494.45；^{1}H(600MHz，CD_3OD)和^{13}C NMR(150MHz，CD_3OD)数据如下：

[0167] ^{1}NMR(CD_3OD，600MHz)δ：2.96(1H，dd，J＝14.4，8.4Hz，H-7``)，3.06(1H，dd，J＝14.4，4.2Hz，H-7``)，5.17(1H，dd，J＝9.0，4.2Hz，H-8``)，6.27(1H，d，J＝16.2Hz，H-8`)，6.54(1H，dd，J＝7.8，1.8Hz，H-6``)，6.63(1H，d，J＝7.8Hz，H-5``)，6.65(1H，d，J＝16.2，Hz，H-7)，6.72(1H，d，J＝8.4Hz，H-4`)，6.74(1H，d，J＝8.4Hz，H-5)，6.76(1H，d，J＝1.8Hz，H-2``)，6.88(1H，dd，J＝8.4，1.8Hz，H-6)，7.05(1H，d，J＝1.8Hz，H-2)，7.11(1H，d，J＝8.4Hz，H-5`)，7.14(1H，d，J＝16.2Hz，H-8)；8.06(1H，d，J＝16.2Hz，H-7`).

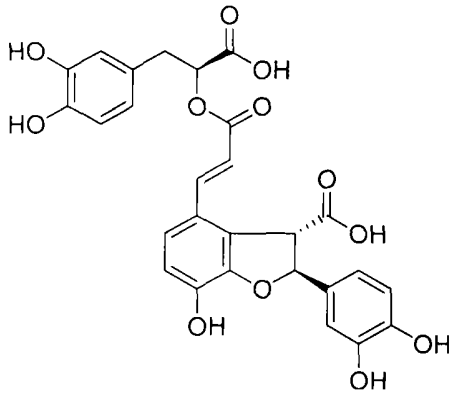
[0168] ^{13}CNMR(CD_3OD，150MHz)δ：36.6(C-7``)，73.3(C-8``)，112.6(C-2)，113.4(C-5)，

114.2(C-8`),114.9(C-4`),115.1(C-5``),116.0(C-2``),118.7(C-5`),119.6(C-6),119.3(C-8),120.6(C-6``),124.7(C-6`),127.0(C-1),127.9(C-1``),130.0(C-1`),136.5(C-7),

[0169] 143.1(C-3),143.9(C-3``),144.8(C-4``),145.1(C-2`),145.4(C-4),146.0(C-7`),146.9(C-3`),167.3(C-9`),172.1(C-9``).

[0170] 紫草酸,其分子式:$C_{27}H_{22}O_{12}$,分子量:538.46,结构如下:

[0171]



[0172] 紫草酸理化性质及波谱数据,参见图3,4。

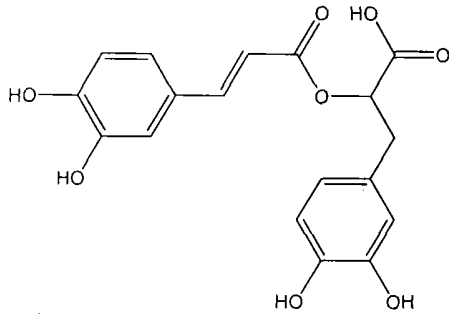
[0173] 紫草酸(lithospermic acid),淡黄色粉末,易容易甲醇、水。ESIMSm/z:539$[M+H]^+$,537$[M-1]^-$,560$[M+Na]^-$,492$[M-COOH]^-$;分子式:$C_{27}H_{22}O_{12}$,分子量538.45;^1H(600MHz,CD_3OD)和^{13}C NMR(150MHz,CD_3OD)数据如下:

[0174] ^{1}NMR(CD_3OD,600MHz)δ:3.02(1H,dd,J=14.4,9.6Hz,H-7``),3.06(1H,dd,J=14.4,3.0Hz,H-7``),4.25(1H,dd,J=5.4Hz,H-8`),4.97(1H,dd,J=9.6,3.0Hz,H-8``),5.88(1H,d,J=5.4Hz,H-7`),6.31(1H,d,J=16.0Hz,H-8),6.59(1H,dd,J=8.0,1.8Hz,H-6``),6.65(1H,d,J=8.0Hz,H-5``),6.73(1H,dd,J=8.4,2.0Hz,H-6`),6.74(1H,d,J=1.8Hz,H-2``),6.74(1H,d,J=8.4Hz,H-5`),6.83(1H,d,J=8.4Hz,2.4Hz,H-5),6.97(1H,d,J=2.0Hz,Hz,H-2`),7.13(1H,d,J=8.4Hz,H-6);7.93(1H,d,J=16.0Hz,H-7).

[0175] ^{13}CNMR(CD_3OD,150MHz)δ:37.3(C-7``),59.9(C-8`),76.7(C-8``),88.9(C-7`),112.4(C-2``),114.6(C-5``),114.9(C-5`),115.7(C-8),116.1(C-2`),117.2(C-6``),119.5(C-6),119.9(C-6`),123.5(C-1),129.3(C-2),129.8(C-1``),133.4(C-1`),142.4(C-7),143.3(C-4),143.4(C-3``),144.7(C-4``),145.1(C-3`),145.1(C-4`),147.4(C-3),167.8(C-9),176.5(C-9``),178.5(C-9`).

[0176] 迷迭香酸的分子式:$C_{18}H_{16}O_8$,分子量:360.31,结构如下:

[0177]



[0178] 迷迭香酸理化性质及波谱数据，参见图 5，6。

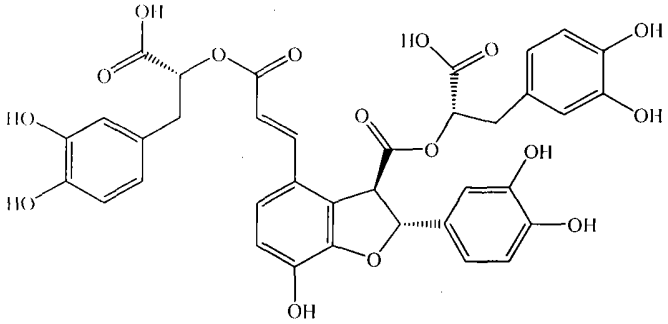
[0179] 迷迭香酸(Rosmarinic acid)，白色粉末，易容易甲醇、水。ESIMS m/z：359[M-H]$^-$，383[M+Na]$^+$；分子式：$C_{18}H_{16}O_8$，分子量 360.31；^{1}H(600MHz，CD_3OD) 和 ^{13}C NMR(150MHz.CD_3OD) 数据如下：

[0180] ^{1}NMR(CD_3OD，600MHz) δ：3.01(1H，dd，J = 14.4，8.4Hz，H-7`)，3.10(1H，dd，J = 14.4，4.2Hz，H-7`)，5.18(1H，dd，J = 8.4，4.2Hz，H-8`)，6.27(1H，d，J = 16.0Hz，H-8)，6.61(1H，dd，J = 7.8，1.8Hz，H-6`)，6.70(1H，d，J = 7.8Hz，H-5`)，6.75(1H，d，J = 1.8Hz，H-2`)，6.78(1H，d，J = 8.4Hz，H-5)，6.95(1H，dd，J = 8.4，2.4Hz，H-6)，7.04(1H，d，J = 1.8Hz，H-2)，7.55(1H，d，J = 16.0Hz，H-7)；

[0181] ^{13}CNMR(CD_3OD，150MHz) δ：36.6(C-7`)，73.2(C-8`)，113.1(C-8)，113.9(C-2)，114.9(C-5)，115.1(C-5`)，116.2(C-2`)，120.4(C-6)，121.8(C-6`)，126.3(C-1)，127.9(C-1`)，143.9(C-3)，144.8(C-4)，145.5(C-3`)，146.4(C-4`)，148.4(C-7)，167.1(C-9)，172.1(C-9`).

[0182] 丹酚酸 B，其分子式：$C_{36}H_{30}O_{16}$，分子量：718.61，结构如下：

[0183]



[0184] 丹酚酸 B 理化性质及波谱数据，参见图 7，8。

[0185] 丹酚酸 B(Salvianolic acid B)，淡黄色粉末，易容易甲醇、水。ESIMSm/z：717[M-H]$^-$，741[M+Na]$^+$；分子式：$C_{36}H_{30}O_{16}$，分子量 718.62；^{1}H(600MHz，CD_3OD) 和 ^{13}C NMR(150MHz，CD_3OD) 数据如下：

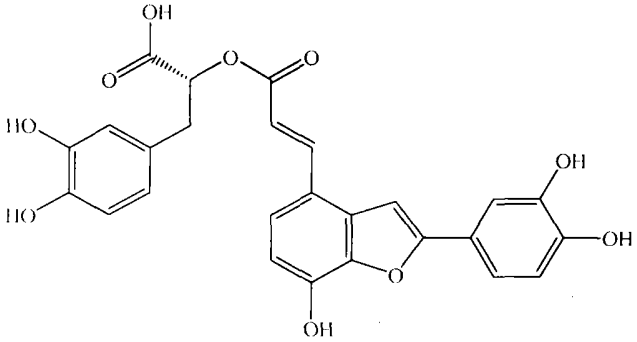
[0186] ^{1}NMR(CD_3OD，600MHz) δ：2.80-3.10(2H，m，H-7``)，2.80-3.10(2H，m，H-7```)，4.35(1H，d，J = 4.8Hz，H-8``)，5.15-5.19(1H，m，H-8`)，5.15-5.19(1H，m，H-8```)，5.85(1H，d，J = 4.8Hz，H-7``)，6.20(1H，d，J = 16.2Hz，H-8)，6.31(1H，dd，J = 8.1，2.1Hz，H-6`)，6.52(1H，d，J = 2.4Hz，H-2```)，6.54(1H，d，J = 7.8Hz，H-5``)，6.62(1H，d，J = 2.1Hz，H-2`)，6.66(1H，dd，J = 8.1，2.4Hz，H-6```)，6.70(1H，d，J = 7.8Hz，H-5`)，6.74(1H，d，J = 8.1Hz，H-5```)，6.75(1H，dd，J = 7.8，2.4Hz，H-6``)，6.76(1H，d，J =

2.4Hz,H-2``),6.83(1H,d,J = 8.4Hz,H-5),7.16(1H,d,J = 8.4Hz,H-6),7.52(1H,d,J = 16.2Hz,H-7);

[0187] ^{13}CNMR(CD_3OD,150MHz) δ :36.111(C-7```),36.51(C-7`),56.58(C-8``),73.28(C-8),74.19(C-8```),86.93(C-7``),111.99(C-2``),115.01(C-5``),115.04(C-5`),115.13(C-2`),115.18(C-2```),115.95(C-8),116.20(C-6``),116.97(C-5```),117.04(C-5),120.37(C-6),120.89(C-6```),123.28(C-1),125.04(C-2),127.55(C-1`),127.85(C-1```),132.27(C-1``),142.20(C-7),143.70(C-3```),143.72(C-4```),143.88(C-4``),144.57(C-3``),144.73(C-4`),145.23(C-3`),145.39(C-3),147.71(C-4),166.66(C-9),170.92(C-9```),171.17(C-9``),172.29(C-9`).

[0188] 丹酚酸C,其分子式:$C_{26}H_{20}O_{10}$,分子量:492.43,结构如下:

[0189]



[0190] 丹酚酸C理化性质及波谱数据,参见图9,10。

[0191] 丹酚酸C(Salvianolic acid C),淡黄色粉末,易容易甲醇、水。ESIMSm/z:491[M-H]$^-$515[M+Na]$^+$;分子式:$C_{26}H_{20}O_{10}$,分子量492.43;^{1}H(600MHz,CD_3OD)和^{13}C NMR(150MHz,CD_3OD)数据如下:

[0192] ^{1}NMR(CD_3OD,600MHz) δ :3.07(1H,dd,J = 13.8,8.4Hz,H-7``),3.15(1H,dd,J = 13.8,4.2Hz,H-7``),5.25(1H,dd,J = 8.4,4.2Hz,H-8``),6.46(1H,d,J = 15.9Hz,H-8),6.46(1H,dd,J = 8.1,2.1Hz,H-2``),6.72(1H,d,J = 8.1Hz,H-3``),3.74(1H,d,J = 8.4Hz,H-5),6.80(1H,d,J = 2.4Hz,H-6``),6.88(1H,d,J = 7.8Hz,H-5`),7.20(1H,s,,H-8`),7.36(1H,d,J = 7.8Hz,H-6),7.37(1H,dd,J = 7.8Hz,2.4Hz,H-6`),7.40(1H,d,J = 2.4Hz,2.1Hz,H-2`),7.94(1H,d,J = 15.9Hz,H-7);

[0193] ^{13}CNMR(CD_3OD,150MHz) δ :36.2(C-7``),73.3(C-8``),97.9(C-8`),110.4(C-5),112.0(C-2`),113.5(C-8),114.9(C-5``),115.4(C-5`),116.3(C-2``),117.4(C-6`),118.2(C-1),120.5(C-6``),122.0(C-1`),125.0(C-6),128.0(C-1``),131.3(C-2),143.0(C-3),

[0194] 143.8(C-7),144.0(C-3``),144.6(C-4),144.8(C-4``),145.3(C-2`),146.7(C-4`),158.0(C-7`),167.3(C-9),172.4(C-9``).

[0195] 实验例2:丹酚酸B的提取

[0196] 1.1提取溶剂及提取方法的确认

[0197] 称取丹参药材400g,按中国药典丹参项下方法测定丹酚酸B含量,平均分成4份,按下述试验方案进行试验:

[0198] 实验 1：取丹参药材 100g，每次加 8 倍量水在 80℃温浸提取 1.5 小时，共温浸提取三次，合并提取液，测定丹酚酸 B 并计算提取率，结果如表 7。

[0199] 实验 2：取丹参药材 100g，每次加 8 倍量水在 80℃温浸提取 1.5 小时，同时以 10～50 转 / 分速度搅拌，共温浸搅拌提取三次，合并提取液，测定丹酚酸 B 并计算提取率，结果如表 7。

[0200] 实验 3：取丹参药材 100g，每次加 8 倍量水煎煮 1.5 小时，共煎煮三次，合并提取液，测定丹酚酸 B 并计算提取率，结果如表 7。

[0201] 实验 4：取丹参药材 100g，每次加 8 倍量 50％乙醇回流提取 1.5 小时，共提取三次，合并提取液，测定丹酚酸 B 并计算提取率，结果如表 7。

[0202] 表 7. 提取溶剂及提取方法实验结果

[0203]

组别	提取溶剂	提取方式	丹酚酸 B 提取率
实验 1	水	80℃温浸提取	80.51%
实验 2	水	80℃温浸搅拌提取	83.04%
实验 3	水	煎煮提取	81.03%
实验 4	50%乙醇	回流提取	87.21%

[0204]

[0205] 上述实验结果显示，采用 50％乙醇做提取溶剂对丹酚酸 B 提取率有影响，50％乙醇提取优于水提取，但与水温浸加搅拌提取差异不大，水提取过程中搅拌和不搅拌的两种提取方式对丹酚酸 B 的提取率有影响，煎煮提取可能是由于温度较高，对丹酚酸 B 提取有影响。

[0206] 1.2 正交试验法优选提取工艺

[0207] 1.2.1 水提取工艺的优化研究：根据以上的试验结果，水提取工艺以提取时间 (A)、提取次数 (B)、溶剂量 (C)、提取温度 (D) 四项作为考察因素，每一因素设三个水平，按 $L9(3^4)$ 正交表进行正交试验设计（表 8、表 9），考察指标为丹酚酸 B 的提取率。

[0208] 表 8. 提取因素水平表

[0209]

因素 / 水平	提取时间(h) A	提取次数 B	溶剂量(倍) C	提取温度(℃) D
1	1.0	1	3	45
2	2.5	2	8	65
3	4.0	3	15	95

[0210] 表 9. 提取工艺正交试验结果表

[0211]

试验号	提取时间(h) A	提取次数 B	溶剂量(倍) C	提取温(℃) D	丹酚酸 B 转移率(%)
1	1	1	1	1	80.53
2	1	2	2	2	93.68
3	1	3	3	3	94.55
4	2	1	2	3	86.32
5	2	2	3	1	85.66
6	2	3	1	2	89.49
7	3	1	3	2	92.25
8	3	2	1	3	87.86
9	3	3	2	1	83.87

[0212]

K1	268.76	259.10	257.88	250.06
K2	261.47	267.20	263.87	275.42
K3	263.98	267.91	272.46	268.73
R	7.29	8.81	14.58	25.36

[0213] 表 10. 方差分析结果表

[0214]

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A(误差)	9.14	2	4.57		
B	15.97	2	7.99	1.7	
C	35.80	2	17.90	3.9	
D	115.16	2	57.58	12.6	

[0215] $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

[0216] 水提取方差分析结果表明，各试验因素对丹酚酸 B 的提取转移率均无显著性差异，故本发明丹酚酸 B 的水提取条件为加 3 ～ 15 倍量水、在 45 ～ 95℃下温浸提取 1 ～ 3 次，同时以 10 ～ 50 转 / 分速度搅拌，每次提取 1 ～ 4 小时或者每次加 3 ～ 15 倍量煎煮提收，每次提取 1 ～ 4 小时，共提取 1 ～ 3 次。

[0217] 1.2.2 醇提取工艺的优化研究：根据以上的试验结果，醇提取工艺以提取时间 (A)、提取次数 (B)、溶剂量 (C)、乙醇浓度 (D) 四项作为考察因素，每一因素设三个水平，按 $L9(3^4)$ 正交表进行正交试验设计（表 11、表 12），考察指标为丹酚酸 B 的提取率。

[0218] 表 11. 提取因素水平表

[0219]

因素 / 水平	提取时间(h) A	提取次数 B	溶剂量(倍) C	乙醇含量(%) D
1	1.0	1	3	30
2	2.5	2	8	45
3	4.0	3	15	60

[0220] 表 12. 提取工艺正交试验结果表

[0221]

试验号	提取时间(h) A	提取次数 B	溶剂量(倍) C	提取温(℃) D	丹酚酸 B 转移率(%)
1	1	1	1	1	81.33
2	1	2	2	2	95.54
3	1	3	3	3	96.28
4	2	1	2	3	87.04
5	2	2	3	1	86.32
6	2	3	1	2	89.17
7	3	1	3	2	93.12
8	3	2	1	3	88.57
9	3	3	2	1	84.55
K1	273.15	261.49	259.07	252.20	
K2	262.53	270.43	267.13	277.83	
K3	266.24	270.00	275.72	271.89	
R	10.62	8.94	16.65	25.63	

[0222] 表 13. 方差分析结果表

[0223]

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	19.37	2	9.68	1.1	
B(误差)	16.95	2	8.47		
C	46.22	2	23.11	2.7	
D	119.99	2	59.99	7.1	

[0224] $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

[0225] 醇回流提取方差分析结果表明，各试验因素对丹酚酸 B 的提取转移率均无显著性差异，故本丹酚酸 B 的提取条件为加 3 ～ 15 倍量 30％～ 60％乙醇回流提取 1 ～ 3 次，每次提取 1 ～ 4 小时。

[0226] 1.3 丹酚酸 B 原料制备

[0227] 根据上述正交实验优化工艺，取丹参药材 10kg，每次加 8 倍量水在 80℃温浸提取 1.5 小时，同时以 10 ～ 50 转 / 分速度搅拌，共温浸搅拌提取 3 次，滤过，合并滤液，提取液减压浓缩至相对密度 1.10 ～ 1.25(60℃)，加入乙醇使含醇量在 60％，滤过，滤液减压回收乙醇并浓缩至无醇味，真空干燥、得丹酚酸提取物 4.15kg，测得丹酚酸 B 含量为 10.25％。

[0228] 实验例 3 :丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物工艺比较

[0229] 实验 1 :取 1.3 项下制备的丹酚酸 B 原料约 30g，配制成 200ml 溶液，加 10％氢氧化钠溶液调 pH 值至 4.5 ;

[0230] 实验 2 :取 1.3 项下制备的丹酚酸 B 原料约 30g，配制成 200ml 溶液，加 10％氧氧化钠溶液调 pH 值至 4.5，加 1.0％ $ZnCl_2$;

[0231] 实验 3 :取含丹酚酸 B(含量 51.54％) 原料约 6g，加纯化水稀释至丹酚酸 B 浓度为 15mg/ml 溶液，加尿素，使之与丹酚酸 B 的摩尔比为 0.5 ;

[0232] 上述各实验组置于同一高压反应釜中，在 120℃下反应 4.0 小时，冷却，计算丹酚酚酸 A 组合物产率。

[0233] 表 14. 丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物实验结果

[0234]

组别	取样量 (g)	丹 B 含量(%)	配制浓度 (mg/ml)	转化液总量(ml)	丹 A 含量(%)	产率 (%)	转化率 (%)
实验1	29.25	10.25	14.99	200	4.81	32.09	46.64
	28.87	10.25	14.80	200	4.29	28.99	42.13
	30.05	10.25	15.40	200	4.71	30.58	44.45
实验2	29.35	10.25	15.04	200	6.64	44.15	64.17
	29.54	10.25	15.14	200	6.51	43.00	62.49
	29.72	10.25	15.23	200	6.33	41.56	60.41
实验3	5.79	51.45	14.89	200	5.29	35.53	51.63
	5.80	51.45	14.92	200	5.12	34.32	49.87
	5.86	51.45	15.08	200	5.08	33.69	48.96

[0235] 表 14 结果显示，丹酚酸 B 高纯度对转化没有影响，不需要纯化至 50％以上进行转化，丹酚酸 B 转化为丹酚酸 A 组合物过程中，调节 pH 值，加入 1.0％ ZnCl2，可以大大提高丹酚酸 A 组合物的产率。

[0236] 实验例 4 :丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物工艺优化

[0237] 上述实验研究证明，丹酚酸 B 纯度不是影响丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物的因素，但加入一定的催化剂影响丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物，因此，我们对各实验组均加入 1％ ZnCl2 作为催化剂，对影响丹酚酸 B 转化为丹酚酸 A 组合物的其他因素 :丹酚酸 B 浓度 (A)、pH(B)、温度 (C)、时间 (D) 进行正交试验，每一因素设三个水平，按 L9(3^4) 正交表进行试验设计 (表 15、表 16)，考察指标为丹酚酸 A 组合物的产率。

[0238] 表 15. 转化因素水平表

因素 / 水平	丹酚酸 B 浓度 (mg/ml)A	pH B	温度(℃) C	时间(h) D
1	1	3.0	100	2
2	30	4.5	120	4
3	50	6.5	140	6

[0239]

[0240] 表 16. 转化工艺正三交试验结果表

[0241]

试验号	A	B	C	D	丹酚酸 A 组合物产率(%)
1	1	1	1	1	44.42
2	1	2	2	2	53.92
3	1	3	3	3	45.62
4	2	1	2	3	48.92
5	2	2	3	1	52.96
6	2	3	1	2	47.25
7	3	1	3	2	46.57
8	3	2	1	3	53.12
9	3	3	2	1	49.58
K1	143.96	139.91	144.79	146.96	
K2	149.13	160.00	152.42	147.74	
K3	149.27	142.45	145.15	147.66	
R	5.31	20.09	7.63	0.78	

[0242] 表 17. 方差分析结果表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	6.10	2	3.05	49.7	*
B	79.78	2	39.89	649.9	△
C	12.36	2	6.18	100.7	△
D(误差)	0.12	2	0.06		

[0243]

[0244] *$F_{0.05}(2,2) = 19.00$ △ $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

[0245] 方差分析结果显示，对本次正交试验按照直观分析优选出的最佳条件是 $A_3B_2C_2D_2$，因素 A（丹酚酸 B 浓度）对丹酚酸 A 组合物产率有一定影响，从 K 值分析，浓度高于 30mg/ml 对提高丹酚酸 B 转化为丹酚酸 A 的效果没有影响，而且形成的杂质更多，因此，转化前丹酚酸 B 浓度宜选择 1 ～ 30mg/ml；因素 B（pH）、因素 C（温度）对丹酚酸 A 组合物产率有极显著性差异，提示丹酚酸 B 转化过程中应严格控制 pH 及温度，可以成功的实现丹酚酸 B 较高产率的向丹酚酸 A 组合物转化。

[0246] 实验例 5：催化剂 $ZnCl_2$ 用量对转化的影响

[0247] 按上述丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物工艺优化条件，取丹酚酸 B 原料，加纯化水 2001，制成丹酚酸 B 浓度为 15mg/ml 的溶液，调节 pH 为 4.5，转化温度为 120℃，转化时间为 4 小时，按与丹酚酸 B 摩尔百分比计，分别加入不同量的催化剂 $ZnCl_2$，结果见表 18。

[0248] 表 18. 催化剂 $ZnCl_2$ 用量对转化影响实验结果

[0249]

组别	取样量(g)	丹 B 含量(%)	配制浓度(mg/ml)	$ZnCl_2$ 加入量(%)	转化液总量(ml)	丹 A 含量(%)	产率(%)	转化率(%)
1	30.51	10.25	15.64	0.02	200	5.99	38.30	55.66
2	29.37	10.25	15.05	0.05	200	6.38	40.40	61.61
3	30.08	10.25	15.42	0.1	200	6.83	42.35	64.37
4	29.68	10.25	15.21	0.3	200	6.59	43.33	62.97
5	29.76	10.25	15.25	0.5	200	6.73	44.13	64.14
6	30.72	10.25	15.74	1.0	200	7.02	43.07	64.82
7	29.82	10.25	15.28	1.5	200	6.75	44.18	64.20
8	29.36	10.25	15.05	2.0	200	6.77	43.65	65.38
9	30.12	10.25	15.44	2.5	200	6.86	44.43	64.57
10	29.28	10.25	15.01	3.0	200	6.70	44.64	64.87
11	29.88	10.25	15.31	3.5	200	6.67	43.57	63.32
12	30.42	10.25	15.59	4.0	200	6.96	44.64	64.88
13	30.37	10.25	15.56	5.0	200	6.92	44.47	64.64

[0250]

[0251] 催化剂 $ZnCl_2$ 用量对转化影响实验结果表明，催化剂用量≥ 0.02％即可产生 55.65％转化率，优选催化剂用量 0.1％～ 3.0％，更优选 0.5％～ 2.0％．催化剂用量＞ 3％后，转化率不再有明显提高。

[0252] 实验例 6：不同的催化剂对丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物的催化作用

[0253] 按上述丹酚酸 B 转化丹酚酸 A 组合物工艺优化条件，取丹酚酸 B 原料，加纯化水 200ml，制成丹酚酸 B 浓度为 15mg/ml 的溶液，调节 pH 为 4.5，转化温度为 120℃，转化时间为 4 小时，分别加入不同品种和不同剂量的催化剂进行转化，结果见表 19。

[0254] 表 19. 不同催化剂对丹 B 转化丹酚酸 A 组合物的影响

[0255]

组别	取样量(g)	丹B含量(%)	配制浓度(mg/ml)	加入量(%)	转化液总量(ml)	丹A含量(%)	产率(%)	转化率(%)
$RuCl_3$	29.74	10.25	15.24	0.5	200	6.51	42.72	62.08
	30.52	10.25	15.64	1.5	200	6.75	43.16	62.73
	30.71	10.25	15.74	3.0	200	6.72	42.69	62.05
$AlCl_3$	30.60	10.25	15.68	0.5	200	6.77	43.17	62.75
	29.97	10.25	15.36	1.5	200	6.74	43.88	63.77
	30.33	10.25	15.54	3.0	200	6.89	44.34	64.44
$FeCl_3$	29.65	10.25	15.20	0.5	200	6.52	42.90	62.34
	29.78	10.25	15.26	1.5	200	6.50	42.60	61.91
	30.58	10.25	15.67	3.0	200	6.98	44.54	64.74
$PdCl_3$	29.57	10.25	15.15	0.5	200	6.55	43.23	62.84
	30.09	10.25	15.42	1.5	200	6.84	45.01	64.47
	30.45	10.25	15.61	3.0	200	6.96	44.59	64.80

[0256] 表19结果显示，以上4种催化剂均可以作为丹酚酸B转化反应中的催化剂，但综合效果不及$ZnCl_2$催化剂达到的转化效果，故本发明最优选择$ZnCl_2$催化剂。

[0257] 实验例7：丹酚酸A组合物的大孔吸附树脂纯化

[0258] 取丹酚酸A组合物转化溶液13份，置预处理好的各型号大孔树脂100g中，摇床动态吸附8小时后，装柱，依次用水洗洗脱3个柱体积、20%乙醇洗脱5个柱体积、70%乙醇洗脱5个柱体积，收集70%乙醇含丹酚酸A组合物洗脱液部分，进行丹酚酸A含量测定，洗脱液蒸干计算干膏量，结果见表20。

[0259] 表20. 大孔树脂型号的确认

[0260]

树脂型号	干膏量（g）	丹酚酸 A 含量（%）	干膏中丹酚酸 A 重量（g）	丹酚酸 A 饱和吸附量(mg/g)
HPD-80	3.32	75.52	2.51	25.1
HPD-100	3.66	78.20	2.86	28.6
HPD-100B	3.23	75.65	2.44	24.4
HPD-200A	3.36	78.21	2.63	26.3
HPD-300	3.24	75.64	2.45	24.5
HPD-450	3.20	76.21	2.44	24.4
HPD-722	3.48	76.54	2.66	26.6
HPD-826	3.56	75.55	2.69	26.9
D101	3.64	77.54	2.82	28.2
AB-8	3.48	76.24	2.65	26.5
ADS-5	3.30	77.23	2.55	25.5
ADS-8	3.63	76.65	2.78	27.8
ADS-21	3.56	77.54	2.76	27.6

[0261] 结果表明：以上 13 种大孔树脂对丹酚酸 A 的吸附效果良好，且用不同浓度的乙醇梯度洗脱可以很好的去除杂质，得到含量大于75%的丹酚酸A组合物洗脱液，以HPD-100得干膏量最大，丹酚酸 A 组合物含量高，树脂吸附量大。

[0262] 实验例 8：丹酚酸 A 组合物的聚酰胺柱层析纯化

[0263] 取大孔吸附树脂纯化后的丹酚酸 A 组合物溶液 3 份，置预处理好的各型号树脂 100g 中，摇床动态吸附 8 小时后，装柱，依次用水洗洗脱 3 个柱体积、20%乙醇洗脱 5 个柱体积、70%乙醇洗脱 5 个柱体积，收集 70%乙醇洗脱液进行丹酚酸 A 含量测定，部分洗脱液蒸干计算干膏量，结果见表 21。

[0264] 表 21. 树脂型号的确认

[0265]

树脂型号	干膏量（g）	丹酚酸 A 含量（%）	干膏中丹酚酸 A 重量（g）	丹酚酸 A 饱和吸附量(mg/g)
聚酰胺	6.25	90.42	5.64	56.4
LH-20	1.61	89.86	1.45	14.5
ODS-C18	3.87	91.97	3.56	35.6

[0266] 结果表明：以上 3 种树脂对丹酚酸 A 的吸附效果良好，且用不同浓度的乙醇梯度洗脱可以很好的去除杂质，得到含量约为 90%的丹酚酸 A 组合物洗脱液；以聚酰胺得干膏量最多，含量高吸附量大。

[0267] 实验例 9：丹酚酸 A 组合物的萃取纯化

[0268] 将第聚酰胺柱层析纯化的70%乙醇洗脱液减压回收乙醇，调pH值2.0～4.0，再用正丁醇、叔丁基甲基醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丁酯、甲酸乙酯、乙醇提取5次，分离有机溶剂相，回收溶剂，干燥，得丹酚酸A组合物提取物，测定丹酚酸A含量，结果见表22。

[0269] 表22. 萃取用有机溶剂的确认

[0270]

有机溶剂	丹酚酸A组合物量（g）	丹酚酸A含量（%）	干膏中丹酚酸A重量（g）
正丁醇	6.07	91.12	5.53
叔丁基甲基醚	5.46	93.66	5.11
乙酸甲酯	5.23	93.65	4.90
乙酸乙酯	5.36	93.26	5.00
乙酸丁酯	5.24	93.64	4.91
甲酸乙酯	5.32	93.38	4.97
乙醚	3.48	93.54	3.26

[0271] 表22结果表明：正丁醇由于极性大，丹酚酸A组合物量最多，但其丹酚酸含量没得到明显提高，乙醚由于极性偏小，水溶性杂质少，丹酚酸A含量高，但得到的丹酚酸A组合物量少，其他提取溶剂叔丁基甲基醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丁酯、甲酸乙酯得到的丹酚酸A组合物量较大，丹酚酸A含量均得到提高，以叔丁基甲基醚得组合物多、丹酚酸A含量高。

[0272] 实验例10：丹酚酸A组合物的硅胶柱层析纯化

[0273] 取萃取纯化的丹酚酸A组合物萃取液12份，每份含丹酚酸A10g，加入20g的硅胶，搅拌，挥干；把搅拌样硅胶加到已装好的100g干硅胶柱上，分别以石油醚、正戊烷、正庚烷、乙酸乙酯、乙酸甲酯、甲酸乙酯、叔丁基甲基醚组成的两相溶剂为洗脱剂，HPLC或薄层色谱检测，收集丹酚酸A组合物洗脱液，洗脱液蒸干，得干膏，测定丹酚酸A含量，结果见表23。

[0274] 表23. 洗脱剂的确认

[0275]

洗脱剂	丹酚酸 A 含量（%）	干膏中丹酚酸 A 重量（g）
正戊烷-叔丁基甲基醚	95.82	7.55
正戊烷-乙酸乙酯	95.58	7.50
正戊烷-乙酸甲酯	95.23	7.33
正戊烷-甲酸乙酯	94.98	7.40
石油醚-叔丁基甲基醚	95.02	7.26
石油醚-乙酸乙酯	95.65	7.35
石油醚-乙酸甲酯	95.28	7.35
石油醚-甲酸乙酯	94.98	7.52
正庚烷-叔丁基甲基醚	95.58	7.29
正庚烷-乙酸乙酯	95.54	7.35
正庚烷-乙酸甲酯	95.55	7.49
正庚烷-甲酸乙酯	95.28	7.53

[0276] 结果表明：丹酚酸 A 组合物用正相硅胶柱色谱时，采用石油醚、正戊烷、正庚烷、乙酸乙酯、乙酸甲酯、甲酸乙酯、叔丁基甲基醚组成的两相溶剂为洗脱剂，梯度洗脱，可以很好的去除杂质，得到高纯度的丹酚酸 A 组合物洗脱液，采用正戊烷－叔丁基甲基醚组成的两相溶剂为洗脱剂效果最好。

[0277] 实验例 11：丹酚酸 A 组合物干燥方法研究

[0278] 取硅胶柱层析后的丹酚酸 A 组合物洗脱液 4 份，每份含丹酚酸 A 组合物 100g，加 10 倍量水溶解后分别采用、真空干燥、冷冻真空干燥、喷雾干燥、微波真空干燥得丹酚酸 A 组合物，对该组合物进行检测，结果见表 24。

[0279] 表 24. 丹酚酸 A 组合物干燥方法检测结果

[0280]

干燥方式 / 检测项目	真空干燥	冷冻真空干燥	喷雾干燥	微波真空干燥
丹酚酸 A 含量(%)	96.35	96.25	96.43	96.56
有关物质(%)	2.98	2.26	3.26	2.92
水分(%)	1.51	3.14	1.64	1.67
干燥时间（h）	6	30	1.5	2
溶剂残留(%)	无	7.56	无	无

[0281] 结果表明：丹酚酸 A 组合物用微波真空干燥工艺控制简单，处理量大，干燥温度低，时间短，所得提取物各项指标良好，故本发明采用微波真空干燥制备得到丹酚酸 A 组合

物。

[0282] 经过进一步的实验确定，微波真空干燥适宜范围为温度：20-100℃，回差温度1-5℃，真空度 -0.07Mpa 以上，微波功率 1-100KW，干燥 10-200 分钟。

[0283] 以下实验用丹酚酸 A 组合物均取实施例 3 制备方法所获得的样品，丹酚酸 A 单体化合物，市售，丹酚酸 A 含量 99.62％以上。

[0284] 实验例 12：丹酚酸 A 组合物对易卒中型肾血管性高血压大鼠 (RHRSP) 脑血栓后神经功能症状的影响

[0285] 1、实验材料：

[0286] 主要试剂及仪器：虎红 (rose bengal)：上海信然生物技术有限公司；TTC：美国 Sigma 公司；SDP-1 型大鼠心率血压计：中日友好医院研制；YAG 激光仪：武汉华工激光工程有限公司；日本 Olympus BH-5 显微镜；图像处理：JVCky-F30B3-CCD 彩色图像摄录输入仪；图像分析：德国 KONTRON IBAS2.0 全自动图像分析系统。

[0287] 实验动物：2 ～ 3 个月龄，体重 (100±20)g 的雄性 SD 大鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司提供）。

[0288] 2、实验方法和结果：

[0289] 2.1 方法

[0290] 2.1.1 动物模型的制备：

[0291] 取 2 ～ 3 个月龄、体重 (100±20)g 的雄性 SD 大鼠用双肾双夹法狭窄肾动脉建立 RHRSP 模型：大鼠腹腔麻醉，经剑突下腹正中纵行约 5cm 长切口，切开皮肤、腹肌，钝性分离双侧肾动脉，用内径为 0.3mm 的环形银夹分别夹住双侧肾动脉起始部。于手术前测血压一次，手术后每周测一次，连续 12 周。另取 10 只体重相当的 SD 大鼠，测其血压作为正常对照。剔除：手术中及术后死亡，术后 12 周血压低于 160mmHg 大鼠，有卒中症状及体征、解剖见左基底节区小的软化灶及蛛网膜下腔出血的大鼠。16 周后血压≥ 160mmHg、且无脑卒中症状的 RHRSP 为成功模型。将制备成功的 RHRSP 用光化学方法造成大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型致大脑中动脉 (MCA) 血栓形成：2％戊巴比妥钠按 40mg/kg 体重腹腔注射麻醉后，经左颞侧入路，在颧弓和颞骨鳞部结合处前下方 1mm 处，用牙科钻钻一直径为 5mm 内骨窗，透过硬脑膜可清楚看到左 MCA 主干及其分支。经股静脉按 40mg/kg 体重的剂量注射 2.5％虎红，5min 后用 YAG 激光仪发生的 532nm 的绿色激光束（光斑直径 2mm，光照强度 0.37W) 持续照射 MCA 主干 15min，可见该 MCA 远端及各分支血流中断，并在手术显微镜下见局部白色血栓提示该 MCA 血栓形成、MCAO 模型复制成功。术中大鼠肛温保持在 (37±0.3)℃。局部伤口缝合前用青霉素稀释液冲洗，术后常规肌注青霉素 8 万 U/ 只。剔除术中及术后 1d 死亡的以及出血多或手术显微镜下未明确供血是否中断的大鼠。

[0292] 2.1.2 分组及给药

[0293] 先将动物随机分 7 组：假手术组、模型对照组、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组、丹酚酸 A 单体化合物组、尼莫地平组。假手术组仅开骨窗，不作激光照射；模型组、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组、丹酚酸 A 单体化合物组、尼莫地平组按模型制备方法制备易卒中型肾血管性高血压大鼠 MCAO 模型。并于 MCAO 模型术后 30min 分别按 0.3ml/100g 尾静脉注射给药一次，此后每天给药一次，共连续三天。假手术组、模型对照组术后尾静脉注射生理盐水；丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组术后分别尾静脉注射丹酚酸 A 组合物 20mg/kg、10mg/

kg、5mg4kg，丹酚酸A单体化合物组术后尾静脉注射丹酚酸A单体化合物10mg/kg，尼莫地平组术后尾静脉注射尼莫地平10mg/kg。

[0294] 2.2结果

[0295] 按照Garcia等的18分评分法进行评分：自发活动、四肢运动的对称性、前肢伸展爬行动作的对称性、爬笼壁、推躯干反应、触须对刺激的反应。前三项中无活动或反应（四肢或患肢）为0分，少许活动为1分，反应较正常差为2分，活动正常为3分；后三项无反应为1分，活动较正常差为2分，活动正常为3分。总分最高18分，最低3分。在MCAO术后大鼠麻醉苏醒后评分一次，之后分别在MCAO术后（即缺血后）24h、48h、72h对大鼠各进行一次神经行为学评分（每次均在当天给药之后进行评分）。由不熟悉此实验分组的5人同时对各实验组大鼠进行盲态观察评分，最后取平均值。并同时观察大鼠全身状态，测量体重和血压。

[0296] 表25. 丹酚酸A组合物对RHRSP脑血栓后神经行为学评分的影响（x±s）

[0297]

组别	n(只)	苏醒后评分	缺血后评分		
			24h	48h	72h
假手术组	10	17.63±0.49	18.00±0.00	18.00±0.00	18.00±0.00
模型组	10	9.72±0.53 #	11.27±0.79 #	13.44±0.57 #	13.18±1.08 #
丹酚酸A组合物高剂量组	10	14.12±0.54 *	17.87±0.55 *	18.00±0.10 *	18.00±0.00 *
丹酚酸A组合物中剂量组	10	13.83±0.46 *	17.54±0.42 *	18.00±0.00 *	18.00±0.00 *
丹酚酸A组合物低剂量组	10	12.08±0.62☆	16.16±0.61 *	17.34±0.64 *	18.00±0.00 *
丹酚酸A单体化合物组	10	11.73±0.65☆	16.81±0.57 *	17.31±0.48 *	18.00±0.00 *
尼莫地平组	10	12.56±0.57 *	15.45±0.47 *	17.42±0.60 *	17.20±0.52 *

[0298] 注：与假手术组比较，#P＜0.01；与模型组比较，*P＜0.01，☆P＜0.05

[0299] 实验结果显示：模型组苏醒后（12h内）的神经行为（自发活动、四肢运动的对称性、前肢伸展爬行动作的对称性、爬笼壁、推躯干反应、触须对刺激的反应等）显著低于假手术组（P＜0.01），说明脑血栓缺血后RHRSP神经功能受损严重，且在持续的72h内，神经行为持续明显低于假手术组（P＜0.01）；尼莫地平组和丹酚酸A单体化合物组以及丹酚酸A组合物各剂量组与模型组相比，大鼠苏醒后的神经行为有不同程度的升高（P＜0.05或P＜0.01），丹酚酸A组合物缺血后24h的神经行为已基本接近假手术组水平，48h已恢复正常水平；至缺血后72h丹酚酸A组合物各剂量组大鼠神经行为已恢复正常，与模型组相比差异仍有统计学意义（P＜0.01）。10mg/kg丹酚酸A组合物组与10mg/kg丹酚酸A单体化合物组比较，虽然神经行为学评分没有显著差异，但是也有稍优的趋势；且实验观察过程中，丹酚酸A组合物组的大鼠的整体状态比丹酚酸A单体化合物组恢复得快且稍好。以上结果提示，丹酚酸A组合物能提高RHRSP脑血栓缺血后神经行为，提示丹酚酸A组合物具有保护及改善脑缺血后神经症状的作用，且有优于同剂量丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0300] 实验例 13：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓后脑组织病理改变的影响

[0301] RHRSP 脑血栓模型制备、分组、给药方法同实验例 12。在最后一次神经行为学评分结束后，大鼠断头取脑，并在手术显微镜下观察 MCA 局部血栓情况。之后放入光滑器皿内置于 -20℃冷冻，行冠状切片。鼠脑切片，每片厚约 2mm。将脑片迅速放入 2% TTC 溶液中，37℃下孵育，脑片每面孵育 15min，正常脑组织着深红色，而缺血梗死脑组织呈白色。取出脑片观察并拍照。然后将脑组织置于 4%多聚甲醛 PBS 缓冲液 (pH7.3) 固定，之后行脱水、石蜡包埋，取脑组织做石蜡切片并作常规 HE 染色分析，显微镜下观察、拍照。结果见表 26。

[0302] 表 26. 丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓后脑组织病理改变的影响

[0303]

组别	血栓附着面积	TTC 染色观察		HE 染色观察	
		脑组织梗死灶	脑组织萎缩、脱落	增生小血管数	灶状出血现象
假手术组	—	—	—	—	—
模型组	++	++	++	±	++
丹酚酸 A 组合物高剂量组	±	±	—	+++	—
丹酚酸 A 组合物中剂量组	±	±	±	++±	—
丹酚酸 A 组合物低剂量组	+	+	±	+±	±
丹酚酸 A 单体化合物组	±	+	±	++	±
尼莫地平组	±	+	±	++	±

[0304] 实验结果显示：假手术组脑组织双侧对称，未见病变，模型组血管内血栓附着严重。与模型组比较，镜下观察丹酚酸 A 组合物各剂量组大鼠左 MCA 局部血栓的长度缩短，在动脉壁附着面积减小，以高、中剂量组最为明显。TTC 染色可见梗死脑组织呈白色，丹酚酸 A 组合物各剂量组中被染成白色的脑组织范围比模型对照组显著缩小。HE 染色可见模型组左侧皮层 MCA 供血区（以额顶皮质为中心）梗死灶内有明显的脑组织软化，细胞坏死，局部坏死组织脱落等现象，丹酚酸 A 组合物高剂量组大鼠此处未见组织萎缩脱落现象，其他各给药组细胞坏死较少，偶见组织脱落现象；各给药组和模型对照组的 HE 染色显示灶内、灶周均有小血管增生，但是各给药组合物各剂量组与模型组比较增生的小血管数目显著增多，且以丹酚酸 A 组合物高、中剂量组尤为显著；另外，HE 染色显示模型对照组可见大小不等的灶状出血，丹酚酸 A 组合物高、中剂量组并无发现有灶状出血现象，丹酚酸 A 组合物低剂量组以及丹酚酸 A 单体化合物组和尼莫地平组也仅有个别动物有灶状出血，且出血灶比模型组要小。试验结果显示丹酚酸 A 组合物能明显改善 RHRSP 脑血栓缺血后脑组织病理状态，降低血栓附着面积、减少梗死面积，增加梗死区内及周围脑组织的小血管数、减少脑出血现象、从而保护脑组织坏死脱落，具有保护脑血栓缺血致脑组织损伤的作用，且作用效果优于丹酚酸 A 单体化合物。

[0305] 实验例 14：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓后血脑屏障 (BBB) 通透性的影响

[0306] 1 试验方法

[0307] 动物分组及RHRSP脑血栓模型制备同实验例12方法。模型手术成功后的4.5h，各组分别尾静脉注射丹酚酸A组合物40mg/kg、20mg/kg、10mg/kg，丹酚酸A单体化合物10mg/kg，尼莫地平20mg/kg；假手术组和模型组尾静脉注射同体积的生理盐水。各组大鼠分别分批于MCAO术后（即脑血栓缺血后）6h、12h、24h处死取脑组织标本，并于处死前1h尾静脉注射2%伊文思蓝（Evans Blue，EB）生理盐水溶液2ml/kg体重，待充分循环后，深麻动物，剖胸经心脏灌注生理盐水冲洗血管内染料，断头取脑。

[0308] 各组随机抽取3只大鼠的脑组织，立即冰冻切片，连续行厚约30um的冠状切片，用70%甘油PBS缓冲液（pH8.5～9.0）封片，于Bio-Rad Radiance2100激光扫描共聚焦显微镜下观察脑组织中EB的渗出情况，观察BBB开放区域及程度。未观察时切片置4℃冰箱避光保存。各组随机另取5只大鼠的脑组织，吸干表面水分后称量脑湿重；将脑组织置于匀浆器中，加入50%三氯乙酸制成组织匀浆，移入试管密封静置60min以上；3000rpm/min离心10min，取上清液，荧光分光光度计测荧光值：激发波长620nm，发射波长680nm；按标准曲线计算出上清液中EB含量，再计算出每克脑组织EB含量，以此反应各大鼠BBB通透性。

[0309] 2 实验结果

[0310] 2.1 激光扫描共聚焦显微镜观察结果

[0311] EB在激发光状态下呈鲜艳明亮的红色荧光。激光显微镜下观察到各组动物脑组织无BBB脑区（如松果体、最后区和脑垂体）呈现均一、弥漫性EB浸染，边界清晰，脑膜可见红色荧光勾勒出的线样轮廓。而在BBB脑区，除假手术组之外的其他各组脑组织均可见光斑，且主要分布在丘脑、下丘脑、小脑、海马等处，光斑大小不一，荧光强度从光斑的中心抽外周逐渐减弱，边界模糊。各组的光斑数和分布明显不同：模型组光斑最多，约有120个左右直径约100～200um的光斑，密集处呈片状。各丹酚酸A组合物药物组光斑数目较模型组显著减少，且丹酚酸A组合物比同剂量的丹酚酸A单体化合物组光斑要少；丹酚酸A组合物各剂量组比较，呈现显著剂量差异性；其中以低剂量组光斑较多，在相同平面上光斑约有50个，但是融合成片状的较少；中剂量组光斑较少，散在分布；高剂量组光斑很少而散在，且荧光很弱。

[0312] 2.2 大鼠脑组织EB含量检测血脑屏障的通透性结果

[0313] 各组大鼠脑组织标本由测得的荧光值计算出EB含量，数据统计分析见表27。

[0314] 表27. 丹酚酸A组合物对RHRSP脑血栓后血脑屏障通透性的影响

[0315]

分组	n（只）	脑组织EB含量（ug/g）(x±s)		
		6h	12h	24h
假手术组	5	18.31±1.57	17.97±1.41	18.22±1.64
模型组	5	187.85±27.21 #	231.47±28.84 #	248.56±33.02 #
丹酚酸A组合物高	5	31.13±4.27 *	30.05±4.85 *	29.65±4.35 *

[0316]

剂量组				
丹酚酸A组合物中剂量组	5	53.75±5.62 *	56.35±5.25 *	51.66±5.64 *
丹酚酸A组合物低剂量组	5	81.68±9.18 *	90.48±10.27 *	88.63±6.45 *
丹酚酸A单体化合物组	5	58.38±6.12 *	62.87±6.35 *	56.45±5.73 *
尼莫地平组	5	57.57±5.72 *	63.32±5.45 *	57.42±5.85 *

[0317] 注：与假手术组比较，#P ＜ 0.01；与模型组比较，*P ＜ 0.01

[0318] 2.3 结论

[0319] EB 为水溶性染料，入血后能百分之百迅速与白蛋白结合，正常情况下不能透过血脑屏障。由 2.1 及 2.2 结果可见，假手术组 BBB 脑区，脑组织显微镜下未见 EB 渗出光斑；而模型组大鼠脑组织显微镜下有大量 EB 渗出光斑，且脑组织荧光分光光度计检出高含量的 EB，较假手术组有显著差异 (P ＜ 0.01)，表明脑血栓后脑组织血脑屏障破坏，通透性增加，EB 结合白蛋白可通过开放的 BBB 进入脑组织。实验结果显示丹酚酸 A 组合物各剂量组大鼠脑组织显微镜下 EB 光斑数以及脑组织 EB 检出含量明显减少，与模型组比较均有显著差异 (P ＜ 0.01)，且要少于同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组。提示丹酚酸 A 组合物对脑损伤后血脑屏境通透性增加具有抑制作用，能保护血脑屏障，而保护脑组织进一步受损伤，做用效果强于丹酚酸 A 单体化合物。

[0320] 实验例 15：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓后脑梗死范围及脑含水量的影响

[0321] 按实验例 12 的方法制备 RHRSP 脑血栓大鼠模型、分组、给药；最后一次给药结束后，大鼠断头取脑。各组随机取 5 只大鼠的脑组织切片，经 TTC 染色，以梗死灶为中心在显微镜下拍照后，将梗死灶划定，用图像分析软件处理并计算每张脑片的梗死面积。每只大鼠所有脑片梗死面积相加，即为脑梗死面积，乘以每张脑片的厚度约 2mm，即为脑梗死体积；同时取相对应大鼠所有脑片以同样方法近似计算出相对应的脑总体积；二者比值计算脑梗死体积百分比。各组另取 5 只大鼠脑组织立即称湿重，之后置 105℃烘箱中烘干至恒重，计算脑组织含水量。

[0322] 表 28. 丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓后脑梗死范围及脑含水量的影响 (x ± s)

[0323]

组别	脑梗死体积(mm^3)	相应脑总体积(mm^3)	脑梗死体积比(%)	脑含水量（%）
假手术组	0	754.90±23.14	0	76.47±7.46
模型组	129.62±7.11 #	759.55±40.74	18.17±2.17 #	83.72±9.35 #
丹酚酸 A 组合物高剂量组	42.96±5.45*	788.68±21.35	5.85±1.41*	76.65±6.47*
丹酚酸 A 组合物中剂量组	56.36±7.85*	756±11.85	6.75±0.85*	77.97±7.14*
丹酚酸 A 组合物低剂量组	78.64±5.45*	770.75±31.35	8.99±1.26*	79.65±7.28*
丹酚酸 A 单体化合物组	64.35±6.26*	774.73±14.28*	7.45±0.83*	79.06±7.13*
尼莫地平组	80.83±6.37*	773.27±19.25	10.63±1.47*	80.18±7.15*

[0324] 注：与假手术组比较，#P ＜ 0.01；与模型组比较，*P ＜ 0.01

[0325] 采用 SPSS11.5 统计软件包对数据进行统计学处理。实验结果表明：假手术组未见梗死脑组织；丹酚酸 A 组合物各剂量组脑组织梗死体积及脑含水量明显小于模型对照组（P ＜ 0.01），且剂量越大，梗死体积越小，脑含水量越少，差异具有统计学意义（P ＜ 0.01 或 p ＜ 0.05）。丹酚酸 A 组合物低、中、高剂量组梗死体积及脑含水量均低于尼莫地平组。10mg/kg 丹酚酸 A 组合物组大鼠脑梗塞体积和脑含水量均比同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组要低。说明丹酚酸 A 组合物可更有效地加速病灶的修复，减小 RHRSP 脑血栓后缺血脑组织梗死范围，减轻脑组织水肿，具有修复和保护缺血后脑组织损伤的作用。

[0326] 实验例 16：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓缺血后大鼠脑组织微血管的影响

[0327] 动物分组及 RHRSP 脑血栓模型制备同实验例 12 方法。模型手术成功后的 4.5h 尾静脉给药，此后每天给药一次，直至取材完毕。丹酚酸 A 组合物各剂量组分别尾静脉注射丹酚酸 A 组合物 20mg/kg、10mg/kg、5mg/kg，丹酚酸 A 单体化合物组注射丹酚酸 A 单体化合物 10mg/kg，尼莫地平组注射尼莫地平 10mg/kg；模型组及假手术组注射同体积的生理盐水。各组分别于 MCAO 术后 6h、1d、3d、7d 分批取大鼠断头取脑，缺血灶半暗带区或相同部位的脑组织 4% 多聚甲醛中性 P3S 缓冲液常规固定、脱水、石蜡包埋、切片，每片厚约 5um。SABC 法 CD31 免疫组化染色，按免疫组化试剂盒说明操作；DAB 显色。用 PBS 代替一抗作阴性对照。不以红细胞或管腔的出现与否来计数血管。凡染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数，凡管腔大于 8 个红细胞大小、带有较厚肌层的血管区域血管均不计数。血管计数按 Weidner 法进行。先在低倍（×40）视野下找到高血管密度区域，然后在高倍（×400）视野下进行微血管计数，每张切片随机选取 10 个高倍视野，最后取其平均值作为该标本的微血管密度值（MVD）。并采用全自动彩色图像处理系统进行图像分析，测定血管场面积比（阳性目标面积 / 统计场总面积）。

[0328] 表 29 各组大鼠脑组织血管场面积、CD31 免疫阳性微血管密度（MVD）值（n ＝ 6）

[0329]

分组		假手术组	模型组	丹酚酸A组合物高剂量组	丹酚酸A组合物中剂量组	丹酚酸A组合物低剂量组	丹酚酸A单体化合物组	尼莫地平组
血管场面积‰（x±s）	6h	24.3±3.6	25.3±2.4	38.0±3.0 *	35.8±3.7 *	32.6±2.2 *	33.7±2.9 *	27.3±2.7☆
	1d	24.5±2.8	27.1±2.1	34.9±3.1 *	32.6±3.1 *	31.3±2.0 *	31.6±3.1 *	28.8±3.3 *
	3d	24.9±3.1	21.5±2.5 #	36.8±2.6 *	34.6±2.5 *	31.4±1.5 *	32.8±2.3 *	30.7±2.4 *
	7d	24.6±3.5	19.7±2.1 #	35.6±2.0 *	33.3±2.2 *	31.9±2.6 *	32.4±2.6 *	30.6±3.5 *
MVD（x±s）	6h	28.31±2.41	28.93±2.87	47.05±2.35 *	44.02±2.14 *	39.12±2.75 *	40.68±2.37 *	32.75±2.86☆
	1d	28.95±3.15	30.25±3.21	44.12±3.14 *	40.95±2.54 *	36.86±3.08 *	38.15±3.61 *	33.90±3.50 *
	3d	28.53±2.33	23.75±2.81 #	43.08±2.38 *	39.65±2.42 *	36.25±2.45 *	37.28±2.35 *	34.87±2.71 *
	7d	28.63±2.37	20.71±2.42 #	42.12±2.45 *	38.45±2.41 *	35.75±2.63 *	36.92±2.47 *	34.15±2.55 *

[0330] 注：与假手术组比较，#P＜0.01；与模型组比较，＊P＜0.01，☆P＜0.05

[0331] 表29实验数据结果显示，与假手术组比较，模型组缺血半暗带区MVD和血管场面积在缺血后1d有所增加，但是缺血后3d、7d持续显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，缺血治疗后，尼莫地平组和丹酚酸A组合物各剂量组以及丹酚酸单体化合物组在缺血后6h、1d、3d、7d脑组织缺血半暗带区MVD和血管场面积不同程度地显著增高（P＜0.05或P＜0.01），且7d内比较稳定。三种不同药物比较，以丹酚酸A组合物效果最为显著。丹酚酸A组合物三个剂量组之间比较，差异具有统计学意义（P＜0.05）。结果表明丹酚酸A组合物能增加脑组织缺血半暗带的MVD和血管场面积比，提示丹酚酸A组合物能促进微血管新生和侧枝循环建立的作用，且效果优于丹酚酸A单体化合物和尼莫地平。

[0332] 实验例17：丹酚酸A组合物对RHRSP脑血栓缺血后大鼠脑组织血管内皮生长因子表达影响

[0333] 造模及分组给药同实验例12。分别于大鼠MCAO术后2h、24h、48h，各组分批取大鼠腹腔麻醉，开胸暴露心脏，经心脏灌注含0.1%DEPC的4%多聚甲醛液固定，迅速取脑，于前脑视神经交叉处作约2mm厚的冠状切片。置于4%多聚甲醛固定液中过夜，常规脱水，石蜡包埋，连续切成约5um厚的石蜡切片，常规脱蜡至水，用原位杂交法检测血管内皮生长因子信使核糖核酸（VEGFmRNA）的表达。按VEGF原位杂交试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）说明进行操作，用显微镜图像分析软件进行光密度（IOD）分析。

[0334] 表30. 丹酚酸A组合物对RHRSP脑血栓缺血后脑组织血管内皮生长因子表达的影响

[0335]

实验分组	n（只）	VEGFmRNA（x±s）		
		2h	24h	48h
假手术组	6	2.57±0.06	2.58±0.09	2.53±0.07
模型组	6	4.03±0.11 #	3.97±0.13 #	4.07±0.16 #
丹酚酸 A 组合物高剂量组	6	8.13±0.13 *	7.98±0.17 *	7.58±0.11 *
丹酚酸 A 组合物中剂量组	6	6.58±0.10 *	6.68±0.12 *	6.28±0.17 *
丹酚酸 A 组合物低剂量组	6	5.18±0.11☆	5.24±0.17☆	5.25±0.16☆
丹酚酸 A 单体化合物组	6	5.67±0.15☆	5.88±0.14 *	5.82±0.11 *
尼莫地平组	6	5.12±0.14☆	5.30±0.11☆	5.33±0.13☆

[0336] 注：与假手术组比较，#P < 0.05；与模型组比较，*P < 0.01，☆ P < 0.05

[0337] 血管内皮生长因子（VEGF），又叫血管调理素，具有促内皮细胞分裂的作用，可以促进血管的生长和侧支循环的建立。实验结果显示，模型组 VEGFmRNA 表达水平较假手术组有明显升高（P < 0.05），说明脑组织缺血缺氧后能刺激脑组织内 VEGF 的表达增加，提示脑梗死后机体自身会出现一种对抗缺血性损伤的保护性反应，使 VEGF 的表达增加，在缺血后出现自身“代偿性血管再生”。丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组组比较，VEGFmRNA 表达水平显著升高（P < 0.05 或 P < 0.01），且优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物组。提示丹酚酸 A 组合物能显著促进缺血脑组织血管新生，促进侧枝循环代偿的建立，挽救缺血半暗带，保护缺血导致的脑组织损伤，且存在一定的量效关系。

[0338] 实验例 18：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓缺血后大鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达影响

[0339] 同实验例 17，分别于大鼠术后 2h、24h、48h，各组分批取大鼠心脏灌注含 0.1% DEPC 的 4% 多聚甲醛液固定，迅速取脑，行冠状切片，石蜡包埋、切片。免疫组化 ABC 染色法检测脑组织碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）蛋白的表达。按 bFGF 蛋白免疫组化检测试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）说明书进行操作，显微镜下观察，计数染成棕黄色的阳性细胞数，每个切片随机选 5 个梗死灶周视野，取平均值。数据进行统计分析。

[0340] 表 31. 丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓缺血后大鼠脑组织 bFGF 蛋白表达影响（x±s）

[0341]

分组	n（只）	2h	24h	48h
假手术组	6	1.23±0.16	1.23±0.13	1.23±0.09
模型组	6	2.03±0.21	2.97±0.18 #	2.31±0.23
丹酚酸 A 组合物高剂量组	6	6.57±0.38 *	8.65±0.34 *	8.42±0.20 *
丹酚酸 A 组合物中剂量组	6	5.29±0.42 *	6.17±0.40 *	6.52±0.34 *
丹酚酸 A 组合物低剂量组	6	4.02±0.34 *	5.21±0.54 *	5.20±0.27 *
丹酚酸 A 单体化合物组	6	4.85±0.55 *	5.72±0.53 *	6.14±0.52 *
尼莫地平组	6	5.03±1.65 *	5.15±0.35 *	4.32±0.44 *

[0342] 注：与假手术组比较，#P ＜ 0.05；与模型组比较 *P ＜ 0.01

[0343] bFGF 是具有多种生物学活性的强有力的神经营养因子，能保护神经元对抗缺血、缺氧、兴奋性氨基酸毒性、钙超载、自由基和 NO 合成等多种损害作用，减缓神经细胞凋亡和坏死；且能协同 VEGF 促进梗死区内血管新生的作用。

[0344] 实验结果显示，在缺血发生后，模型组大鼠脑组织 bFGF 蛋白表达较假手术组有所升高，到缺血 24h 有显著性差异（P ＜ 0.05），但随缺血时间的延长，有下降的趋势，提示脑组织缺血缺氧后，机体自身产生短暂的保护应激反应，可刺激脑组织内源性 bFGF 蛋白表达增加。尼莫地平组、丹酚酸 A 组合物各剂量组以及丹酚酸 A 单体化合物组与模型组比较，各时间段的 bFGF 蛋白表达均显著增高（P ＜ 0.01）；以丹酚酸 A 组合物效果最优。丹酚酸 A 组合物三个剂量组之间比较，差异具有统计学意义（P ＜ 0.05）；各剂量组自身各时间段比较显示，bFGF 蛋白表达持续稳定；提示丹酚酸 A 组合物能增加缺血脑组织原发和继发 bFGF 蛋白表达，具有很好的神经细胞保护作用和促进血管生成的作用，有助于侧枝循环的建立，挽救缺血半暗带，且作用效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0345] 实验例 19：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠神经症状的影响

[0346] 雄性 SD 大鼠（250±20）g，随机分为 7 组：假手术组，缺血再灌注模型对照组、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量（10mg/kg、5mg/kg、2.5mg/kg）组，丹酚酸 A 单体化合物组（10mg/kg），尼莫地平对照组（10mg/kg）。采用改良线栓法制备大鼠大脑周灶性缺血再灌注模型：雄性 SD 大鼠，戊巴比妥钠腹腔麻醉。暴露并分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及翼腭动脉，结扎颈外动脉远心端，微动脉夹夹闭颈总动脉，结扎翼腭动脉，于颈外动脉近颈总动脉分叉处剪一切口，将头端涂有光滑石蜡直径约为 0.3mm 的鱼线经左侧颈外动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进，以颈总动脉分叉处为标记，推进 18 ～ 20mm 感到轻微阻力时，即阻塞大脑中动脉导致脑缺血。鱼线外留约 1cm 以备再灌注用，消毒、缝合皮肤。在持续缺血 2h 后，拔出栓线，实现缺血再灌注模型。假手术组除不插线外，其余操作过程同模型组。各组在缺血前 30min 以及再灌注开始时各经尾静脉注射给药一次，此后每天各注射一次，持续至取材。假手术组和缺血再灌注模型对照组给予同体积的生理盐水。

[0347] 分别在大鼠脑缺血再灌注后 3h、24h、48h、72h 各进行一次神经功能缺损评分，评分采用 Bederson 改良法：提鼠尾离开地面约一尺，观察前肢屈曲情况，如双前肢对称伸向

地面计为 0 分；如手术对侧前肢出现腕屈曲计 1 分、肘屈曲计 2 分、肩内旋计 3 分、既有腕肘的屈曲又有肩内旋计 4 分。将大鼠置于平地上，分别推双肩向对侧移动，检查阻力，如双侧阻力对称且有力，记为 0 分；如向手术对侧推动时阻力下降者，据下降程度不同分为轻、中、重度，分别计为 1、2、3 分。将大鼠两前肢置于金属网上，观察两前肢的肌张力，双侧肌力对等且有力者计为 0 分，手术对侧肌张力下降程度分为轻、中、重度，分别计为 1、2、3 分。大鼠不停向一侧转圈者，计为 1 分。根据以上评分标准，满分为 11 分，分数越高，说明大鼠的行为障碍程度越严重、神经功能缺损越严重。具体数据见表 32。

[0348] 表 32. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响（x±s，n＝12）

[0349]

组 别	再灌注后 3h	再灌注后 24h	再灌注后 48h	再灌注后 72h
假手术组	0	0	0	0
模型组	6.95±1.36	7.12±1.83	6.52±1.20	5.74±1.52
丹酚酸 A 组合物高剂量组	4.85±1.14**	2.27±1.42**	1.98±1.25**	1.34±0.75**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	5.23±1.28**	2.75±1.18**	2.42±1.34**	2.18±1.17**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	5.92±1.36*	3.62±1.52**	3.18±1.42**	2.67±1.44**
丹酚酸 A 单体化合物组	5.62±1.35*	3.35±1.27**	3.07±1.23**	2.41±1.38**
尼莫地平组	4.90±1.65**	4.05±1.05**	3.95±1.26**	3.25±1.06**

[0350] 注：与模型组比较，**P＜0.01，*P＜0.05

[0351] 试验结果可知，缺血再灌注模型组神经功能严重缺损，持续到再灌后 72h，虽然较再灌注后 3h、24h 的行为学障碍显著减轻（P＜0.05），但神经功能缺损仍然较严重（神经功能缺损评分仍大于 5）。尼莫地平组和丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组相比，从再灌注 3h 起，神经功能缺损症状减轻，神经行学缺损分数显著降低（P＜0.05 或 P＜0.01），至再灌注 72h，各药物组大鼠的神经行为基本恢复。丹酚酸 A 组合物各剂量组之间：低剂量组与中、高剂量组评分比较有统计学意义（P＜0.05）；高剂量组与中剂量组之间评分比较有降低的趋势，但是差异没有统计学意义（P＞0.05）。丹酚酸 A 组合物组大鼠各时间段神经缺损症状要轻于同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组。

[0352] 实验结果表明丹酚酸 A 组合物能减轻脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损症状，有利于其神经行为的恢复，提示丹酚酸 A 组合物具有改善脑组织损伤后神经症状的作用，且作用效果比丹酚酸 A 单体化合物明显。

[0353] 实验例 20：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑梗死范围、脑指数及脑含水量的影响

[0354] 实验例 19 各组大鼠在最后一次神经行为学评分后，每组各取 6 只断头取脑，立即置于 -20℃冰箱冷冻 10min，去除嗅球、小脑和低位脑干后，行 2mm 厚度的脑组织连续冠状切片，将脑片浸入 2% TTC 溶液中，37℃染色 10min，取出，置于 4%多聚甲醛 PBS 缓冲液中固定 2h。正常组织染成红色，梗死灶呈白色。将固定的脑片按切片顺序排列，显微镜下拍照脑片

前后两面后输入计算机，根据各切片厚度计算出前脑体积和梗死体积的近似值，得出梗死体积占前脑体积的百分比。

[0355] 各组另外 6 只大鼠断头取脑后，立即称脑湿重，105℃烘箱中烘干至恒重，计算脑含水量以及脑指数。

[0356] 表 33. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积比、脑指数、脑含水量的影响（x±s，n = 6）

[0357]

组 别	脑梗死体积比（%）	脑指数(脑重 g/100g 体重）	脑含水量（%）
假手术组	0	0.564±0.049	73.42±7.25
模型组	17.58±2.55	0.637±0.052	79.21±8.35
丹酚酸 A 组合物高剂量组	4.08±1.26**	0.555±0.064**	74.24±6.14**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	6.97±1.85**	0.563±0.048**	75.12±5.37**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	9.34±1.64**	0.598±0.024*	76.08±7.28*
丹酚酸 A 单体化合物组	7.83±1.42**	0.592±0.057**	75.97±7.81**
尼莫地平组	9.74±1.10**	0.598±0.054**	76.15±7.90**

[0358] 注：与模型组比较 *p < 0.05，**p < 0.01

[0359] 实验数据显示，丹酚酸 A 组合物各剂量组与缺血再灌注模型组相比：脑梗死体积比显著减少（P < 0.01），脑指数以及脑含水量均明显减少（P < 0.01 或 P < 0.05）；丹酚酸 A 组合物低剂量组与尼莫地平组比较无统计学差异；丹酚酸 A 组合物中、高剂量组与尼莫地平组比较，其梗死体积和脑指数以及脑含水量均显著降低（P < 0.05 或 P < 0.01），且低于同剂量丹酚酸 A 单体化合物组；表明丹酚酸 A 组合物能减少脑缺血再灌注大鼠脑组织梗塞范围，能减轻脑缺血再灌注损伤后的脑组织水肿程度，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0360] 实验例 21：丹酚酸 A 组合物对脑缺血大鼠脑组织缺血半暗带局部脑血流量（rCBF）的影响

[0361] 1 试验方法

[0362] 采用改良线栓法制备大鼠大脑局灶性缺血模型：雄性 SD 大鼠，戊巴比妥钠腹腔麻醉。暴露并分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及翼腭动脉，结扎颈外动脉远心端，微动脉夹夹闭颈总动脉，结扎翼腭动脉，于颈外动脉近颈总动脉分叉处剪一切口，将头端涂有光滑石蜡直径约为 0.3mm 的鱼线经左侧颈外动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进，以颈总动脉分叉处为标记，推进 18 ～ 20mm 感到轻微阻力时，即阻塞大脑中动脉导致脑缺血。鱼线外留约 1cm 以备再灌注用，消毒、缝合皮肤。假手术组除不插线外，其余操作过程同模型组。

[0363] 成功后的模型随机分为尼莫地平组（10mg/kg）、丹酚酸 A 单体化合物组（10mg/kg）、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组（10mg/kg、5mg/kg、2.5mg/kg）。各组动物在模型成功后立即尾静脉给予相应药物，假手术组和模型组给予同体积的生理盐水。采用激光多普勒

血流监测仪经颅测量 rCBF。使用氰基丙烯酸酯将直径为 0.5mm 的激光多普勒探头紧贴颅骨表面固定，立体定位仪下分别选择前囟后 1mm 中线右侧旁开 2mm 为缺血半暗带 rCBF 监测点、前囟后 2mm 中线右侧旁开 6mm 为缺血中心区 rCBF 监测点，记录血流量，缺血后持续监测 2h。记录给药前和给药后的血流量。

[0364] 2 试验结果

[0365] 大鼠大脑中动脉缺血后，缺血中心区脑血流量下降到造模前正常 rCBF 的 10%～20%之间，缺血半暗带 rCBF 下降到造模前 rCBF 的 30%～40%之间。给药后 10min，各药物组大鼠脑组织缺血半暗带区 rCBF 较给药前均已有不同程度的升高，给药后 30min，各药物组脑组织缺血半暗带区 rCBF 已达到高峰。具体实验数据经统计分析见表 34。

[0366] 表 34. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血大鼠持续缺血期脑组织缺血半暗带 rCBF 的影响 (x±s，n = 10)

[0367]

[0368]

组别 / 药后	假手术组	模型对照组	丹酚酸 A 组合物 高剂量组	丹酚酸 A 组合物 中剂量组	丹酚酸 A 组合物 低剂量组	丹酚酸 A 单体化合物组	尼莫地平组
0 min	123.52±10.57	38.85±5.21*	39.12±4.38*	39.36±5.46*	38.25±4.61*	38.93±4.82*	39.12±5.22*
10 min	121.27±11.21	39.38±5.43*	44.54±4.17★	43.14±5.36☆	41.28±4.46☆	41.44±4.91▽	44.98±5.18★
20 min	121.74±10.41	38.82±4.92*	47.89±5.36★	46.08±4.24★	42.75±4.43☆	43.71±5.03▽	46.94±4.96★
30 min	122.74±10.41	37.65±5.49*	50.57±4.26★	49.13±4.07★	46.98±5.28★	47.85±4.92★	50.27±5.05★
60 min	119.95±11.18	37.36±4.87*	50.05±5.34★	48.86±4.33★	45.62±5.41★	46.27±5.30★	48.46±5.12★
120 min	122.22±10.75	36.76±5.25*	49.65±4.38★	48.02±5.37★	45.64±4.34★	44.65±5.07▽	47.52±4.83★

[0369] 注：与假手术组（基线值）比较 *P < 0.01；与给药前比较，★ P < 0.01，☆ p < 0.05

[0370] 3 结果分析

[0371] 由表 34 数据可知，手术造模后，模型对照组及各药物组脑组织半暗带 rCBF 与假手术组相比，有极显著差异 (p < 0.01) 表示造模成功。给药后 10min 始，各药物组较自身给药前缺血半暗带 rCBF 有明显上升，且以尼莫地平和丹酚酸 A 组合物高剂量组尤为显著 (p < 0.01)；到给药后 30min，各药物组缺血半暗带 rCBF 升至最高，与给药前各组自身 rCBF 基线值比较，升高了 15%～30%；此后虽有下降的趋势，但是持续到缺血 2h，各药物组较模型组以及自身给药前相比，仍有显著统计学差异 (p < 0.01 或 p < 0.05)；丹酚酸 A 组合物各剂量组相比，有良好的量效关系；丹酚酸 A 组合物中剂量组各时段的 rCBF 与尼莫地平组相当，且高于同剂量丹酚酸 A 单体化合物。由此可知，丹酚酸 A 组合物有增加脑缺血大鼠脑组织缺血半暗带 rCBF 的作用，从而有利于挽救缺血半暗带濒临死亡的脑组织，发挥治疗脑缺血的作用。

[0372] 实验例 22：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织缺血半暗带 rCBF 的影响

[0373] 实验例 21 中各组大鼠在持续缺血 2h 观测缺血半暗带 rCBF 后，拔出栓线，实现缺

血再灌注模型。模型建立后，各组尾静脉给药，给药剂量同实验例 16。仍然按实验例 16 所述方法测定再灌后 3h 脑组织缺血半暗带 rCBF。比较各组大鼠再灌后不同时间段 10min、30min、60min、90min、120min、180min 脑组织缺血半暗带 rCBF。数据进行统计分析。具体数据见表 35。

[0374] 表 35. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织缺血半暗带 rCBF 的影响 (x±s，n = 10)

[0375]

组别 / 再灌	假手术组	模型对照组	丹酚酸 A 组合物高剂量组	丹酚酸 A 组合物中剂量组	丹酚酸 A 组合物低剂量组	丹酚酸 A 单体化合物组	尼莫地平组
10min	122.37±11.02	45.35±5.17*	70.02±5.46★	65.26±4.45★	59.58±4.32★	62.73±4.62★	64.02±4.72★
30 min	123.27±10.15	52.43±5.23*	80.88±4.24★	73.85±5.18★	72.13±5.35★	68.15±4.97★	70.65±5.15★
60 min	121.20±10.25	62.75±4.65*☆	91.15±5.62★	84.54±5.62★	78.35±4.42★	81.37±5.06★	83.36±4.63★
90 min	119.75±10.05	60.86±5.25*☆	88.48±4.28★	82.62±4.45★	76.05±4.84★	79.55±4.80★	81.51±4.75★
120 min	121.55±10.74	50.27±4.55*	85.64±4.09★	79.47±5.28★	74.85±5.35★	75.83±5.14★	78.38±4.85★
180 min	121.84±10.54	47.55±4.90*	84.75±4.32★	78.65±4.32★	74.34±4.66★	74.72±5.03★	77.52±5.05★

[0376] 注：与假手术组比较，*P < 0.01；与再灌前比较，☆ p < 0.01；与模型组比较，★ P < 0.01

[0377] 实验结果显示，在大鼠持续缺血 2h 恢复再灌后，各组大鼠缺血半暗带 rCBF 均有不同程度的增加。模型组大鼠在 60、90 分钟缺血半暗带 rCBF 升至最高水平，与再灌前比有明显统计学意义 (P < 0.01)，但也仅约为缺血前基线值的 50%，此后又急剧下降，再灌 3h 内，rCBF 值在缺血前基线值的 37%～50%之间，在这期间再灌注仍然是不完全的，仍呈低灌注现象，脑组织会持续受损。再灌后，尼莫地平、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组大鼠 rCBF 明显增高，各时间段 rCBF 与模型组相比都有极显著差异 (P < 0.01)。再灌后 1h，丹酚酸 A 组合物高剂量组 rCBF 恢复至接近原 rCBF 的 76%、丹酚酸 A 组合物中剂量组恢复至约为原 rCBF 的 70%、尼莫地平组恢复至约为原 rCBF 的 69%、10mg/kg 丹酚酸 A 单体化合物组恢复至原 rCBF 的 65%左右，丹酚酸 A 组合物低剂量组恢复至约为原 rCBF 的 62%；丹酚酸 A 组合物各剂量组比较，呈剂量依赖性；且至再灌注 3h 内，各药物组 rCBF 都维持在相对稳定的范围内。实验结果提示，丹酚酸 A 组合物能明显改善大鼠缺血再灌注后缺血半暗带脑组织的脑血流量，恢复脑细胞血供，从而挽求缺血半暗带，防止脑组织进一步损伤甚至死亡，且效果优于丹酚酸 A 单体化合物的，对缺血性脑血管病有很好的治疗作用。

[0378] 实验例 23：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织能量代谢的影响

[0379] 实验例 22 各组动物在测定完再灌注后 3h 的脑血流量以后，断头处死，取脑至液氮里冷冻；一周后取 100mg 相应部位的脑组织，冷冻状态下粉碎，用高氯酸匀浆除蛋白，低温离心 10min，上清液用 KOH 中和，漩涡振荡，再低温离心 10min，取上清液，高效液相色谱法测定脑组织三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、单磷酸腺苷 (AMP)、乳酸 (LA)、磷酸肌酸 (PC) 含量。

[0380] 表 36. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织能量代谢的影响 (x±s，μmol/

g，n = 10)

[0381]

组 别	ATP	ADP	AMP	LA	PC
假手术组	3.97±0.31	0.57±0.07	0.52±0.05	3.68±0.35	2.93±0.18
模型组	1.75±0.16*	0.35±0.03*	0.41±0.08*	7.17±0.52*	0.36±0.04*
丹酚酸A组合物高剂量组	3.58±0.19**	0.50±0.02**	0.48±0.07☆	3.78±0.34**	2.47±0.12**
丹酚酸A组合物中剂量组	3.35±0.41**	0.47±0.07**	0.45±0.04☆	4.11±0.44**	1.97±0.20**
丹酚酸A组合物低剂量组	2.78±0.26**	0.43±0.04☆	0.42±0.06☆	4.75±0.34**	1.24±0.25**
丹酚酸A单体化合物组	3.15±0.23**	0.43±0.06☆	0.44±0.04☆	4.32±0.43**	1.85±0.17**
尼莫地平组	3.17±0.25**	0.45±0.05**	0.47±0.05**	4.45±0.51**	2.07±0.23**

[0382] 注：与假手术组比较，*P < 0.01；与模型组比较，**P < 0.01，☆ P < 0.05

[0383] ATP、ADP、AMP、LA、PC为机体能量代谢产物。由表36实验数据可以看出，模型组ATP、ADP、AMP、PC较假手术组显著降低、LA显著升高（P < 0.01），说明大鼠脑缺血后脑组织能量代谢严重障碍，ATP耗竭快速，脑能量供给显著减少，无氧代谢产物LA堆积严重，即使实施再灌后能量代谢紊乱依然存在。而各给药组与模型组相比，脑组织ATP含量极显著升高（P < 0.01），LA显著降低，结果显示丹酚酸A组合物能升高脑组织ATP、ADP、AMP、PC的含量，降低脑组织LA含量，能显著改善大鼠脑缺血以及缺血再灌注的能量代谢。提示丹酚酸A组合物可通过改善缺血后脑组织的能量代谢，增加脑组织能量物质的供应，增强脑细胞的生存能力，挽救脑缺血后的缺血半暗带濒临死亡的脑细胞，防止脑组织进一步损伤甚至死亡，且作用效果较丹酚酸A单体化合物和尼莫地平明显，可很地用于治疗缺血性脑血管病。

[0384] 实验例24 丹酚酸A组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织神经细胞凋亡率的影响

[0385] 同实验例19方法制备大鼠脑缺血再灌注模型、分组、给药。在大鼠脑缺血2h再灌24h后，断头取脑，用4%多聚甲醛固定，切片，石蜡包埋，制备厚3μm厚的冠状切片；采用终末去氧核糖核酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法（TUNEL法）检测脑组织神经细胞，严格按试剂盒说明书操作，DAB显色，光镜下凋亡细胞核呈棕色。每张切片随机选取不重复的5个高倍(40×10)视野，输入计算机进行图象分析，检测TUNEL阳性的凋亡细胞个数和正常细胞数，计算出神经细胞凋亡率，结果取平均值。

[0386] 表37 丹酚酸A组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织神经细胞凋亡率的影响

[0387]

组 别	神经细胞凋亡率（%）
假手术组	2.17±0.56
模型组	26.32±1.53 #
丹酚酸 A 组合物高剂量组	5.03±1.51**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	7.35±2.35**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	11.39±2.64*
丹酚酸 A 单体化合物组	8.28±2.56**
尼莫地平组	9.90±2.65*

[0388] 与假手术组比较 #P ＜ 0.001；与模型组比较，**P ＜ 0.001，*P ＜ 0.01

[0389] 神经细胞凋亡是脑缺血及缺血－再灌损伤迟发性神经元死亡的主要形式，可决定缺血性脑血管病最终的脑组织损伤程度。实验结果显示，大鼠脑缺血 2h 再灌 24h 后，神经细胞凋亡严重；而尼莫地平、丹酚酸 A 单体化合物以及不同剂量丹酚酸 A 组合物干预后，与模型组比较，大鼠脑组织内神经细胞凋亡显著减少（P ＜ 0.001 或 P ＜ 0.01），且以丹酚酸 A 冻干粉针高、中剂量组的凋亡率最低；表明丹酚酸 A 组合物具有抑制神经细胞凋亡、抑制脑缺血损伤致大鼠脑组织神经元死亡的作用，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0390] 实验例 25 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织神经营养因子的影响

[0391] 同实验例 24 方法制备脑缺血再灌注大鼠模型、分组并给药。缺血再灌 24h 后经主动脉插管，生理盐水冲洗，4％多聚甲醛灌注后断头取脑，脑组织固定，脱水、石蜡包埋，切片，厚约 5μm，免疫组化法检测大鼠脑组织内神经营养因子神经生长因子（NGF）、脑源性神经营养因子（BDNF）、神经营养因子 -3（NT-3）蛋白表达；以 PBS 代替一抗为阴性对照；以细胞的胞浆、胞膜、轴突呈棕色或棕黄色颗粒着为免疫阳性。光镜下观察，采图并用图像分析系统分析，测量其平均灰度值。平均灰度越高，表示阳性细胞的强度越弱。

[0392] 表 38 丹酚酸 A 组合物对大鼠脑组织神经营养因子蛋白表达（灰度值）的影响

[0393]

组 别	NGF	BDNF	NT-3
假手术组	116.52±16.83	139.52±19.51	44.26±7.85
模型对照组	108.25±17.14	127.54±20.27#	83.87±14.26▽
丹酚酸 A 组合物高剂量组	81.66±14.83△	96.91±14.92△	54.38±7.96△
丹酚酸 A 组合物中剂量组	88.57±15.49△	107.25±17.16△	60.69±10.05△
丹酚酸 A 组合物低剂量组	96.32±14.85 *	117.52±16.45*	68.11±11.50*
丹酚酸 A 单体化合物组	90.57±14.32△	110.16±15.97*	63.37±8.82△
尼莫地平组	101.32±15.82 *	116.50±18.75*	66.83±4.43△

[0394] 与假手术组比较，#P ＜ 0.05，▽P ＜ 0.01；与模型对照组比较，*P ＜ 0.05，△P

＜0.01。

[0395] 神经营养因子是神经元生长与存活必需的一组蛋白质分子，对神经元生长、发育以及功能的完整性起支持作用。NGF、BDNF、NT-3 是神经营养因子家族的一部分，可以维持神经元存活和促进神经细胞分化和诱导轴突生长；能保护神经元、促进神经元修复以及抑制迟发性神经元死亡，从而对抗脑缺血、保护脑缺血损伤。实验结果显示，缺血再灌后，大鼠脑组织内 NGF、BDNF 表达较假手术组有所增高，提示脑缺血再灌损伤后，脑组织内 NGF、BDNF 表达应激保护性增加；但缺血后脑组织内 NT-3 含量明显减少。与模型对照组比较，丹酚酸 A 组合物各剂量组 NGF、BDNF、NT-3 蛋白表达均明显增强（P＜0.05 或 P＜0.01），且有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物以及尼莫地平的趋势。提示丹酚酸 A 组合物能增强缺血损伤脑组织内源性神经营养因子 NGF、BDNF、NT-3 的表达，为神经元存活提供条件，而达到神经元保护的作用。

[0396] 实验例 26 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠炎症细胞因子的影响

[0397] 同实验例 24 方法制备脑缺血再灌注大鼠模型、分组并给药。缺血再灌 24h 后迅速断头取脑，取缺血侧脑组织制成 10％组织匀浆液，低温 2000r/min 离心 10min，取上清液，用 ELISA 试剂盒测定各炎症细胞因子的含量：白细胞介素 -1β（IL-1β）、白细胞介素 -6（IL-6）、白细胞介素 -8（IL-8）、肿瘤坏死因子（TNF-α）、细胞间粘附分子 -1（ICAM-1）。

[0398] 表 39 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠炎症细胞因子的影响

[0399]

组别	IL-Iβ	IL-6	IL-8	TNF-α	ICAM-1
假手术组	1.13±0.25	57.63±6.25	0.21±0.05	1.18±0.22	\
模型对照组	3.26±1.33#	121.37±9.85#	0.97±0.09#	2.95±0.63#	14.64±1.83#
丹酚酸 A 组合物高剂量组	1.62±0.43△	69.73±5.92△	0.25±0.04△	1.46±0.51△	3.32±0.58△
丹酚酸 A 组合物中剂量组	1.91±0.59△	76.81±6.11△	0.33±0.08△	1.58±0.43△	4.33±0.50△
丹酚酸 A 组合物低剂量组	2.24±0.74*	92.25±8.63△	0.46±0.05△	1.82±0.57*	6.57±1.14△
丹酚酸A单体化合物组	1.96±0.55△	80.35±7.23△	0.38±0.05△	1.65±0.52△	4.99±0.73△
尼莫地平组	2.13±0.92*	87.36±7.21△	0.51±0.04△	1.86±0.50*	6.83±0.95△

[0400] 与假手术组比较，#P＜0.001；与模型组比较，△P＜0.01，*P＜0.05。

[0401] 实验结果显示，缺血再灌注后，脑组织内炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α、ICAM-1 含量均极显著增加（P＜0.001）；给予丹酚酸 A 组合物各剂量组的大鼠脑组织各炎症细胞因子含量较模型组明显降低，且较同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组以及尼莫地平组显著。提示丹酚酸 A 组合物可以抑制缺血损伤脑组织炎症细胞因子的表达，抑制脑组织炎症反应的发生，抑制炎性反应介导的神经元及脑组织级联损伤，效果优于丹酚酸 A 单体化合物和尼莫地平。

[0402] 实验例 27：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Ca^{2+}、K^{+}、Mg^{2+} 含量的影响

[0403] 取实验例 20 烘干至恒重的脑组织，称重后转入锥形瓶，用分析纯硝酸和高氯酸于(200±10)℃消化，加去离子水溶解残渣，转入比色管并定容后，用原子分光光度计测脑组织中 Ca^{2+}、K^{+}、Mg^{2+} 含量。数据进行统计分析。

[0404] 表 40. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织

[0405] Ca^{2+}、K^{+}、Mg^{2+} 含量的影响 (x±s)

[0406]

组 别	Ca^{2+} (μg/g)	K^{+} (μg/g)	Mg^{2+} (μg/g)
假手术组	367.82±80.42	1796.52±212.86	457.75±55.74
模型组	643.57±102.75＊	1485.61±144.68＊	381.38±76.55＊
丹酚酸 A 组合物高剂量组	395.35±71.85**	1825.32±189.25**	452.13±35.45**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	428.18±65.15**	1713.22±208.14**	438.17±45.54**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	486.28±45.65*	1645.32±218.17*	417.65±44.28*
丹酚酸 A 单体化合物组	458.35±92.16**	1671.54±209.85**	427.88±47.32**
尼莫地平组	477.31±71.12**	1634.25±217.55**	416.80±40.42**

[0407] 注：与假手术组比较，＊ $P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

[0408] 细胞内 Ca^{2+} 超载是脑缺血过程中介导继发性脑损害的重要机理之一，是缺血、缺氧产生不可逆神经元损伤的最后共同途径。Ca^{2+} 超载可通过激发作为第二信使的激活蛋白酶、激活磷脂酶、激活内切核酸酶等一系列酶反应对细胞产生损害，诱导细胞凋亡，导致急性细胞死亡和迟发性神经元坏死。K^{+}、Mg^{2+} 均为 Ca^{2+} 拮抗剂。K^{+} 作为神经细胞极化状态必不可少的阳离子，可以抑制钙离子的内流进而减轻钙超载；Mg^{2+} 可激活机体内多种酶系，在脑组织内参与细胞多种重要的代谢活动，影响神经传导、离子转运、蛋白合成及能量代谢诸多方面，能缓解血管平滑肌的痉挛，改善微循环，改善脑损伤后缺血缺氧，阻滞颅脑损伤后神经细胞内钙超载。由实验数据可知，脑缺血再灌注模型组与假手术组比较脑组织 Ca^{2+} 含量极显著增高，K^{+}、Mg^{2+} 含量显著降低；与模型组比较，尼莫地平组、丹酚酸 A 单体化合物组和丹酚酸 A 各剂量组能显著降低脑组织中 Ca^{2+} 含量、升高 K^{+}、Mg^{2+} 含量，且以丹酚酸 A 组合物效果最为显著。说明丹酚酸 A 组合物能抑制 Ca^{2+} 内流减轻钙超载，从而可抑制 Ca^{2+} 超载诱导的神经元细胞凋亡。

[0409] 实验例 28：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织神经递质的影响

[0410] 1 实验方法

[0411] 1.1 分组给药及模型制备

[0412] 雄性 SD 大鼠 (250±20)g，随机分为 7 组，每组 30 只：假手术组，脑缺血再灌注模型对照组、丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量 (10mg/kg、5mg/kg、2.5mg/kg) 组，丹酚酸 A 单体化合物组 (10mg/kg)，尼莫地平对照组 (10mg/kg)。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血 2h 后再灌注模型（如实验例 19 所述），假手术组除不插线外，其余操作过程同模型组。各组在缺血前 30min 以及再灌注开始时各经尾静脉注射给药一次，假手术组和脑缺血再灌注模型组

给予同体积的生理盐水。再灌 2h 后，各组取 4 只断头取脑做脑组织病理切片，HE 染色，观察脑组织病理变化。

[0413] 1.2 大鼠脑组织单胺类神经递质含量的测定

[0414] 各组大鼠在缺血 2h 再灌注 2h 后，各取 8 只，快速断头取脑，分离大脑皮层和纹状体，称重，加正丁醇匀浆，离心取上清液，经提后用荧光分光光度计测定 5- 羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 含量。数据进行统计分析，结果见表 41。

[0415] 1.3 大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的测定

[0416] 各组大鼠在缺血 2h 再灌注 2h 后，各取 8 只，快速断头取脑，断头取脑，于冰浴中快速分离缺血侧大脑皮质，称重，置匀浆器内，用磺基水杨酸制成匀浆，离心，取上清液，稀释，经 OPA 衍生化反应后，用高效液相色谱法检测脑组织匀浆上清液中氨基酸类神经递质谷氨酸 (Glu)、天门冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly)、γ - 氨基丁酸 (GABA)、牛磺酸 (Tau) 的含量。流动相为一定比例的磷酸二氧钾缓冲液及甲醇、四氢呋喃溶液，pH 约为 6.6，流速 1ml/min。计算兴奋性毒性指数 (EI) :EI = [Glu][Gly]/[GABA]。数据进行统计分析，结果见表 42。

[0417] 2 实验结果

[0418] 2.1 脑组织病理观察结果

[0419] 假手术组神经细胞结构、形态正常、无间质水肿 ;缺血再灌注组神经元细胞体积缩小、变形、核固缩，神经组织疏松，神经元及血管周围间隙增大，间质脑水肿明显 ;各给药组与模型组相比，脑水肿明显减轻，神经元细胞形态明显改善，神经元周围间隙明显缩小 ;尤以丹酚酸 A 组合物高、中剂量组最为显著，其神经元细胞较完整，形态基本正常。

[0420] 2.2 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中单胺类神经递质的影响

[0421] 与假手术组相比，脑缺血再灌注组大鼠大脑皮层和纹状体 NE、DA、5-HT 含量均显著减少 ($P < 0.01$)。与脑缺血再灌注模型组相比，各给药组大鼠大脑皮层、纹状体 NE、DA、5-HT 含量明显升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

[0422] 表 41. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中单胺类神经递质的影响 ($x \pm s$, ng/mg, $n = 8$)

[0423]

组 别	皮 层			纹 状 体		
	NE	DA	5-HT	NE	DA	5-HT
假手术组	0.58±0.35	1.37±0.67	0.93±0.47	0.71±0.36	1.62±0.71	1.23±0.46
模型组	0.34±0.23 *	0.75±0.43 *	0.57±0.38 *	0.41±0.22 *	1.06±0.65 *	0.66±0.35 *
丹酚酸 A 组合物高剂量组	0.56±0.22**	1.20±0.32**	0.95±0.40**	0.68±0.20**	1.58±0.62**	1.19±0.32**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	0.53±0.25**	1.08±0.27**	0.85±0.37**	0.57±0.35**	1.38±0.45**	0.97±0.32**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	0.49±0.17*	0.90±0.38*	0.72±0.34*	0.49±0.12	1.26±0.34*	0.77±0.28*
丹酚酸 A 单体化合物组	0.50±0.23**	0.97±0.36**	0.78±0.33**	0.54±0.29**	1.30±0.35**	0.81±0.23**
尼莫地平组	0.45±0.21*	0.71±0.63*	0.68±0.45*	0.45±0.30*	1.14±0.53*	0.74±0.31*

[0424] 注：与假手术组比较，* P < 0.01；与模型组比较，*P < 0.05，**P < 0.01

[0425] 2.3 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中氨基酸类神经递质的影响

[0426] 与假手术组相比，脑缺血再灌注模型组大鼠大脑皮质中 Glu、Asp、Gly、GABA、Tau 的含量均有显著增加（P < 0.01 或 P < 0.05）；与模型组相比，各给药组脑组织中 Glu、Asp、Gly 均显著降低（P < 0.01 或 P < 0.05），Tau 含量显著升高（P < 0.01 或 P < 0.05）；除丹酚酸 A 组合物低剂量组以及尼莫地平组的 GABA 含量较模型组略有升高，差异没有统计学意义之外，其他各给药组脑组织中 GABA 含量显著升高（P < 0.01）。脑缺血再灌注模型组 EI 值较假手术组有极显著增高（P < 0.01），而各给药组以及尼莫地平组的 EI 值较模型组明显降低（P < 0.01 或 P < 0.05），且丹酚酸 A 组合物高、中剂量组最为显著。。

[0427] 表 42. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中氨基酸类神经递质的影响（x±s，n = 8）

[0428]

组 别	Glu (umol/g)	Asp (umol/g)	Gly (umol/g)	GABA (umol/g)	Tau (umol/g)	EI
假手术组	5.75±0.42	4.37±0.35	1.91±0.36	6.26±0.51	13.85±1.85	1.65±0.42
模型组	8.86±1.16 *	7.75±0.62 *	2.42±0.46 *	6.77±0.37※	15.97±2.25 *	3.18±0.73 *
丹酚酸 A 组合物高剂量组	5.62±0.64**	4.42±0.32**	2.00±0.28**	9.12±0.12**	19.89±2.13**	1.31±0.42**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	6.18±0.75**	4.60±0.18**	2.09±0.21**	8.21±0.32**	18.75±2.62**	1.70±0.32**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	7.07±0.62*	6.00±0.32*	2.19±0.18*	7.05±0.32	17.85±2.96*	2.14±0.35*
丹酚酸 A 单体化合物组	6.62±0.83**	5.26±0.53**	2.20±0.41**	7.68±0.52**	17.92±2.15**	2.06±0.46**
尼莫地平组	7.33±0.52*	6.51±0.55*	2.23±0.47*	7.05±0.39*	18.24±2.02*	2.57±0.37*

[0429]

[0430] 注：与假手术组比较，* P < 0.01，※P < 0.05；与模型组比较，*P < 0.05，**P < 0.01

[0431] 3 结论

[0432] 单胺类神经递质紊乱和兴奋性氨基酸毒性在缺血性脑损伤、急性脑缺血细胞死亡、再灌注损伤以及迟发性神经元死亡中起重要作用。脑缺血时单胺类神经递质含量在细胞外液中显著升高，而在脑实质中降低。在脑组织缺血等损伤情况下，脑内单胺类神经递质发生代谢紊乱，NE、DA 和 5-HT 含量明显降低，脑缺血越重，脑组织 NE、DA、5-HT 含量就越低。Glu 和 Asp 是脑部重要的兴奋性神经递质，GABA 及 Gly 是脑部的重要抑制性神经递质，Tau 作为一种神经调质，在脑缺血损伤中具有保护作用。脑缺血时脑内氨基酸递质兴奋－抑制失衡是造成脑缺血损伤的重要因素之一。本实验结果表明丹酚酸 A 组合物能明显提高脑缺血再灌注损伤大鼠的大脑皮层和纹状体单胺类递质的含量，升高大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织中 GABA、Tau 含量、显著降低脑组织中 Glu、Asp、Gly 的含量以及氨基酸兴奋毒性指数。且剂量增加，作用增强，且效果较同剂量丹酚酸 A 单体化合物以及尼莫地平明显。结合脑组织病理病理学检查显示的丹酚酸 A 组合物能明显减轻脑水肿，改善神经元细胞形态的结果，表明丹酚酸 A 组合物能抑制单胺类神经递质过度释放，改善单胺类神经递质紊乱；抑制脑缺血再灌注中兴奋性氨基酸的堆积，稳定兴奋性氨基酸－抑制性氨基酸递质的平衡，减

轻兴奋性氨基酸毒性；从而抑制单胺类神经递质紊乱和兴奋性氨基酸毒性诱导的神经元细胞凋亡。

[0433] 实验例 29：丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 LPO、SOD、GSH-Px 的影响

[0434] 各组于实验例 28 项下检测后余下的 10 只大鼠，断头取脑，称重，以 4℃生理盐水制成 10％的脑组织匀浆液，离心，去上清液，测定脂质过氧化物含量（LPO）、超氧化物歧化酶（SOD）及谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的活性。结果进行统计分析。

[0435] 表 43. 丹酚酸 A 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 LPO、SOD、GSH-Px 的影响（x±s，n ＝ 10）

[0436]

组 别	LPO (mmol/mg)	SOD (u/mg)	GSH-Px (u/mg)
假手术组	1.54±0.46	41.67±7.03	19.36±5.24
模型组	2.79±0.78＊	26.26±9.85＊	8.71±6.82＊
丹酚酸 A 组合物高剂量组	1.55±0.35**	42.68±8.54**	18.97±3.25**
丹酚酸 A 组合物中剂量组	1.65±0.42**	37.15±6.85**	17.05±4.65**
丹酚酸 A 组合物低剂量组	1.76±0.54**	33.85±7.45*	16.55±5.52**
丹酚酸 A 单体化合物组	1.70±0.68**	35.25±7.38**	16.96±5.82**
尼莫地平组	1.76±0.52**	33.75±9.82**	16.45±6.35**

[0437] 注：与假手术组比较，＊ P ＜ 0.01；与模型组比较，*P ＜ 0.05，**P ＜ 0.01

[0438] 脑缺血再灌注模型组大鼠脑组织中 LPO 含量较假手术组显著升高，SOD 以及 GSH-Px 活性较假手术组显著降低（P ＜ 0.01）。说明脑缺血和再灌注时脑组织氧自由基急剧增加，损害细胞膜结构和功能的完整性，引发脂质过氧化反应，产生大量脂质过氧化物；而自由基清除酶活性显著减低；因此自由基产生和清除的动态平衡严重破坏。自由基毒性连锁反应会加速神经元细胞凋亡、加重脑缺血损伤。实验结果显示，丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组相比，大鼠脑组织中 LPO 含量显著降低，且低于同剂量的丹酚酸 A 单体化合物组；SOD 以及 GSH-Px 活性显著升高（P ＜ 0.01 或 P ＜ 0.05），且有高于同剂量丹酚酸 A 单体化合物组的趋势，效果较尼莫地平组明显；说明丹酚酸 A 组合物能增加缺血再灌注损伤脑组织中过氧化物清除酶的活性、抑制过氧化物的产生，从而对抗氧自由基对神经元细胞和脑组织的损伤，具抗氧化作用有优于丹酚酸 A 单体化合物的趋势。

[0439] 实验例 30：丹酚酸 A 组合物对 RHRSP 脑血栓缺血后脑血管内皮细胞保护

[0440] 同实验例 12 方法制备 RHRSP 脑血栓模型、分组。各组在模型制备手术后立即按 0.3ml/100g 的给药体积尾静脉注射给药，此后每天尾静脉给药一次，持续至取材。假手术组、模型对照组术后尾静脉注射生理盐水；丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量组术后分别尾静脉注射丹酚酸 A 组合物 40mg/kg、20mg/kg、10mg/kg；丹酚酸 A 单体化合物组注射丹酚酸 A 单体化合物 20mg/kg，尼莫地平组注射尼莫地平 20mg/kg。各组分别于 MCAO 术后 6h、12h、24h、48h、72h 时间点取大鼠经心脏灌注 4％多聚甲醛中性缓冲溶液，取脑。脑组织常规固定、脱

水石蜡包埋，连续切成5um厚冠状切片。TUNEL法（脱氧核糖核甘酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法）检测血管内皮细胞。按TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（武汉博士德生物试剂公司）说明书操作，DAB显色，光学显微镜下观察结果。细胞核出现棕黄色颗粒者为阳性凋亡内皮细胞。每个标本在×400倍镜下随机观察额顶叶和纹状体区及基底节有血管但不重叠的10个视野，计算其TUNEL阳性血管内皮细胞总数，即凋亡细胞数。数据进行统计分析处理。

[0441] 表44. 丹酚酸A组合物对RHRSP脑血栓缺血后脑血管内皮细胞凋亡的影响（x±s）

[0442]

分组	n（只）	6h	12h	24h	48h	72h
假手术组	6	2.11±0.78	2.34±0.53	2.25±0.60	2.19±0.94	2.37±0.51
模型组	6	20.31±1.91 #	29.28±2.83 #	48.56±3.62 #	39.24±2.97 #	27.76±3.08 #
丹酚酸A组合物高剂量组	6	6.95±1.32 *	8.97±1.54 *	8.68±2.45 *	6.56±1.25 *	4.20±1.54 *
丹酚酸A组合物中剂量组	6	9.95±1.52 *	11.85±1.63 *	10.86±1.85 *	9.14±1.32 *	5.17±1.34 *
丹酚酸A组合物低剂量组	6	11.35±1.45 *	13.88±1.75 *	13.05±2.52 *	11.05±2.52 *	7.02±1.11 *
丹酚酸A单体化合物组	6	10.84±1.59 *	12.60±1.76 *	12.96±1.62 *	10.05±1.81 *	5.74±1.23 *
尼莫地平组	6	10.93±1.82 *	12.75±1.66 *	13.21±1.85 *	10.15±2.03 *	6.15±1.35 *

[0443] 注：与假手术组比较，#P＜0.01；与模型组比较，*P＜0.01

[0444] 实验结果显示，模型组各时间段的脑血管内皮细胞凋亡数目显著高于假手术组（P＜0.01），脑组织缺血后6h，内皮细胞凋亡就已明显增多，至缺血后24小时达高峰。与模型组比较，丹酚酸A组合物各剂量组的各时间段的细胞凋亡数显著减少（P＜0.01），且少于同剂量的丹酚酸A单体化合物和尼莫地平组。提示丹酚酸A组合物能抑制脑缺血后脑血管内皮细胞凋亡，提高脑血管内皮细胞存活率，从而保证脑血管内皮细胞功能的正常，维持缺血损伤后脑血管结构和功能的完整而增强对抗脑缺血损伤的能力，发挥治疗缺血性脑血管病作用。

[0445] 实验例31：丹酚酸A组合物对缺氧及缺氧－复氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞（BMVEC）存活率的影响

[0446] 雄性体重约100g的SD大鼠，断头后，酒精消毒后取脑，剥离软脑膜及肉眼可见的大血管，去除大脑白质和小脑，其后，剪碎脑组织，匀浆，依次过90、180目滤网过滤，冲洗并收集滤网上的微血管段，加0.1% II胶原酶，37℃消化15min，1500r/min离心5min，重复3次，沉淀用培养液悬浮后接种于培养瓶中继续培养，隔2d换液1次。待细胞长成融合状态，经形态学鉴定和VIII因子免疫组化鉴定，确定为大鼠脑微血管内皮细胞（BMVEC），纯度大于98%。进行传代培养。取第三代BMVEC，消化后制成单细胞悬液，接种于96孔板中。实验分8组：模型组、丹酚酸A组合物6个剂量组（终浓度分别为10、20、30、40、50、60μmol/L）、丹酚酸A单体化合物组（终浓度30μmol/L）和尼莫地平组（终浓度为30μmol/L）。细胞接种后，第二天，将培养液换成PBS液，放置于缺氧罐中（37℃、95% N_2、5% CO_2）作用4h，致BMVEC缺氧损伤（模拟缺血）；再换成普通培养液正常培养12h，致BMVEC缺氧－复氧损

伤（模拟缺血－再灌）。尼莫地平组、丹酚酸A单体化合物组和丹酚酸A组合物各剂量组均于造模前4h、缺氧和复氧时分别加入相应浓度的药物。分别在缺氧损伤4h、缺氧4h-复氧12h损伤后用MTT法检测各组BMVEC的存活率。

[0447] 表45 丹酚酸A组合物对缺氧及缺氧－复氧损伤的BMVEC存活率的影响（x±s，n＝6）

[0448]

组别	缺氧4h损伤后存活率(%)	缺氧-复氧损伤后存活率(%)
模型对照组	25.45±2.53	13.22±2.13☆
丹酚酸A组合物10μmol/L	27.55±2.57	28.75±2.86*
丹酚酸A组合物20μmol/L	31.03±3.22	46.64±4.53*△
丹酚酸A组合物30μmol/L	33.81±3.52	59.87±4.28*▽
丹酚酸A组合物40μmol/L	37.09±3.82#	68.08±5.54*▽

[0449]

丹酚酸A组合物50μmol/L	36.77±3.83#	66.02±4.92*▽
丹酚酸A组合物60μmol/L	36.60±3.64#	64.65±5.81*▽
丹酚酸A单体化合物30μmol/L	32.83±3.46	56.28±5.34*▽
尼莫地平30μmol/L	32.27±3.08	37.95±3.69*

[0450] 与模型对照组比较，#P＜0.05，*P＜0.01；与复氧前比较，☆P＜0.01；与尼莫地平组比较，△P＜0.05，▽P＜0.01

[0451] 实验结果显示，缺氧4h损伤后，BMVEC存活率仅为25.45%左右，说明缺氧后出现了细胞损伤；尼莫地平组30μmol/L和丹酚酸A单体化合物30μmol/L以及丹酚酸A组合物10、20、30μmol/L处理组的存活率与模型组比较有升高的趋势，但是未显示显著性差异；丹酚酸A组合物40、50、60μmol/L剂量组缺氧损伤4h后BMVEC存活率显著高于模型对照组（P＜0.05）。缺氧－复氧损伤后，BMVEC存活率仅为13.22%左右，与复氧前比较，显著降低（p＜0.01），说明缺氧－复氧加剧了细胞损伤；各药物作用后，BMVEC存活率显著升高（P＜0.01），以丹酚酸A组合物30、40、50、60μmol/L剂量组效果最佳；且丹酚酸A组合物20、30、40、50、60μmol/L剂量组存活率显著高于尼莫地平30μmol/L组（P＜0.05，或P＜0.01），丹酚酸A组合物30μmol/L剂量组比同剂量的丹酚酸A单体化合物组的细胞存活率也要高。提示丹酚酸A组合物能保护脑微血管内皮细胞缺氧及缺氧－复氧损伤，增强其耐缺氧能力，提高缺氧损伤以及缺氧－复氧损伤的脑微血管内皮细胞存活率，且优于尼莫地平和丹酚酸A单体化合物。

[0452] 实验例32 丹酚酸A组合物对缺氧－复氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞（BMVEC）凋亡的影响

[0453] 按实验例31的方法：将第三代BMVEC接种于96孔板中，实验分7组：正常对照组，模型组，丹酚酸A组合物高、中、低剂量组（终浓度40、20、10μmol/L），丹酚酸A单体化合物

组（终浓度 20μmol/L），尼莫地平组（终浓度 40μmol/L）。造模及给药方法同实验例 31。正常对照组不进行缺氧－复氧处理，按正常方法培养相应实验时间。胰酶消化各孔细胞，离心收集细胞，采用磷脂酰结合蛋白－异硫氰酸荧光素／碘化丙啶（Annexin V-FITC/PI）染色，用流式细胞仪测定细胞早期和晚期的凋亡率。

[0454] 表 46 丹酚酸 A 组合物对缺氧－复氧损伤致 BMVEC 凋亡的影响（x±s，n＝6）

[0455]

组别	早期凋亡率（%）	晚期凋亡率(%)	总凋亡率（%）
正常对照组	1.63±0.33	1.05±0.23	2.68±0.52
模型对照组	23.47±4.73#	14.82±3.02#	38.30±4.65#
丹酚酸 A 组合物 40μmol/L	2.95±0.89*△	2.36±1.05*△	5.36±1.85**△
丹酚酸 A 组合物 20μmol/L	3.41±1.16*△	4.62±1.61*	8.03±2.54**▽
丹酚酸 A 组合物 10μmol/L	5.15±1.83*	8.72±2.37*	13.87±3.73*
丹酚酸 A 单体化合物 20μmol/L	3.97±1.13*△	4.85±1.44*	8.83±2.86**▽
尼莫地平 40μmol/L	8.28±3.25*	6.15±2.42*▽	14.43±4.43*

[0456] 与正常对照组比较，#P＜0.01；与模型组比较，*P＜0.01，**P＜0.001；与尼莫地平组比较，△P＜0.01，▽P＜0.05

[0457] 组胞凋亡在缺血性损伤尤其在缺血－再灌损伤中起着重要的作用。血管内皮细胞的凋亡会导致血管完整性的破坏，而血管破坏损伤是脑血管病的基础；脑微血管内皮细胞的凋亡会影响血脑屏障的完整性和血管内皮细胞的分泌功能，进而加重缺血性脑损伤。由实验结果显示，缺氧－复氧损伤，能造成 BMVEC 各期凋亡率显著增加。与模型组比较，各药物组均可显著减低细胞早、晚期及总凋亡率（P＜0.01）；丹酚酸 A 组合物各剂量组之间且呈一定的量效关系。且丹酚酸 A 组合物 10μmol/L 剂量组与尼莫地平 40μmol/L 剂量组效果相当，同剂量的丹酚酸 A 组合物优于丹酚酸 A 单体化合物。提示丹酚酸 A 组合物具有良好的抗缺氧－复氧损伤导致的 BMVEC 凋亡的作用。

[0458] 实验例 33 丹酚酸 A 组合物对缺氧－复氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞（BMVEC）分泌功能影响

[0459] 如实验例 31 所述，将第三代 BMVEC 接种于 96 孔板中，制备 BMVEC 缺氧－复氧模型。分组及给药同实验例 32。收集细胞上清液，ELISA 法检测丹酚酸 A 组合物对 BMVEC 分泌组织纤维酶原激活物（t-PA）、组织纤溶酶原激活物抑制剂（PAI）、一氧化氮（NO）、内皮素（ET）的影响。

[0460] 表 47 丹酚酸 A 组合物对缺氧－复氧损伤（BMVEC）分泌功能影响（x±s，n＝6）

[0461]

组别	t-PA(ng/ml)	PAI(ng/ml)	t-PA/PAI	NO(μmol/ml)	ET(pg/ml)	NO/ET

[0462]

正常对照组	32.24±4.37	2.36±0.28	13.66±3.11	94.83±18.32	46.83±10.36	2.02±0.51
模型对照组	7.45±3.24#	2.48±0.38	3.00±1.03#	26.74±7.28#	54.64±11.27▽	0.49±0.16#
丹酚酸A组合物 40μmol/L	31.64±4.73**	2.56±0.37	12.64±3.15**	91.74±18.04**	47.25±8.75△	1.93±0.62**
丹酚酸A组合物 20μmol/L	29.91±1.38**	2.50±0.44	12.33±3.61**	87.62±17.83**	47.41±9.42△	1.83±0.58**
丹酚酸A组合物 10μmol/L	20.25±2.07*	2.38±0.53	8.52±2.80*	70.35±15.18**	49.03±9.65△	1.43±0.51*
丹酚酸A单体化合物 20μmol/L	28.25±1.63**	2.45±0.42	11.17±3.08**	84.39±17.58**	47.82±9.26△	1.76±0.48**
尼莫地平 40μmol/L	18.43±3.27*	2.39±0.63	7.71±2.75*	67.83±15.20**	48.75±9.63△	1.41±0.55*

[0463] 与正常对照组比较，#P＜0.01，▽P＜0.05；与模型组比较，*P＜0.01，△P＜0.05，**P＜0.001

[0464] 缺氧－复氧损伤后，与正常作组比较，BMVEC分泌t-PA和NO明显降低，ET升高，t-PA/PAI和NO/ET比值也显著下降。各药物组的t-PA和NO分泌量较模型组显著升高（P＜0.01或P＜0.001），其中丹酚酸A组合物中、高剂量组升至接近正常对照组水平；各给药组t-PA/PAI和NO/ET比值比值也较模型组显著提高。提示丹酚酸A组合物能改善缺氧－复氧损伤后脑微血管内皮细胞的分泌功能，作用效果显著优于尼莫地平，且有优于同剂量丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0465] 实验例34 丹酚酸A组合物对缺氧－复氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞（BMVEC）内Ca2+浓度的影响

[0466] 如实验例31所述，将第三代BMVEC接种于96孔板中，制备BMVEC缺氧－复氧模型。分组及给药同实验例32。胰酶消化各孔细胞，离心收集细胞后，加入Fluo-3（一种钙荧光探针，终浓度为5μmol/L），37℃孵育45min，PBS液冲洗3次，用流式细胞仪测定荧光强度。因Fluo-3以游离配体形式存在时几乎没有荧光性，而与Ca^{2+}结合后荧光增强，可根据荧光强度变化检测细胞内游离Ca^{2+}浓度变化。

[0467] 表48 丹酚酸A组合物对缺氧－复氧损伤BMVEC内Ca^{2+}浓度的影响（x±s，n＝6）

[0468]

组别	平均荧光强度
正常对照组	247.68±34..52
模型对照组	458.72±42.37#
丹酚酸 A 组合物 40μmol/L	231.52±30.71*▽
丹酚酸 A 组合物 20μmol/L	262.05±31.36*▽
丹酚酸 A 组合物 10μmol/L	302.59±34.52*
丹酚酸 A 单体化合物 20μmol/L	270.64±28.83*▽
尼莫地平 40μmol/L	321.06±33.37*

[0469] 与正常对照组比较，#P ＜ 0.01；与模型组比较，*P ＜ 0.01；与尼莫地平组比较，▽ P ＜ 0.05

[0470] 实验结果显示，缺氧－复氧损伤后，BMVEC 胞内 Ca^{2+} 浓度显著增高（P ＜ 0.01）。与模型组比较，各药物组 Ca^{2+} 浓度极显著降低，以丹酚酸 A 组合物中、高剂量组效果最为显著，且细胞内钙离子浓度显著低于尼莫地平 40μmol/L 剂量组（P ＜ 0.05），且优于同剂量的丹酚酸 A 单体化合物。提示丹酚酸 A 组合物具有较好的抑制缺氧－复氧损伤致 BMVEC 胞内 Ca^{2+} 浓度的作用。

[0471] 实验例 35：丹酚酸 A 组合物对大鼠动脉血栓形成时间的影响

[0472] 取 SD 大鼠，雌雄各半，体重为 250 ～ 300g，随机分为对照组、丹酚酸 A 单体化合物组（2.5mg/kg）、阿司匹林组（20mg/kg）及丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量（12.5、2.5、0.5mg/kg）组。各组每天尾静脉给药 1 次（对照组给予等容积生理盐水），连续 7d 后，末次给药后 30min，戊巴比妥钠（40mg/kg）麻醉大鼠，仰卧位固定于鼠板上，颈部正中切口，分离右侧颈总动脉约 15mm，将体内血．栓形成测定仪的刺激电极和温度传感器探头置于颈总动脉上，刺激电极位于近心端，用 2mA 电流刺激血管 7min，使血管内膜损伤，记录因动脉管腔内血栓形成阻断血流的时间，即血栓形成时间（OT）。实验数据统计结果见表 49。

[0473] 表 49. 丹酚酸 A 组合物对大鼠动脉血栓形成时间的影响

[0474]

分组	剂量	n（只）	OT (min)（x±s）
生理盐水组	——	10	15.7±1.0
丹酚酸 A 组合物高剂量组	12.5 mg/kg	10	34.6±1.5 *
丹酚酸 A 组合物中剂量组	2.5 mg/kg	10	31.6±1.5 *
丹酚酸 A 组合物低剂量组	0.5 mg/kg	10	27.±1.9 *
丹酚酸 A 单体化合物组	2.5 mg/kg	10	29.2±2.1 *
阿司匹林组	20 mg/kg	10	27.1±1.7 *

[0475]

[0476] 注：与生理盐水组比较，*P ＜ 0.01

[0477] 实验结果显示，与生理盐水对照组比较，丹酚酸A组合物12.5、2.5、0.5mg/kg剂量组的血栓形成时间显著延长（P ＜ 0.01）；低剂量组血栓形成时间与20mg/kg阿司匹林组相当（P ＞ 0.05）；中剂量组比同剂量的丹酚酸A单体化合物组血栓形成时间延长；高、中、低剂量组之间血栓形成时间有统计学差异（P ＜ 0.05）。表明丹酚酸A组合物能延长血栓形成时间，预防动脉血栓的形成，预防血栓而致的缺血性脑血管病。

[0478] 实验例36：丹酚酸A组合物对血栓形成的抑制作用

[0479] SD大鼠，雌雄各半，分组、给药同实验例35。于末次给药后30min戊巴比妥钠麻醉，仰卧位固定，手术分离出右颈总动脉及左颈外静脉，用三段聚乙烯管连接。在聚乙烯管中段放入一根长5cm已称重手术丝线。以肝素生理盐水溶液（5u/mL）充满聚乙烯管。管的一端插入左颈外静脉，另一端与右颈总动脉相连。打开动脉夹，血液由右颈动脉流经聚乙烯管返回左颈静脉。开放血流15min后中断血流，迅速取出丝线，滤纸吸去浮在表面的血液，称重，总重减线重即得血栓湿重；然后置60℃烘箱内恒温干燥至恒重，冷却后称重，即为血栓干重。实验数据见表50。

[0480] 表50. 丹酚酸A组合物对大鼠血栓形成的抑制作用

	分组	剂量	n（只）	血栓湿重(mg)(x±s)	血栓干重mg（x±s）
[0481]	生理盐水组	——	8	43.91±7.38	10.12±2.23
	丹酚酸A组合物高剂量组	12.5 mg/kg	8	10.11±2.04 *	2.12±0.32 *
	丹酚酸A组合物中剂量组	2.5 mg/kg	8	13.87±3.21 *	3.28±0.41 *
	丹酚酸A组合物低剂量组	0.5 mg/kg	8	26.23±4.24 *	5.89±1.35 *
[0482]	丹酚酸A单体化合物组	2.5 mg/kg	8	16.37±3.62 *	3.81±1.07 *
	阿司匹林组	20 mg/kg	8	25.85±6.46 *	5.86±1.21 *

[0483] 注：与生理盐水组比较，*P ＜ 0.01

[0484] 实验数据显示，与生理盐水组比较，丹酚酸A组合物12.5、2.5、0.5mg/kg剂量组大鼠血栓湿、干重均显著减轻（P ＜ 0.01），各剂量组之间存在较好的量效关系。且低剂量组与20mg/kg阿司匹林组效果相当（P ＞ 0.05）。提示丹酚酸A组合物具有很好的抑制血栓形成的作用，能用于预防或治疗血栓所致的缺血性脑血管病，且比丹酚酸A单体化合物效果明显。

[0485] 实验例37：丹酚酸A组合物对大鼠静脉栓塞的影响

[0486] 雄性SD大鼠，体重（200±20）g，分组同实验例35，戊巴比妥钠（40mg/kg）麻醉大鼠，沿腹部正中切开大鼠腹壁，打开腹腔，分离下腔静脉，并于左肾静脉下端水平处结扎下腔静脉，关闭腹腔，关闭好腹腔，1h后，尾静脉注射给药；再过3h重新打开腹腔，于结扎下方2cm处夹闭血管，同时结扎静脉侧枝，纵行剖开血管，吸尽管腔内血液，取出血栓，滤纸吸掉残血，立即称取血栓湿重；之后置60℃烘箱内恒温干燥后，称血栓干重。试验数据见表51。

[0487] 表51. 丹酚酸A组合物对大鼠静脉栓塞的影响

[0488]

分组	剂量	n（只）	血栓湿重(mg)(x±s)	血栓干重 mg（x±s）
生理盐水组	——	8	31.48±3.96	9.95±1.83
丹酚酸 A 组合物高剂量组	12.5 mg/kg	8	7.15±1.55 *	2.35±1.12 *
丹酚酸 A 组合物中剂量组	2.5 mg/kg	8	10.68±2.45 *	3.42±1.52 *
丹酚酸 A 组合物低剂量组	0.5 mg/kg	8	15.08±2.86 *	5.23±1.45 *
丹酚酸 A 单体化合物组	2.5 mg/kg	8	12.44±2.51 *	3.94±1.23 *
阿司匹林组	20 mg/kg	8	15.57±3.81 *	5.53±1.34 *

[0489] 注：与生理盐水组比较，*P ＜ 0.01

[0490] 实验数据显示，与生理盐水组比较，丹酚酸 A 组合物 12.5、2.5、0.5mg/kg 剂量组大鼠静脉血栓湿、干重显著减轻（P ＜ 0.01），低剂量组与 20mg/kg 阿司匹林组效果相当（P ＞ 0.05）；中剂量组较同剂量的丹酚酸 A 单体化合物效果明显。表明丹酚酸 A 组合物有抑制静脉血栓形成的作用，可用于预防急性缺血性脑血管病发生后的静脉血栓栓塞。

[0491] 实验例 38：丹酚酸 A 组合物对大鼠体外血栓形成的抑制作用

[0492] SD 大鼠，250 ～ 300g，雌雄各半；随机分生理盐水组、丹酚酸 A 单体化合物组（2.5mg/kg）、阿司匹林组（20mg/kg）及丹酚酸 A 组合物高、中、低剂量（12.5、2.5、0.5mg/kg）组，各组每天尾静脉注射给与相应药物 1 次，连续 7 天；末次给药后 30min，戊巴比妥钠麻醉，沿腹中线打开腹腔，腹主动脉取血约 1.5ml 注入硅化胶管中，迅速将硅胶管两端对接成环状，硅胶套管密封固定，置体外血栓形成仪上 37℃恒温旋转 15min，取出血栓，测量血栓长度、称其湿重；60℃恒温箱中烘干后测其干重。实验数据见表 52。

[0493] 表 52. 丹酚酸 A 组合物对大鼠体外血栓形成的抑制作用（x±s）

[0494]

分组	剂量	n（只）	血栓长度(cm)	血栓湿重(mg)	血栓干重(mg)
生理盐水组	——	8	13.18±1.82	258.58±37.66	69.37±9.65
丹酚酸 A 组合物高剂量组	12.5 mg/kg	8	3.30±1.25 *	40.14±5.81 *	15.10±3.48 *
丹酚酸 A 组合物中剂量组	2.5 mg/kg	8	4.85±1.42 *	73.25±8.24 *	26.36±4.75 *
丹酚酸 A 组合物低剂量组	0.5 mg/kg	8	6.58±2.36 *	101.24±10.25 *	35.47±4.63 *
丹酚酸 A 单体化合物组	2.5 mg/kg	8	5.18±1.82 *	78.33±9.52 *	27.82±4.73 *
阿司匹林组	20 mg/kg	8	6.46±1.97 *	95.21±15.22 *	34.93±8.49 *

[0495] 注：与生理盐水组比较，*P ＜ 0.01

[0496] 实验数据显示，与生理盐水组比较，丹酚酸 A 组合物 12.5、2.5、0.5mg/kg 剂量组大

鼠体外血栓形成的长度显著缩短（P＜0.01），血栓湿、干重显著减轻（P＜0.01），低剂量组与20mg/kg阿司匹林组效果相当（P＞0.05）；表明丹酚酸A组合物对体外血栓形成具有较好的抑制作用，且有优于同剂量丹酚酸A单体化合物的趋势。

[0497] 实验例39：丹酚酸A组合物对体内已形成的血栓的溶栓试验研究

[0498] SD雄性大鼠（250±20）g，戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠，分离左颈总动脉以2mA的直流电连续刺激大鼠动脉7分钟，用血流仪连续探测颈动脉血流量。以刺激结束后血流量降为刺激前的50％视为血栓形成。动物随机分6组，生理盐水组、尿激酶（2000U/kg）组、丹酚酸A单体化合物（5mg/kg）组及丹酚酸A组合物高、中、低剂量（10、5、2.5mg/kg）组；各组在形成血栓后20min，均经股静脉一次性注射相应药物，观察给药后1h内血管再通情况；该段时间内若血管再通，则继续观察血管开放状态1h。每只动物的颈动脉血流量以刺激前血流量为基线，以≥50％或≤25％刺激前血流量者判定为持续再通或继后的再栓塞；再通后1h内，各组动物血流量划分为≥50％，25％～50％和≤25％基线水平。根据血流量，颈动脉血管开放程度分三种状态，分别为①持续栓塞无再通；②再通与栓塞交错出现；③再通后持续开放，无再栓塞。实验结果见表53。

[0499] 表53. 丹酚酸A组合物体内的溶栓作用（n＝10）

[0500]

分组	给药后1h内血管开放状态分布			再通率	再栓率
	持续栓塞	栓塞与再通交错	持续再通		
生理盐水组	10	0	0	0	——
丹酚酸A组合物高剂量组	2 *	3	5	80% * #	2/8 #
丹酚酸A组合物中剂量组	3 *	3	4	70% *	3/7
丹酚酸A组合物低剂量组	4 *	3	3	60% *	3/6
丹酚酸A单体化合物组	3 *	4	3	70% *	4/7
尿激酶组	3 *	4	3	70% *	4/7

[0501] 注：①再通率＝给药后1h出现再通的动物数／动物总数

[0502] ②再栓率＝再通后1h出现的再栓塞动物数／给药后1h内出现再通的动物数

[0503] ③与生理盐水组比较，*P＜0.01；与尿激酶组比较，#P＜0.05

[0504] 结果表明：生理盐水组均持续栓塞，且无出现再通现象；各药物组持续栓塞的动物数少，与生理盐水组相比均有极显著差异（P＜0.01）；丹酚酸A组合物中剂量（5mg/kg）组，其血管开放程度5mg/kg丹酚酸A单体化合物组及与2000U/kg尿激酶组相似，其再通率相当，但其血管开放状态较丹酚酸A单体化合物和尿激酶组有更稳定的趋势；丹酚酸A组合物高剂量（10mg/kg）组持续再通率以及再通率均高于尿激酶组，且再栓率明显低于尿激酶组（P＜0.05）；丹酚酸A组合物低剂量（2.5mg/kg）组再通率虽低于尿激酶组，但其再栓率与尿激酶组相当，且有低于尿激的再栓率的趋势。上述结果提示丹酚酸A组合物有较好的溶栓以及防止溶栓后再栓塞的作用，且作用较稳定。

[0505] 实验例40：丹酚酸A组合物对脑血栓大鼠血液流变学的影响

[0506] 采用颈动脉注入自身血栓子的方法制备脑血栓模型：SD 大鼠戊巴比妥钠腹腔麻醉后，颈正中切口，分离右侧劲总动脉（CCA）、颈内动脉（ICA）、颈外动脉（ECA），结扎 ECA 远端及翼腭动脉，微动脉夹夹闭 CCA 及 ICA，在 ECA 近端剪一小口，松开 CCA 微动脉夹，抽取动脉血 0.5ml，柠檬酸钠抗凝，离心，取贫血小板血浆加入少量红细胞及凝血酶原和氯化钙混合，制备直径约为 0.35mm 的血栓，剪碎，一小节约 2mm；夹闭 CCA，由 ECA 将栓子注入 ICA，结扎 ECA，松开 CCA 及翼腭动脉处血管夹，缝合切口。实验分 7 组：假手术组，模型对照组，丹酚酸 A 组合物高、中、低（10、5、2.5mg/kg）组，丹酚酸 A 单体化合物组（5mg/kg），尼莫地平组（10mg/kg）。手术成功后 30min，各组动物尾静脉相应药物，此后每天注射一次，连续 7 天；假手术组及模型组注射等体积的生理盐水。给药结束的第二天（禁食 12h），腹腔麻醉，腹主动脉取血，肝素抗凝，进行血液流变学测定。

[0507] 表 54 丹酚酸 A 组合物对脑血栓大鼠血液流变学的影响

[0508]

组 别	红细胞压积(%)	全血粘度			血浆粘度
		高切变率 $200S^{-1}$	中切变率 $30S^{-1}$	低切变率 $3S^{-1}$	（mPa·s）
假手术组	52.3±1.9	6.21±0.25	7.32±0.36	13.57±0.47	1.58±0.13
模型对照组	63.1±2.2#	10.86±1.35#	13.93±1.40#	20.31±1.46#	2.65±0.24#
丹酚酸 A 组合物高剂量组	52.8±1.7*	6.34±0.41*	7.47±0.55*	13.97±0.42*	1.54±0.06*
丹酚酸 A 组合物中剂量组	53.6±1.4*	6.68±0.43*	7.82±0.49*	14.31±0.50*	1.65±0.14*
丹酚酸 A 组合物低剂量组	55.2±2.0▽	7.03±0.51*	8.83±0.52*	16.15±0.57*	1.93±0.11▽
丹酚酸 A 单体化合物组	54.3±2.1*	6.95±0.41*	8.16±0.48*	14.83±0.57*	1.79±0.14*
尼莫地平组	55.6±1.8▽	7.26±0.53*	8.51±0.43*	16.21±0.72*	1.97±0.09▽

[0509]

[0510] 与假手术组比较，#p ＜ 0.01；与模型对照组比较 *P ＜ 0.01，▽P ＜ 0.05。

[0511] 实验结果显示，脑血栓后，大鼠全血粘度、血浆粘度显著增高，红细胞压积也显著升高（P ＜ 0.01）；丹酚酸 A 组合物各剂量组与模型组比较，较尼莫地平组效果更显著，且有优于同剂量丹酚酸 A 单体化合物的趋势，其全血粘度和血浆粘度以及红细胞压积均明显降低；提示丹酚酸 A 组合物能加快微血流流速，降低血液粘度，改善血液流变学而有效对抗脑血栓的作用较为显著。

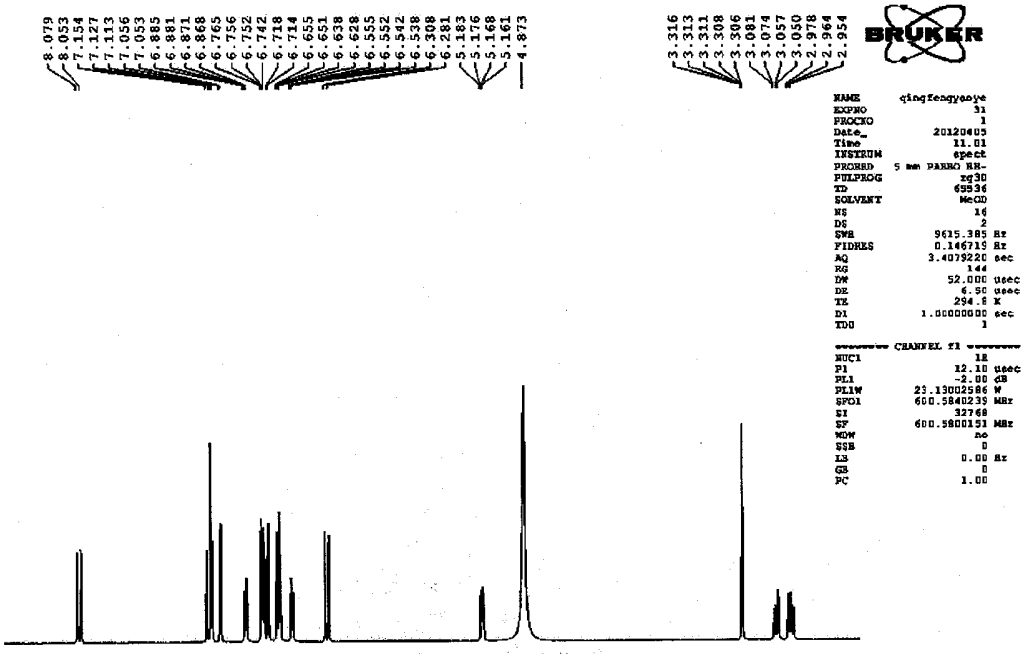

8.079
8.053
7.154
7.127
7.113
7.056
7.053
6.885
6.881
6.871
6.868
6.765
6.756
6.752
6.742
6.718
6.714
6.655
6.651
6.638
6.628
6.555
6.552
6.542
6.538
6.308
6.281
5.183
5.176
5.168
5.161
4.873
3.316
3.313
3.311
3.308
3.306
3.081
3.074
3.057
3.050
2.978
2.964
2.954
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 31
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 11.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 9615.385 Hz
FIDRES 0.146719 Hz
AQ 3.4079220 sec
RG 144
DW 52.000 usec
DE 6.50 usec
TE 294.8 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 12.10 usec
PL1 -2.00 dB
PL1W 23.13002586 W
SFO1 600.5840239 MHz
SI 32768
SF 600.5800151 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

图 1

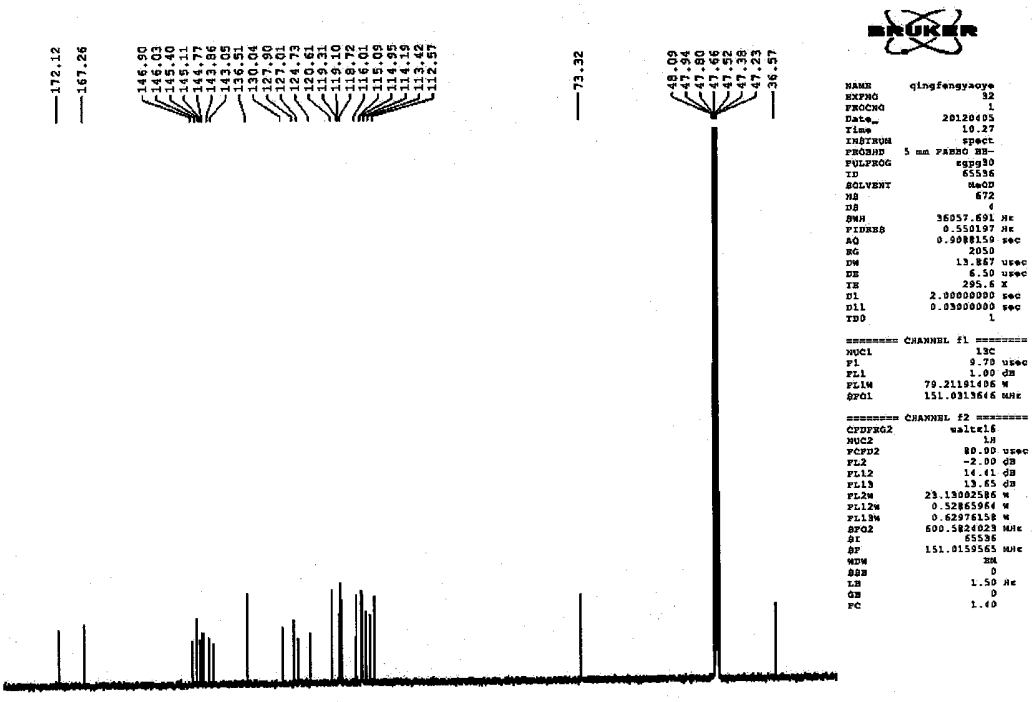

172.12
167.26
146.90
146.03
145.40
145.11
144.77
143.86
143.05
136.51
130.04
127.90
127.01
124.73
120.61
119.31
119.10
118.72
116.01
115.09
114.95
114.19
113.42
112.57
73.32
48.09
47.94
47.80
47.66
47.52
47.38
47.23
36.57
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 32
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 10.27
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 672
DS 4
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 0.550197 Hz
AQ 0.9088159 sec
RG 2050
DW 13.867 usec
DE 6.50 usec
TE 295.6 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.70 usec
PL1 1.00 dB
PL1W 79.21191406 W
SFO1 151.0313646 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 14.41 dB
PL13 13.65 dB
PL2W 23.13002586 W
PL12W 0.52865964 W
PL13W 0.62976158 W
SFO2 600.5824023 MHz
SI 65536
SF 151.0159565 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.40

图 2

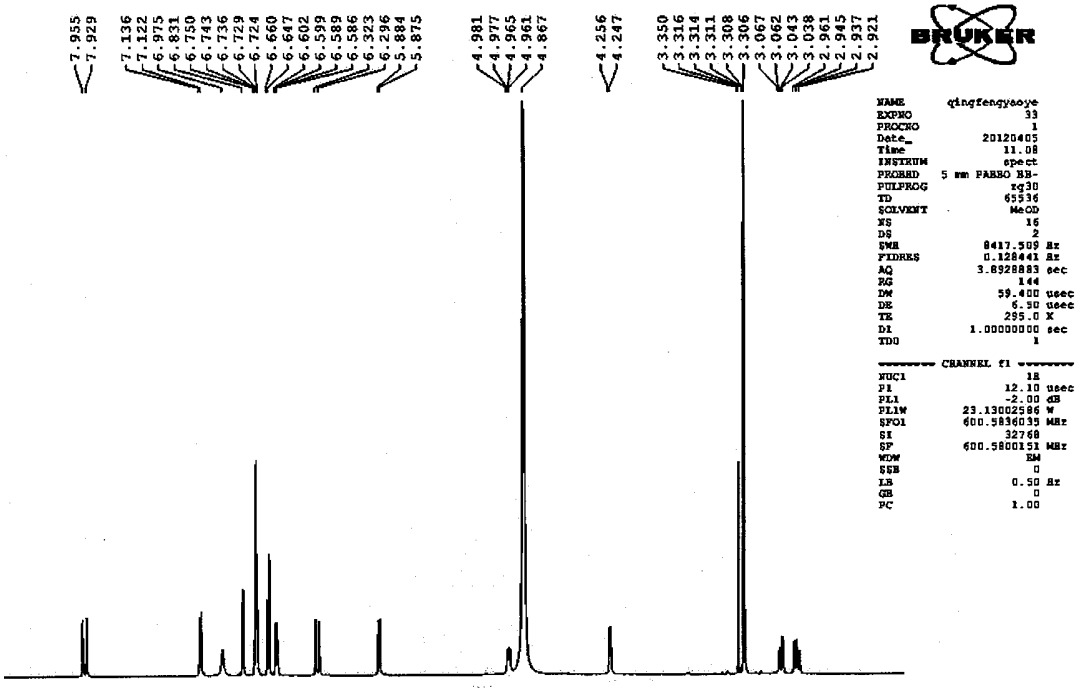

7.955
7.929
7.136
7.122
6.975
6.831
6.750
6.743
6.736
6.729
6.724
6.660
6.647
6.602
6.599
6.589
6.586
6.323
6.296
5.884
5.875
4.981
4.977
4.965
4.961
4.867
4.256
4.247
3.350
3.316
3.314
3.311
3.308
3.306
3.067
3.062
3.043
3.038
2.961
2.945
2.937
2.921
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 33
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 11.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 8417.509 Hz
FIDRES 0.128441 Hz
AQ 3.8928883 sec
RG 144
DW 59.400 usec
DE 6.50 usec
TE 295.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 12.10 usec
PL1 -2.00 dB
PL1W 23.13002586 W
SFO1 600.5836035 MHz
SI 32768
SF 600.5800151 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.50 Hz
GB 0
PC 1.00

图 3

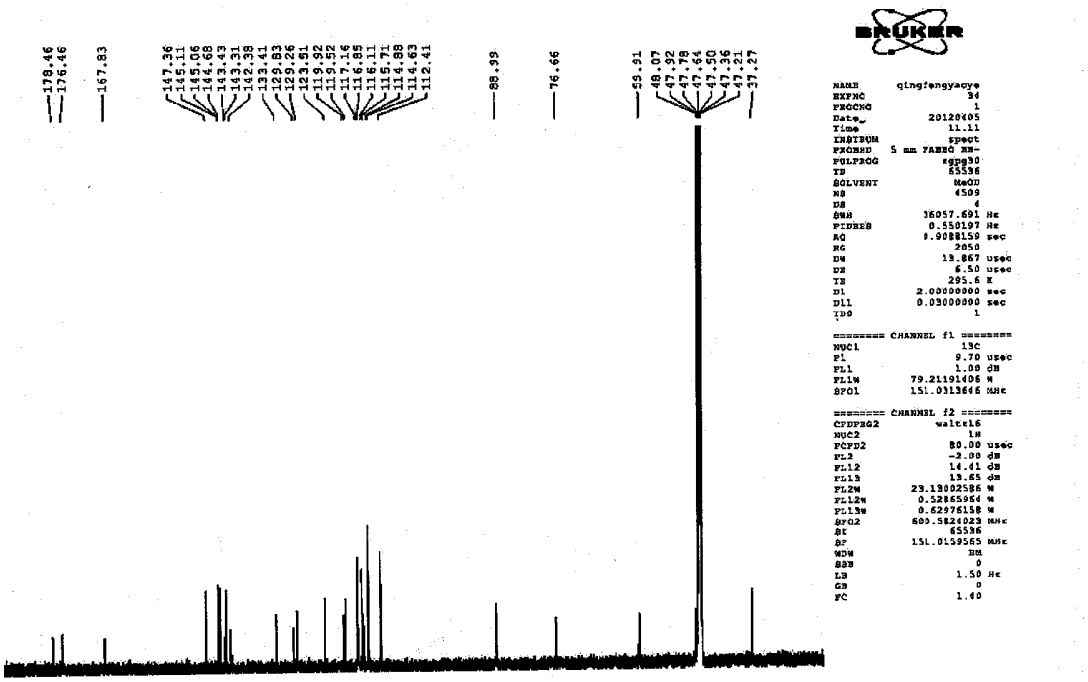

178.46
176.46
167.83
147.36
145.11
145.06
144.68
143.43
143.31
142.38
133.41
129.83
129.26
123.61
119.92
117.14
116.85
116.11
115.71
114.88
114.63
112.41
88.39
76.66
59.91
48.07
47.92
47.78
47.64
47.50
47.36
47.21
37.27
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 34
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 11.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 4509
DS 4
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 0.550197 Hz
AQ 0.9088159 sec
RG 2050
DW 13.867 usec
DE 6.50 usec
TE 295.6 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.70 usec
PL1 1.00 dB
PL1W 79.21191406 W
SFO1 151.0313646 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 14.41 dB
PL13 13.65 dB
PL2W 23.13002586 W
PL12W 0.52865964 W
PL13W 0.62976158 W
SFO2 600.5826029 MHz
SI 65536
SF 151.0159565 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.40

图 4

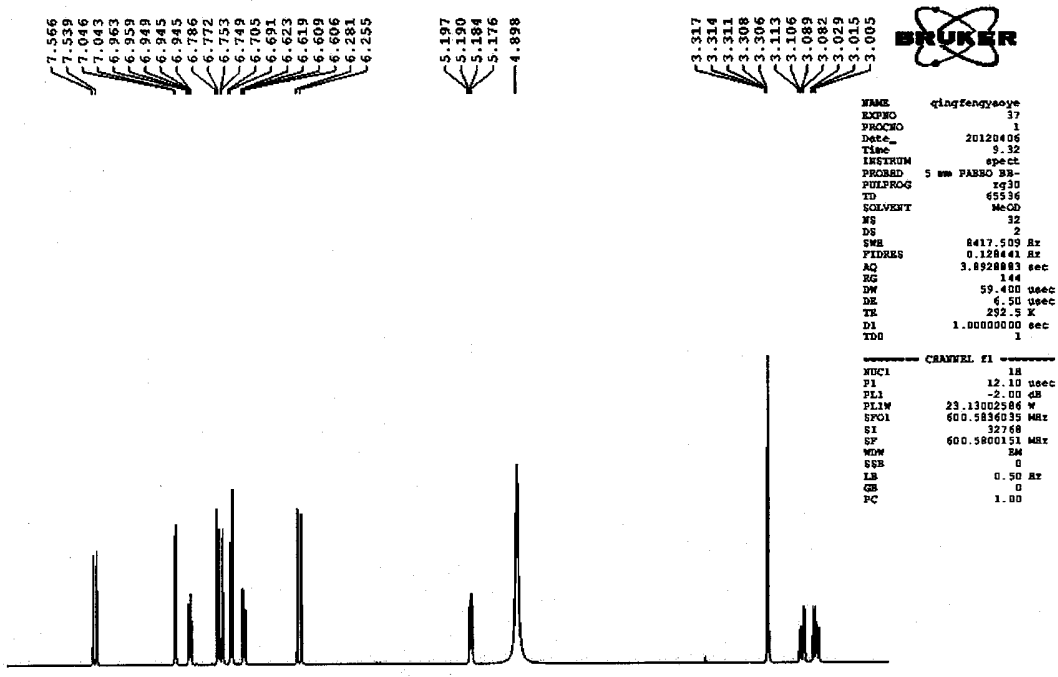

7.566
7.539
7.046
7.043
6.963
6.959
6.949
6.945
6.945
6.786
6.772
6.753
6.749
6.705
6.691
6.623
6.619
6.609
6.606
6.281
6.255
5.197
5.190
5.184
5.176
4.898
3.317
3.314
3.311
3.308
3.306
3.113
3.106
3.089
3.082
3.029
3.015
3.005
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 37
PROCNO 1
Date_ 20120406
Time 9.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 2
SWH 8417.509 Hz
FIDRES 0.128441 Hz
AQ 3.8928883 sec
RG 144
DW 59.400 usec
DE 6.50 usec
TE 292.5 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 12.10 usec
PL1 -2.00 dB
PLW1 23.13002586 W
SFO1 600.5836035 MHz
SI 32768
SF 600.5800151 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.50 Hz
GB 0
PC 1.00

图 5

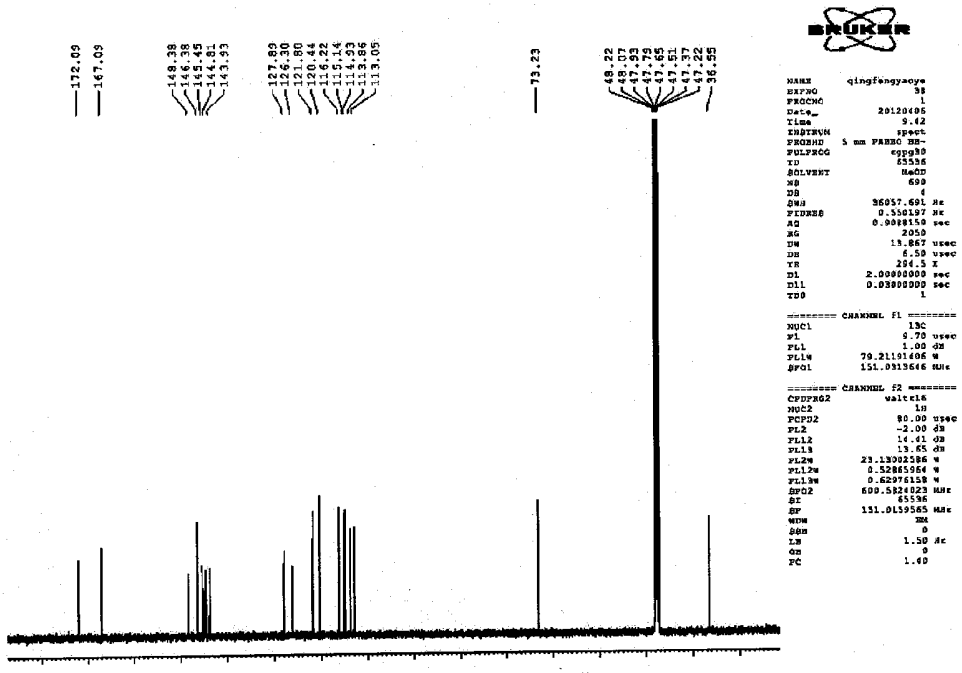

172.09
167.09
148.38
146.38
145.45
144.81
143.93
127.89
126.30
121.80
120.44
116.22
115.14
114.93
113.86
113.05
73.23
48.22
47.93
47.79
47.65
47.51
47.37
47.22
36.55
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 98
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 9.42
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG cpgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 690
DS 4
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 0.550197 Hz
AQ 0.9088150 sec
RG 2050
DW 13.867 usec
DE 6.50 usec
TE 294.5 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.70 usec
PL1 1.00 dB
PLW1 79.21191406 W
SFO1 151.0313646 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 14.41 dB
PL13 13.65 dB
PLW2 23.13002586 W
PLW12 0.52865966 W
PLW13 0.62976158 W
SFO2 600.5824023 MHz
SI 65536
SF 151.0159565 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.40

图 6

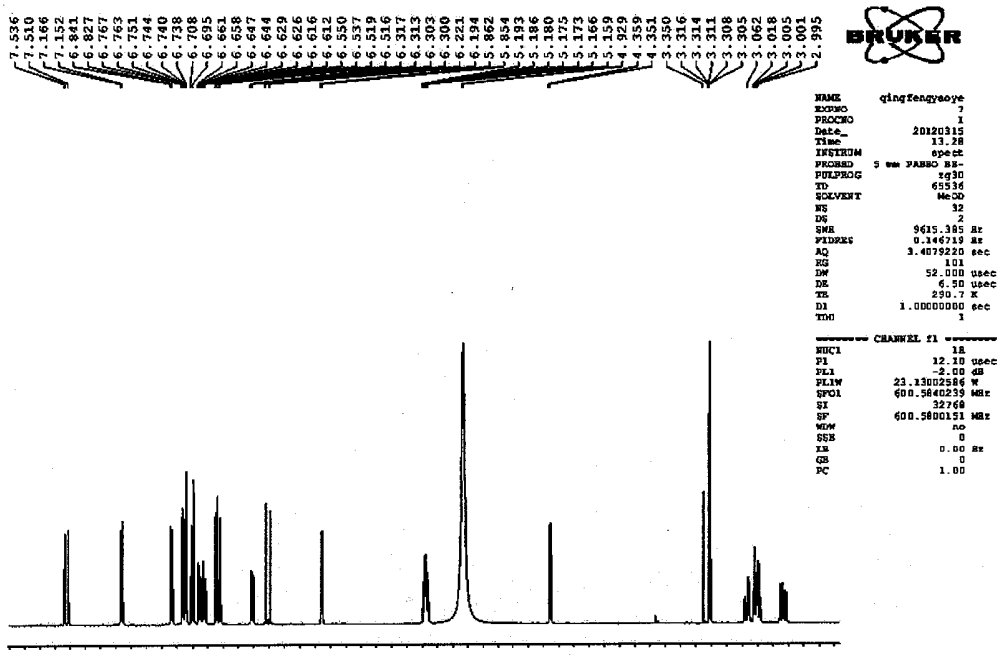

7.536 7.510 7.166 7.152 6.841 6.827 6.767 6.763 6.751 6.744 6.740 6.738 6.708 6.695 6.661 6.658 6.647 6.644 6.629 6.626 6.616 6.612 6.550 6.537 6.519 6.516 6.317 6.313 6.303 6.300 6.221 6.194 5.862 5.854 5.193 5.186 5.180 5.175 5.173 5.166 5.159 4.929 4.359 4.351 3.350 3.316 3.314 3.311 3.308 3.305 3.062 3.018 3.005 3.001 2.995
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 7
PROCNO 1
Date_ 20120315
Time 13.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 2
SWH 9615.385 Hz
FIDRES 0.146719 Hz
AQ 3.4079220 sec
RG 101
DW 52.000 usec
DE 6.50 usec
TE 290.7 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 12.10 usec
PL1 -2.00 dB
PL1W 23.13002586 W
SFO1 600.5840239 MHz
SI 32768
SF 600.5800151 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

图 7

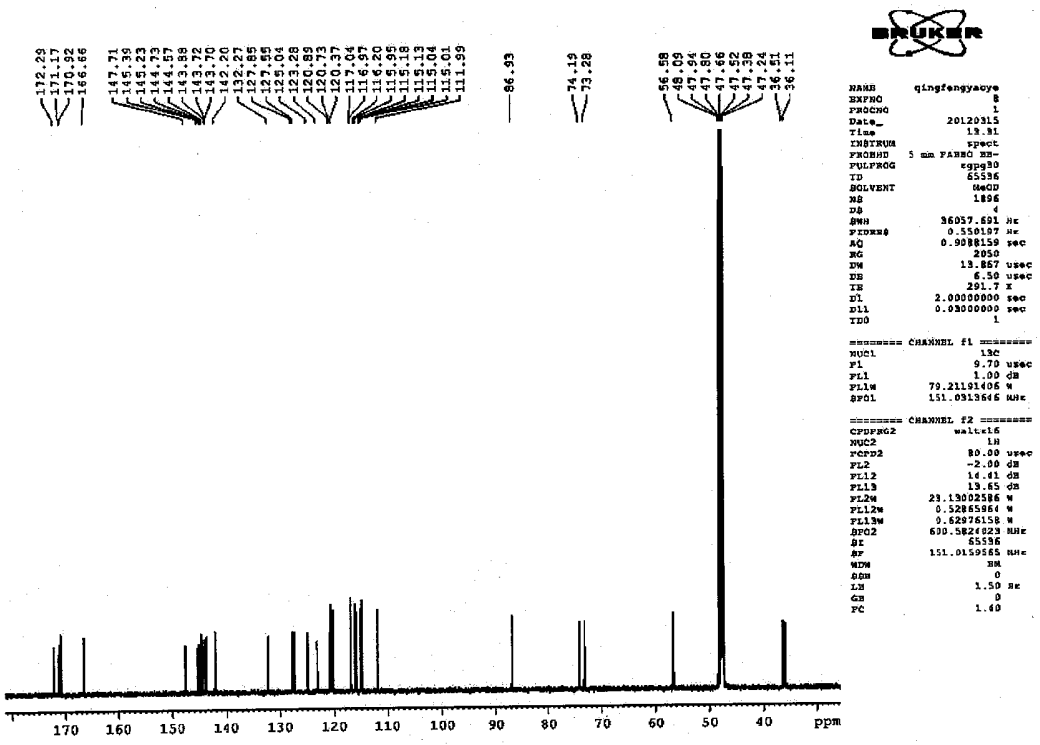

172.29 171.17 170.92 166.66 147.71 145.39 145.23 144.73 144.57 143.88 143.72 143.70 142.20 132.27 127.85 127.55 125.04 123.28 120.89 120.73 120.37 117.04 116.97 116.20 115.95 115.18 115.13 115.04 115.01 111.99 86.93 74.19 73.28 56.58 48.09 47.94 47.80 47.66 47.52 47.38 47.24 36.51 36.11
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 ppm
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 8
PROCNO 1
Date_ 20120315
Time 13.31
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 1896
DS 4
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 0.550197 Hz
AQ 0.9088159 sec
RG 2050
DW 13.867 usec
DE 6.50 usec
TE 291.7 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.70 usec
PL1 1.00 dB
PL1W 79.21191406 W
SFO1 151.0313646 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 14.41 dB
PL13 13.65 dB
PL2W 23.13002586 W
PL12W 0.52865964 W
PL13W 0.62976158 W
SFO2 600.5824029 MHz
SI 65536
SF 151.0159565 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.40

图 8

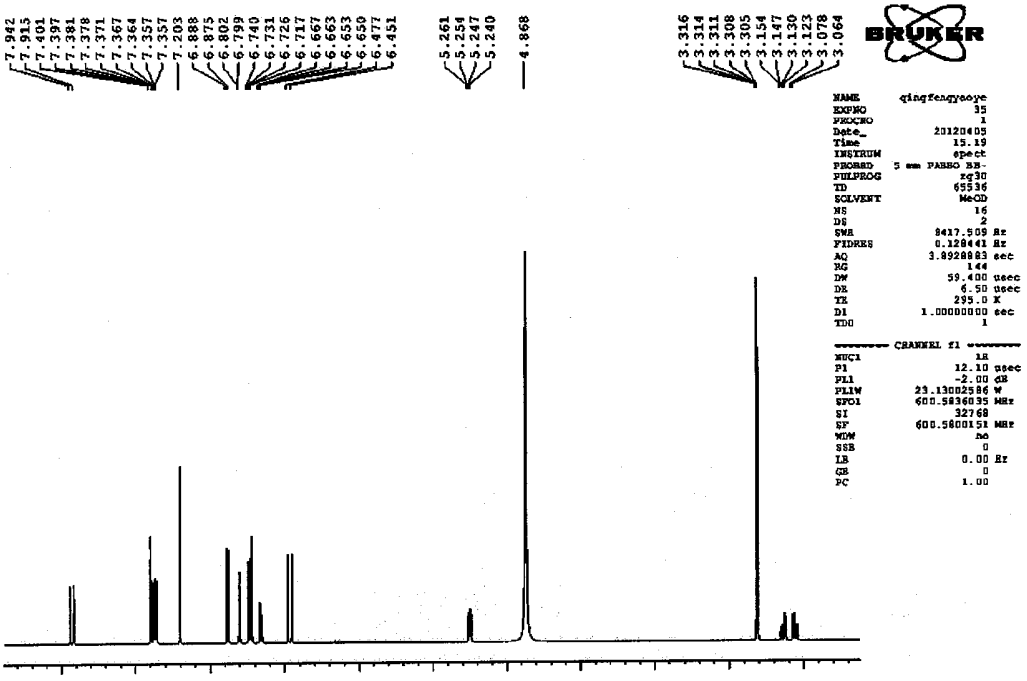

7.942
7.915
7.401
7.397
7.381
7.378
7.371
7.367
7.364
7.357
7.357
7.203
6.888
6.875
6.802
6.799
6.740
6.731
6.726
6.717
6.667
6.663
6.653
6.650
6.477
6.451
5.261
5.254
5.247
5.240
4.868
3.316
3.314
3.311
3.308
3.305
3.154
3.147
3.130
3.123
3.078
3.064
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 35
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 15.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 8417.509 Hz
FIDRES 0.128441 Hz
AQ 3.8928883 sec
RG 144
DW 59.400 usec
DE 6.50 usec
TE 295.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 12.10 usec
PL1 -2.00 dB
PL1W 23.13002586 W
SFO1 600.5836035 MHz
SI 32768
SF 600.5800151 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

图 9

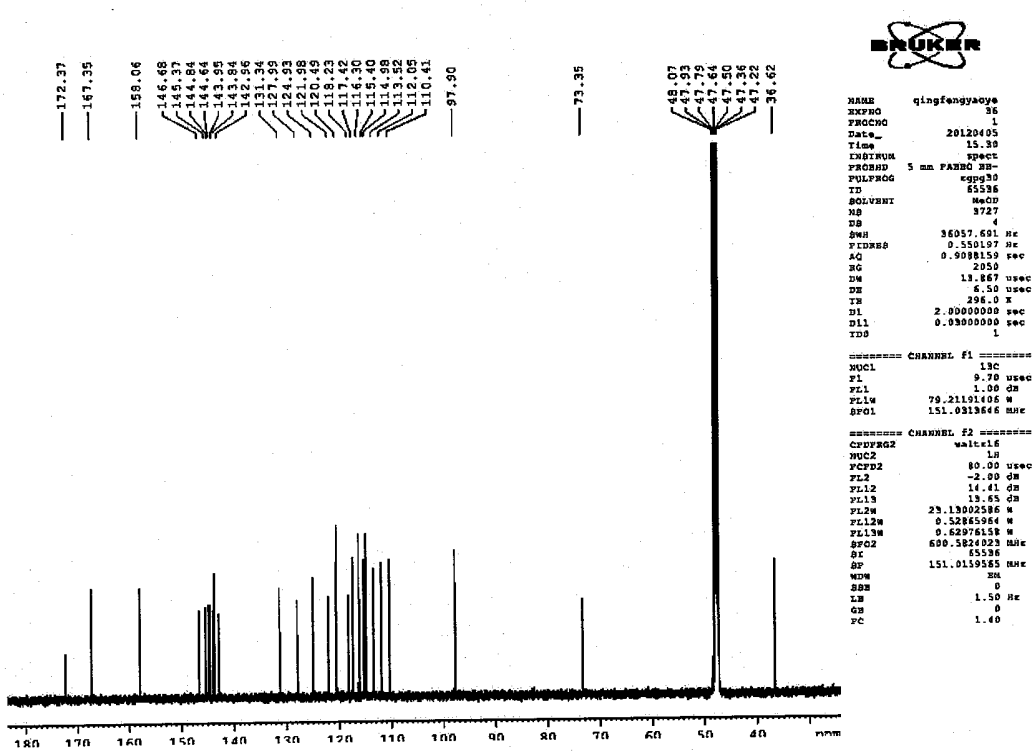

172.37
167.35
158.06
146.68
145.37
144.84
144.64
143.95
143.84
142.96
131.34
127.99
124.93
121.98
120.49
118.23
117.42
116.30
115.40
114.98
113.52
112.05
110.41
97.90
73.35
48.07
47.93
47.79
47.64
47.50
47.36
47.22
36.62
BRUKER
NAME qingfengyaoye
EXPNO 36
PROCNO 1
Date_ 20120405
Time 15.30
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 3727
DS 4
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 0.550197 Hz
AQ 0.9088159 sec
RG 2050
DW 13.867 usec
DE 6.50 usec
TE 296.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.70 usec
PL1 1.00 dB
PL1W 79.21191406 W
SFO1 151.0313646 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -2.00 dB
PL12 14.41 dB
PL13 19.65 dB
PL2W 23.13002586 W
PL12W 0.52865964 W
PL13W 0.62976158 W
SFO2 600.5826023 MHz
SI 65536
SF 151.0159585 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.40
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

图 10

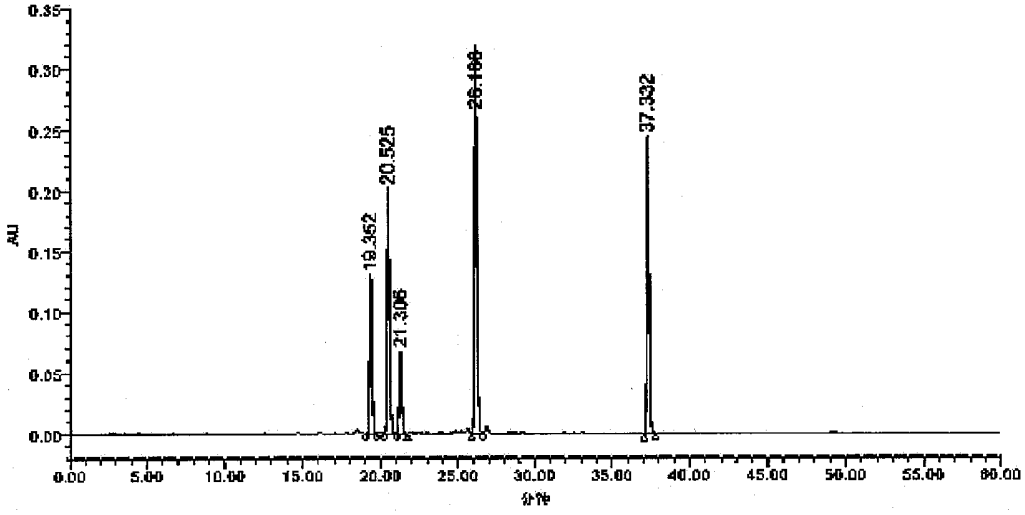

AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
19.352
20.525
21.306
26.188
37.332
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 11

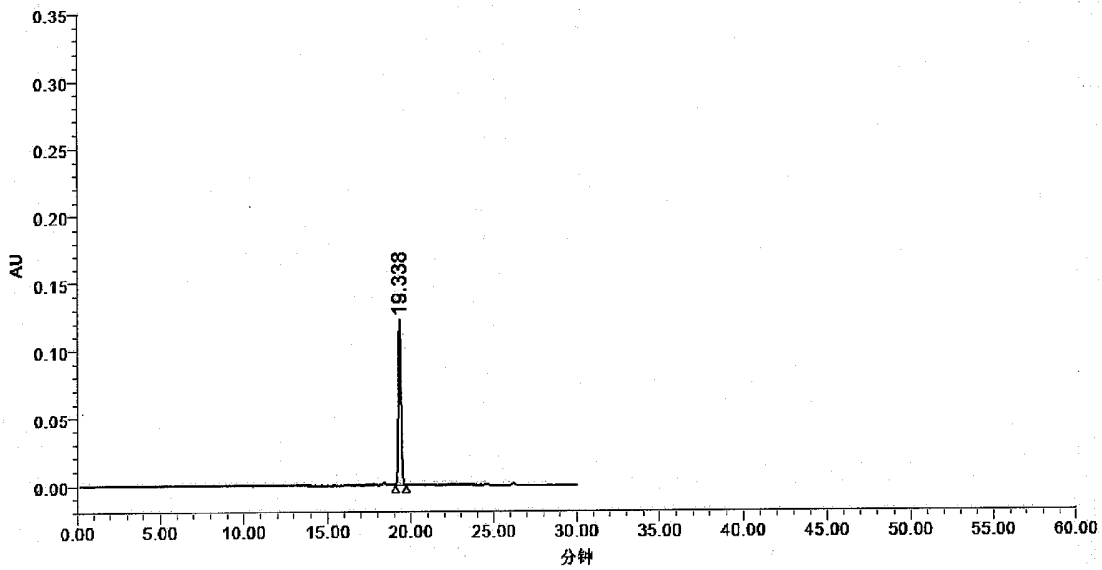

AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
19.338
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 12.

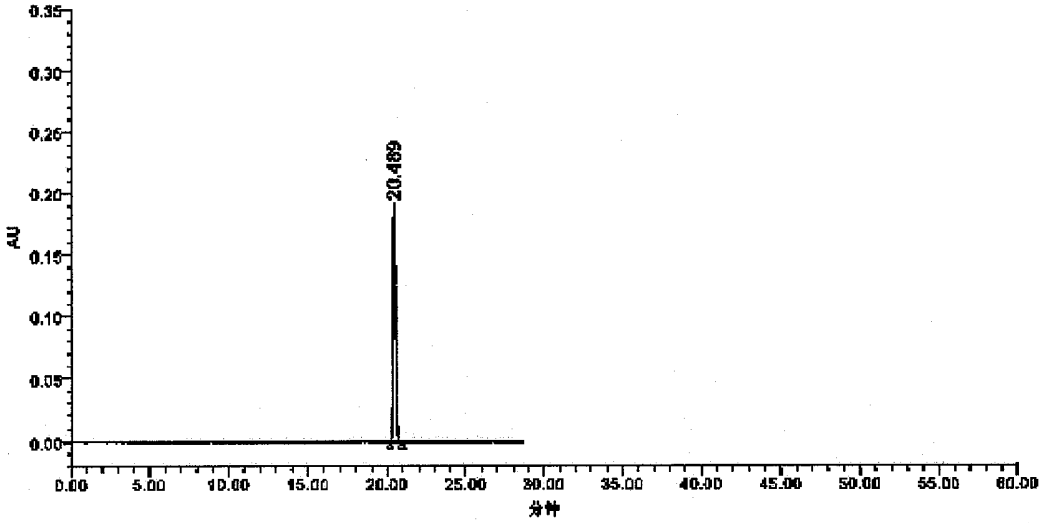

0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU
20.489
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 13

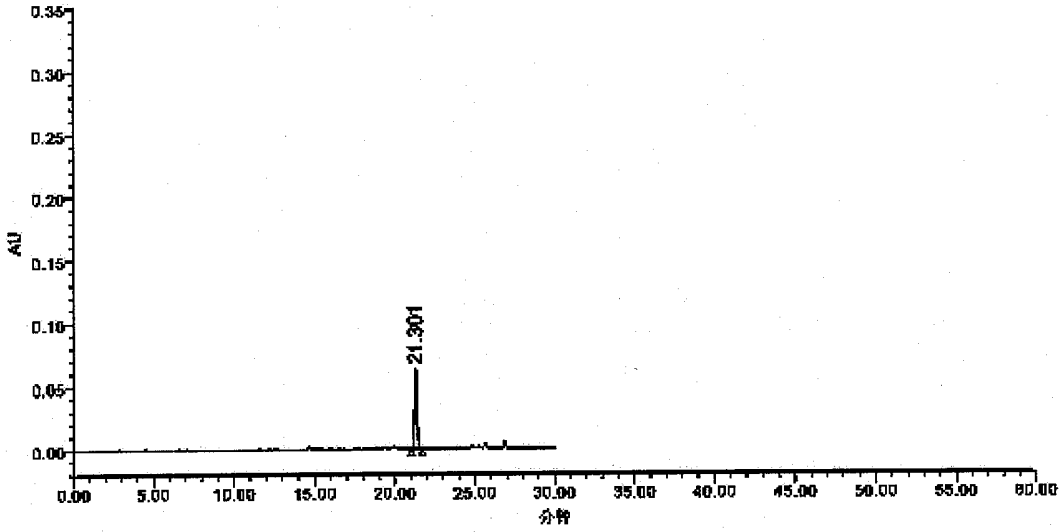

0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU
21.301
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 14

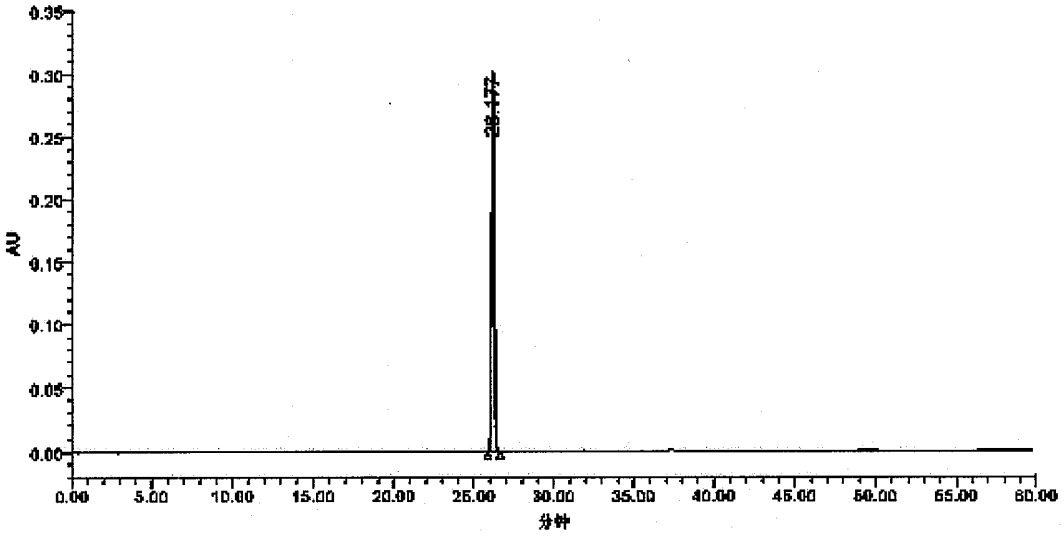

0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU
26.477
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 15

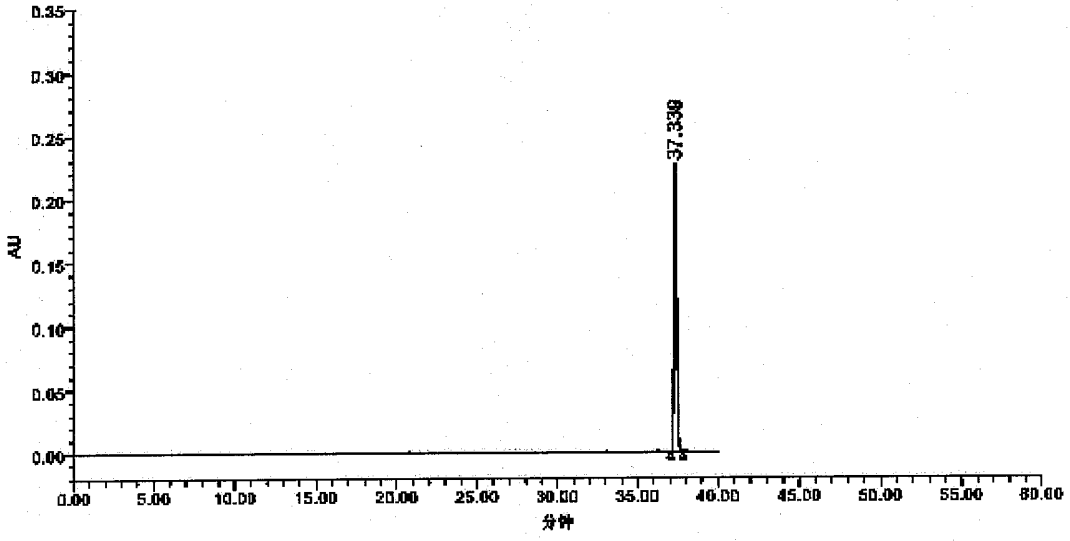

0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU
37.330
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 16

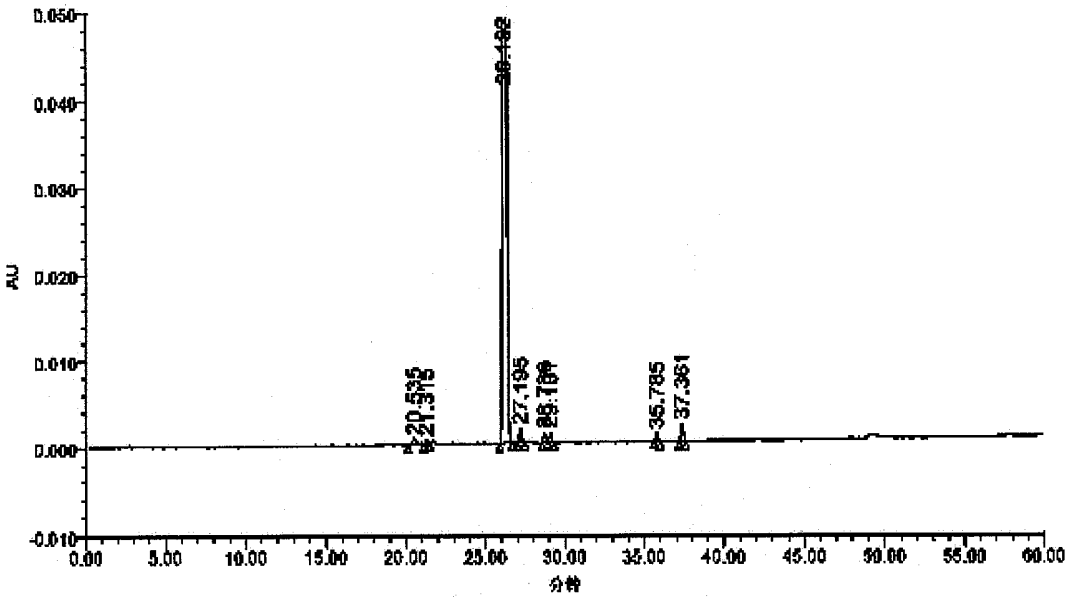

0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
-0.010
AU
20.535
21.315
27.195
35.785
37.361
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
分钟

图 17