

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510132789.7

[51] Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/34 (2006.01)

A61K 35/30 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 30 日

[11] 公开号 CN 1824292A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 31/7032 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.26

[21] 申请号 200510132789.7

[30] 优先权

[32] 2004.12.27 [33] CN [31] 200410102495.5

[71] 申请人 阿尔贝拉医药控股(通化)有限公司

地址 135000 吉林省梅河口市北环路东段

[72] 发明人 彭瑞平

[74] 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限公司

代理人 王明霞 俞昌华

权利要求书 4 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

一种脑功能改善药物、其制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种脑功能改善药物,含有从除人以外的哺乳动物肌肉组织中提取的活性多肽、次黄嘌呤和从除人以外的哺乳动物脑组织中提取的神经节苷脂,药物组合物中多肽重量为神经节苷脂中唾液酸的 6.1~100 倍,药物组合物中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸的 0.1~100 倍,还公开了药物组合物的制备方法及其在制备治疗心、脑功能改善药物方面的用途,本发明的药物组合物能促进心、脑组织的新陈代谢,参与脑组织神经元的生长、分化和再生过程,改善脑血液循环和脑代谢功能,可用于治疗心、脑部疾病引起的功能障碍。

1. 一种脑功能改善药物, 其特征在于, 所述药物由多肽、次黄嘌呤和神经节苷脂组配而成, 神经节苷脂以其中含有的唾液酸计算含量, 多肽为唾液酸含量的 6.1~100 倍, 优选 50~80 倍, 更优选为 60~70 倍, 最优选为 64 倍; 次黄嘌呤为唾液酸含量的 0.1~100 倍, 优选 0.5~20 倍, 更优选 2~10 倍, 最优选 2.5 倍; 多肽和次黄嘌呤由从除人以外的哺乳动物肌肉组织中提取得到, 神经节苷脂由从除人以外的哺乳动物脑组织中提取得到。
2. 根据权利要求 1 所述的脑功能改善药物, 其特征在于, 所述多肽分子量为 5000-10000。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的脑功能改善药物, 其特征在于, 所述从除人以外的哺乳动物为猪、狗、牛、羊、鹿、马或兔。
4. 根据权利要求 3 所述的脑功能改善药物, 其特征在于, 所述从除人以外的哺乳动物肌肉组织为兔肌肉组织; 所述从除人以外的哺乳动物脑组织优选为牛猪脑组织。
5. 权利要求 1-4 任意一项药物组合物的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括如下步骤:
 - (1) 肌肉提取液的制备:
 - A) 将动物任意部位肌肉组织加水匀浆后冷冻, 融化后加热离心过滤除渣, 保留滤液;
 - B) 滤液调节 pH 值保温酶解, 调节 pH 值呈酸性, 加热离心除沉淀, 过滤除杂, 保留滤液;
 - C) 将滤液调节呈中性, 加热离心除沉淀, 上清液过滤, 滤液用超滤膜超滤, 超滤液为肌肉提取液;
 - (2) 神经节苷脂提取液的制备:
 - A) 将动物脑组织加溶剂匀浆后过滤, 滤渣用溶剂抽提提取, 提取液与滤液合并后蒸干, 得干燥物;
 - B) 将干燥物溶于溶剂中, 向其中加入盐的水溶液提取分液;
 - C) 分液的上、下层液相分别用至少两种溶剂的混合水溶液洗涤, 合并洗涤后的上层液相部分, 减压浓缩, 然后用预冷丙酮沉淀, 干燥后得干燥物;
 - D) 将干燥物溶于至少两种溶剂的混合水溶液, 层析柱分离, 洗脱液浓缩后用预冷丙酮沉淀、分离, 得到的沉淀经后处理, 得到神经节苷脂提取液;
 - (3) 将上述提取液混合, 使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍, 使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍, 经后处理, 得成品制剂。
6. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于, 所述的方法包括如下步骤:
 - (1) 肌肉提取液的制备:
 - A) 将动物任意部位肌肉组织加 0.6~2.5 倍重量水匀浆, 匀浆后冷冻, 融化后加热 70~90℃, 保温 15~30 分钟, 降温后离心, 离心条件为 3000~4000 转/分, 离心时间为 15~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 得滤液;
 - B) 在滤液中加入胰蛋白酶保温水解, 胰蛋白酶浓度为 0.03~0.5%, 水解条件为 pH=7.5~8.5, 保温 35~50℃, 保温时间为 0.5~4 小时; 酶解后, 酶解液调 pH 值为 3.5-4.5, 加热至 80-95

℃, 保持 15-30 分钟, 降温后离心, 离心条件为 3000~4000 转/分, 离心时间为 15~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤得滤液;

C) 滤液调 pH 值为 6.5-7.5, 加热至 80-95℃, 保持 15-30 分钟, 降温后离心, 离心条件为 3000~4000 转/分, 离心时间为 15~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 滤液用截留分子量为 5000-10000 的超滤膜超滤, 超滤液为肌肉提取液, 其中多肽含量为 0.5~15mg/ml, 其中次黄嘌呤含量为 0.05~2mg / ml;

(2) 神经节苷脂提取液的制备:

A) 将动物脑组织加 3~4 倍重量的丙酮匀浆后过滤, 保留滤渣和滤液; 滤渣用 3~5 倍重量的氯仿—甲醇 (1~20: 1~20, V/V) 混合液抽提三次, 分别过滤; 将上述滤液合并后在旋转蒸发器中 37℃减压蒸干, 得干燥物;

B) 干燥物溶于氯仿—甲醇 (2~30: 1~20, V/V) 混合液, 然后向混合液中加入 1/20~1/80 体积的 0.1mol/L 的 KCl 溶液, 室温下搅拌 1 小时, 静置 8~16 小时后分液;

C) 分液后, 上层液相用等体积的氯仿—甲醇—水 (50~150: 5~40: 0.5~5, V/V/V) 混合液洗涤, 下层液相用等体积的氯仿—甲醇—水 (1~10: 30~80: 35~85, V/V/V) 混合液洗涤, 合并两次洗涤后的上层液相部分, 在 37℃减压浓缩至初始体积的 1/8~1/2, 然后用 -20℃预冷丙酮沉淀, 真空干燥, 得干燥物;

D) 将干燥物溶于的氯仿—甲醇—水 (30~80: 10~50: 1~90, V/V/V) 混合液, 制成 1~5%浓度的溶液, 加入层析柱, 调整流速 5mL/分钟, 用氯仿—甲醇—水 (60~90: 15~40: 1~10, V/V/V) 混合液 10~30L 洗脱, 然后改用氯仿—甲醇—水 (40~80: 20~50: 5~15, V/V/V) 混合液 8~15L 洗脱, 收集后洗脱液 6~12L, 减压浓缩后用 3~5 倍体积的 -20℃预冷丙酮沉淀, -20℃静止 2 小时后倾去上层清液, 余下部分在 1000 转/分下离心 10 分钟, 得到的沉淀用适量丙酮洗 2 次, 真空干燥, 将干燥物溶于水得神经节苷脂提取液, 浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 0.01~0.5mg 脑提取液脑提取液;

(3) 将上述提取液混合, 使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍, 使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍, 经后处理, 得成品制剂。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述的方法包括如下步骤:

(1) 肌肉提取液的制备:

A) 将动物任意部位肌肉组织加 1~1.5 倍重量水匀浆, 匀浆后冷冻, 融化后加热 75~85℃, 保温 20 分钟, 降温后离心, 离心条件为 4000 转/分, 离心时间为 20~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 得滤液;

B) 在滤液中加入胰蛋白酶保温水解, 胰蛋白酶浓度为 0.03~0.5%, 水解条件为 pH=7.8~8.2, 保温 37~42℃, 保温时间为 1.5~3 小时; 酶解后, 酶解液调 pH 值为 3.8-4.2, 加热至 80-85℃, 保持 20 分钟, 降温后离心, 离心条件为 4000 转/分, 离心时间为 20~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤得滤液;

C) 滤液调 pH 值为 6.8-7.2, 加热至 80-85℃, 保持 20 分钟, 降温后离心, 离心条件为 4000 转/分, 离心时间为 20~30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 滤液用截留分子量为 8000 的超滤膜超滤, 超滤液为肌肉提取液, 其中多肽含量为 0.5~15mg/ml, 其中次黄嘌呤含量为 0.05~2mg/ml;

(2) 神经节苷脂提取液的制备:

A) 将动物脑组织加 3~4 倍重量的丙酮匀浆后过滤, 保留滤渣和滤液; 滤渣用 3~5 倍重量的氯仿—甲醇 (1: 1, V/V) 混合液抽提三次, 分别过滤; 将上述滤液合并后在旋转蒸发器中 37℃减压蒸干, 得干燥物;

B) 干燥物溶于氯仿—甲醇 (2: 1, V/V) 混合液, 然后向混合液中加入 1/80 体积的 0.1mol/L 的 KCl 溶液, 室温下搅拌 1 小时, 静置 8~16 小时后分液;

C) 分液后, 上层液相用等体积的氯仿—甲醇—水 (86: 14: 1, V/V/V) 混合液洗涤, 下层液相用等体积的氯仿—甲醇—水 (3: 48: 47, V/V/V) 混合液洗涤, 合并两次洗涤后的上层液相部分, 在 37℃减压浓缩至初始体积的 1/4, 然后用 -20℃预冷丙酮沉淀, 真空干燥, 得干燥物;

D) 将干燥物溶于氯仿—甲醇—水 (65: 25: 4, V/V/V) 混合液, 制成 2.5%浓度的溶液, 加入层析柱, 调整流速 5mL/分钟, 用氯仿—甲醇—水 (65: 25: 4, V/V/V) 混合液 20L 洗脱, 然后改用氯仿—甲醇—水 (60: 35: 8, V/V/V) 混合液 12L 洗脱, 收集后洗脱液 10L, 减压浓缩后用 4 倍体积的 -20℃预冷丙酮沉淀, -20℃静止 2 小时后倾去上层清液, 余下部分在 1000 转/分下离心 10 分钟, 得到的沉淀用适量丙酮洗 2 次, 真空干燥, 将干燥物溶于水得神经节苷脂提取液, 浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 0.01~0.5mg 脑提取液脑提取液;

(3) 将上述提取液混合, 使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍, 使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍, 经后处理, 得成品制剂。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于, 所述方法步骤 1) 中, 肌肉组织加 0.6 ~2.5 倍重量水匀浆; 酶解采用胰蛋白酶, 控制 pH7.5~8.5 条件下加热保温水解; 水解液经两次调节 pH 值加热离心过滤后, 滤液用截留分子量为 5000-10000 的超滤膜超滤上, 得多肽含量为 0.5~15mg/ml, 次黄嘌呤含量为 0.05~2mg / ml 的肌肉提取液;

所述方法步骤 2) 中, 匀浆所用溶剂为丙酮, 滤渣用氯仿—甲醇 (1~20: 1~20, V/V) 的混合液充分抽提, 合并的滤液用旋转蒸发器蒸干, 得干燥物; 溶解干燥物的溶剂为体积比为 2~30: 1~20 的卤代烃和醇的混合溶剂, 盐的水溶液优选 KCl 水溶液; 分液的上、下层液相分别用卤代烃和醇的混合水溶液洗涤, 减压浓缩至初始体积的 1/8~1/2, 然后用低于 0℃预冷丙酮沉淀; 将干燥物溶于卤代烃和醇的混合水溶液, 用卤代烃和醇的混合水溶液梯度洗脱柱层析分离; 酶解 pH 值优选为 7.8~8.2, 酶解温度优选为 37~42℃; 为保持温度稳定, 可采取夹层水浴保温的方法; 保温结束后应调节 pH3.8~4.2 后再加热;

所述步骤(1)的C)中,超滤膜优选为截留分子量为6000-10000的超滤膜,更优选截留分子量为8000的超滤膜;

本发明的减压蒸发的压力控制在0.04~0.08MPa左右。

9. 根据权利要求3或4所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)的D)中所用的层析柱通过如下过程制备:将硅胶颗粒过筛选60~80目的均匀颗粒,在110℃下干燥1小时,使其活化,然后用5倍柱体积的氯仿-甲醇(5~20:0.5~3, V/V)混合液作为载体,将硅胶调成糊状,使其均匀分散后装入80×10cm的层析柱,即得;

所述氯仿-甲醇混合比优选为9:1(V/V);

步骤(3)中成品制剂的剂型为药剂学上可接受的剂型,比如片剂、胶囊、口服液、小容量注射剂、大输液或冻干粉针,优选为小容量注射剂、大输液或冻干粉针,最优选为小容量注射剂。

10. 权利要求1-4所述的脑功能改善药物在制备治疗脑功能改善药物方面的用途;在制备治疗心肌和脑部疾病引起的功能障碍药物方面的用途;作为治疗心肌梗死、痴呆、脑外伤、脑水肿药物中的应用;以及作为制备治疗老年性痴呆、脑血管意外创伤及创伤后的中枢神经系统后遗症、冠心病、心绞痛、心肌疾病、脑血管病、以及缺血性和出血性脑病变等药物中的应用。

一种脑功能改善药物、其制备方法及其用途

技术领域

本发明涉及一种脑功能改善药物、其制备方法及其用途，具体地说，涉及一种由从除人以外的哺乳动物肌肉组织中提取的活性多肽、次黄嘌呤和从除人以外的哺乳动物脑组织中提取的神经节苷脂、其制备方法及其在制备治疗心、脑部疾病引起的功能障碍方面的药物用途。

背景技术

神经节苷脂是一种含唾液酸的鞘糖脂类，其一个或多个末端糖基是 N-乙酰基神经酸即唾液酸。脑灰质的膜脂中含神经节苷脂高达 6% 以上，在神经的传导中起着重要作用。

神经节苷脂的临床药用价值有：用于各种原因引起的中枢神经系统结构损害的功能恢复；用于脑血管意外创伤及创伤后的中枢神经系统后遗症的治疗；用于缺血性和出血性脑病变的治疗。

目前上市的神经节苷脂类药物有阿根廷生产的施捷因，为单唾液酸四己糖神经节苷脂钠盐注射液，其由基因工程方法生产，为单一组分，不含活性多肽，不太利于吸收和利用。

意大利 Fidia 公司从牛脑组织中提取的单唾液酸四己糖基神经节苷脂(GM1)注射液(商品名 Sygen)已于 20 世纪 90 年代正式在我国销售。

中国专利申请 93112578 公开了一种脑保健营养品、其制造方法和用途，该保健品为含有神经节苷脂的营养液，神经节苷脂含量至少每毫升含有 0.5mg，其制造方法主要使用水、氯仿、酒精提取，其用途在于增强人脑的学习、记忆功能，促进人脑的正常发育和脑损伤后的恢复。

中国专利申请 95111569 公开了一种含神经节苷脂为主的糖脂类物质的生产方法，包括粉碎、溶剂提取、过滤和浓缩，其特征是将干净的动物脑经粉碎，加入 40-100% 含量的酒精和石油醚提取，或者在干净的动物脑中加入 40~100% 含量的酒精后粉碎，加入石油醚提取，上述提取物过滤，清液浓缩，所述的动物脑、酒精和石油醚的重量比是 1: 1~20: 0.5~8。

中国专利申请 00133077 公开了一种单唾液酸四己糖神经节苷脂的高纯度制备工艺。

生物体内，小分子多肽、氨基酸广泛参与各种生化过程，包括各种物质的合成、物质的转运、信息物资的生成与传递，同时为所有的生命活动提供能量，尤其是对脑组织更为重要。次黄嘌呤是参与人体生命活动的重要物质。次黄嘌呤与小分子多肽、氨基酸配合，有促进机体代谢作用，对心血管系统疾病有改善血液循环障碍、降低血管阻力、增加心肌利用氧等作用，能促进造血系统活动增强，白血球数量增多，同时有增加血管弹性、防止血管硬化作用。

从国内外文献报道的提取神经节苷脂的方法看，多采用不同比例有机溶剂抽提总脂，然后用分配萃取方法提取神经节苷脂混合物，再用离子交换层析、分子排阻及硅胶层析法分离神经节苷脂。

有报道，将组织匀浆用氯仿-甲醇溶液抽提、离心，上清液加水萃取、蒸干得粗脂。将粗脂溶于甲醇，过阴离子交换柱，收集神经节苷脂。

另有报道，将组织加入氯仿-甲醇溶液抽提，抽提液浓缩、旋转蒸干得总脂。将总脂加入异丙醚-正丁醇溶剂溶解后用氯化钠溶液萃取、离心，水相为酸性鞘糖脂提取物。冻干粗脂过 Sephadex G-50 柱层

析, 收集混合神经节苷脂组分冻干。

目前, 脑组织提取物类如脑复素注射液、活脑素注射液、脑组织注射液、热藏大脑注射液、脑多肽注射液等, 均为由各类脑组织蛋白水解制成, 含神经组织活性多肽, 但神经节苷脂检测不出。

专利申请 01126465 公开了一种治疗神经系统疾病的药物和保健品, 含有神经节苷脂和银杏叶提取物, 提供了神经节苷脂作为组合物组分, 与其它组分协同发挥作用的药物组合物。

专利申请 CN03137463.8 公开了一种含有从除人以外的哺乳动物肌肉组织中提取的活性多肽和从除人以外的哺乳动物脑组织中提取的神经节苷脂的药物组合物及其制备方法, 根据该专利生产的产品在临床上获得了良好的效果, 但由于其提取多肽的方法过于对当时工业化大生产适用, 采用了霉菌蛋白酶水解, 提取方法略粗糙, 上市的部分批次产品质量不稳定, 在临床上也有不良反应出现。

目前已公开的脑提取液中的神经节苷脂的含量均较低, 而且虽然也有神经节苷脂作为组合物组分, 与其它组分协同发挥作用的药物组合物的公开报道, 但仍未有其与动物其他机体组织协同发挥作用的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种脑功能改善药物。

本发明的另一目的在于提供该药物组合物的制备方法。

本发明的另一目的是提供药物组合物制备治疗心肌或脑部疾病引起的功能障碍方面药物的用途。

本发明还涉及药物组合物在制备治疗老年性痴呆、脑血管意外创伤及创伤后的中枢神经系统后遗症、冠心病、心绞痛、心肌疾病、脑血管病、以及缺血性和出血性脑病变治疗药物上的用途。

所述的脑功能改善药物由多肽、次黄嘌呤和神经节苷脂组配而成, 多肽和次黄嘌呤由从除人以外的哺乳动物肌肉组织中提取得到, 神经节苷脂由从除人以外的哺乳动物脑组织中提取得到; 神经节苷脂以其中含有的唾液酸计算含量, 多肽为唾液酸含量的 6.1~100 倍, 优选 50~80 倍, 更优选为 60~70 倍, 最优选为 64 倍; 次黄嘌呤为唾液酸含量的 0.1~100 倍, 优选 0.5~20 倍, 更优选 2~10 倍, 最优选 2.5 倍。

上述多肽分子量为 5000-10000。

本发明所述脑功能改善药物由动物肌肉组织提取物和脑组织提取物组配得到, 脑组织提取物中神经节苷脂有多种形式: 单唾液酸四己糖基神经节苷脂 (GM1)、双唾液酸四己糖基神经节苷脂、三唾液酸四己糖基神经节苷脂等多种神经节苷脂。

本发明所述的药物组合物与磺基水杨酸溶液反应无浑浊, 茚三酮试液反应为阳性, 与丙酮反应产生白色混浊; 采用薄层色谱法, 以单一神经节苷脂 GM1 为对照品, 间苯二酚溶液显色, 谱图显示色谱图主斑点的颜色及位置与对照品色谱图的斑点一致。

哺乳动物中枢神经系统中的神经节苷脂含量丰富, 例如可从猪、狗、牛、羊、鹿、马、兔等新鲜脑组织中提取含有神经节苷脂的物质, 上述哺乳动物的肌肉组织也可以提取活性多肽和次黄嘌呤。

上述哺乳动物肌肉组织优选为兔肌肉组织。

上述哺乳动物脑组织优选为牛脑组织。

在传统治疗中,兔肉组织用来治疗心肌疾病已经有比较显著的疗效,而且从生产过程的可操作性和有效利用率方面考虑,多选用兔肉来提取活性多肽、次黄嘌呤;基于神经节苷脂的提取量考虑。本发明优选猪脑来提取神经节苷脂。

因此,从生产成本、生产工艺、产品质量稳定性、临床疗效等因素考虑,优选猪脑组织和兔肉组织作为生产原料。

上述动物肌肉组织可以是动物的任意部位肌肉。

一种制备所述的药物组合物的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 肌肉提取液的制备:

- D) 将动物任意部位肌肉组织加水匀浆后冷冻,融化后加热离心过滤除渣,保留滤液;
- E) 滤液调节 pH 值保温酶解,调节 pH 值呈酸性,加热离心除沉淀,过滤除杂,保留滤液;
- F) 将滤液调节呈中性,加热离心除沉淀,上清液过滤,滤液用超滤膜超滤,超滤液为肌肉提取液;

(2) 神经节苷脂提取液的制备:

- E) 将动物脑组织加溶剂匀浆后过滤,滤渣用溶剂抽提提取,提取液与滤液合并后蒸干,得干燥物;
- F) 将干燥物溶于溶剂中,向其中加入盐的水溶液提取分液;
- G) 分液的上、下层液相分别用至少两种溶剂的混合水溶液洗涤,合并洗涤后的上层液相部分,减压浓缩,然后用预冷丙酮沉淀,干燥后得干燥物;
- H) 将干燥物溶于至少两种溶剂的混合水溶液,层析柱分离,洗脱液浓缩后用预冷丙酮沉淀、分离,得到的沉淀经后处理,得到神经节苷脂提取液;

- (3) 将上述提取液混合,使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍,使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍,经后处理,得成品制剂。

其中,肌肉提取液的制备过程中,加 0.6 ~2.5 倍重量水匀浆,匀浆后冷冻。

酶解采用胰蛋白酶,控制 pH7.5~8.5 条件下加热保温水解。

水解液经两次调节 pH 值加热离心过滤后,滤液用截留分子量为 5000-10000 的超滤膜超滤上,得多肽含量为 0.5~15mg/ml,次黄嘌呤含量为 0.05~2mg / ml_g的肌肉提取液。

在脑提取液的制备过程中,匀浆所用溶剂为丙酮,滤渣用氯仿—甲醇(1~20: 1~20, V/V)的混合液充分抽提,合并的滤液用旋转蒸发器蒸干,得干燥物。

溶解干燥物的溶剂为体积比为 2~30: 1~20 的卤代烃和醇的混合溶剂,盐的水溶液优选 KCl 水溶液。

分液的上、下层液相分别用卤代烃和醇的混合水溶液洗涤,减压浓缩至初始体积的 1/8~1/2,然后用低于 0℃预冷丙酮沉淀。

将干燥物溶于卤代烃和醇的混合水溶液,用卤代烃和醇的混合水溶液梯度洗脱柱层析分离。

更具体地说,本发明的制备方法包括:

(1) 肌肉提取液的制备:

- D) 将动物任意部位肌肉组织加 0.6~2.5 倍重量水匀浆,匀浆后冷冻,融化后加热 70~90℃,保温 15~

30 分钟,降温后离心,离心条件为 3000~4000 转/分,离心时间为 15~30 分钟,保留上清液,上清液过滤,得滤液;

- E) 在滤液中加入胰蛋白酶保温水解,胰蛋白酶浓度为 0.03~0.5%,水解条件为 pH=7.5~8.5,保温 35~50℃,保温时间为 0.5~4 小时;酶解后,酶解液调 pH 值为 3.5-4.5,加热至 80-95℃,保持 15-30 分钟,降温后离心,离心条件为 3000~4000 转/分,离心时间为 15~30 分钟,保留上清液,上清液过滤得滤液。
- F) 滤液调 pH 值为 6.5-7.5,加热至 80-95℃,保持 15-30 分钟,降温后离心,离心条件为 3000~4000 转/分,离心时间为 15~30 分钟,保留上清液,上清液过滤,滤液用截留分子量为 5000-10000 的超滤膜超滤,超滤液为肌肉提取液,其中多肽含量为 0.5~15mg/ml,其中次黄嘌呤含量为 0.05~2mg / ml;

(2) 神经节苷脂提取液的制备:

- A) 将动物脑组织加 3~4 倍重量的丙酮匀浆后过滤,保留滤渣和滤液;滤渣用 3~5 倍重量的氯仿—甲醇(1~20: 1~20, V/V) 混合液抽提三次,分别过滤;将上述滤液合并后在旋转蒸发器中 37℃减压蒸干,得干燥物;
- B) 干燥物溶于氯仿—甲醇(2~30: 1~20, V/V) 混合液,然后向混合液中加入 1/20~1/80 体积的 0.1mol/L 的 KCl 溶液,室温下搅拌 1 小时,静置 8~16 小时后分液;
- C) 分液后,上层液相用等体积的氯仿—甲醇—水(50~150: 5~40: 0.5~5, V/V/V) 混合液洗涤,下层液相用等体积的氯仿—甲醇—水(1~10: 30~80: 35~85, V/V/V) 混合液洗涤,合并两次洗涤后的上层液相部分,在 37℃减压浓缩至初始体积的 1/8~1/2,然后用-20℃预冷丙酮沉淀,真空干燥,得干燥物;
- D) 将干燥物溶于氯仿—甲醇—水(30~80: 10~50: 1~90, V/V/V) 混合液,制成 1~5%浓度的溶液,加入层析柱,调整流速 5mL/分钟,用氯仿—甲醇—水(60~90: 15~40: 1~10, V/V/V) 混合液 10~30L 洗脱,然后改用氯仿—甲醇—水(40~80: 20~50: 5~15, V/V/V) 混合液 8~15L 洗脱,收集后洗脱液 6~12L,减压浓缩后用 3~5 倍体积的-20℃预冷丙酮沉淀,-20℃静置 2 小时后倾去上层清液,余下部分在 1000 转/分下离心 10 分钟,得到的沉淀用适量丙酮洗 2 次,真空干燥,将干燥物溶于水得神经节苷脂提取液,浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 0.01~0.5mg 脑提取液脑提取液;

- (3) 将上述提取液混合,使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍,使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍,经后处理,得成品制剂。

更为优选的,本发明的制备方法包括如下步骤:

(1) 肌肉提取液的制备:

- A) 将动物任意部位肌肉组织加 1~1.5 倍重量水匀浆,匀浆后冷冻,融化后加热 75~85℃,保温 20 分钟,降温后离心,离心条件为 4000 转/分,离心时间为 20~30 分钟,保留上清液,上清液过滤,得滤液;
- B) 在滤液中加入胰蛋白酶保温水解,胰蛋白酶浓度为 0.03~0.5%,水解条件为 pH=7.8~8.2,保温 37~

42℃，保温时间为 1.5~3 小时；酶解后，酶解液调 pH 值为 3.8-4.2，加热至 80-85℃，保持 20 分钟，降温后离心，离心条件为 4000 转/分，离心时间为 20~30 分钟，保留上清液，上清液过滤得滤液。

C) 滤液调 pH 值为 6.8-7.2，加热至 80-85℃，保持 20 分钟，降温后离心，离心条件为 4000 转/分，离心时间为 20~30 分钟，保留上清液，上清液过滤，滤液用截留分子量为 8000 的超滤膜超滤，超滤液为肌肉提取液，其中多肽含量为 0.5~15mg/ml，其中次黄嘌呤含量为 0.05~2mg / ml；

(2) 神经节苷脂提取液的制备：

A) 将动物脑组织加 3~4 倍重量的丙酮匀浆后过滤，保留滤渣和滤液；滤渣用 3~5 倍重量的氯仿—甲醇（1：1，V/V）混合液抽提三次，分别过滤；将上述滤液合并后在旋转蒸发器中 37℃减压蒸干，得干燥物；

B) 干燥物溶于氯仿—甲醇（2：1，V/V）混合液，然后向混合液中加入 1/80 体积的 0.1mol/L 的 KCl 溶液，室温下搅拌 1 小时，静置 8~16 小时后分液；

C) 分液后，上层液相用等体积的氯仿—甲醇—水（86：14：1，V/V/V）混合液洗涤，下层液相用等体积的氯仿—甲醇—水（3：48：47，V/V/V）混合液洗涤，合并两次洗涤后的上层液相部分，在 37℃减压浓缩至初始体积的 1/4，然后用 -20℃预冷丙酮沉淀，真空干燥，得干燥物；

D) 将干燥物溶于氯仿—甲醇—水（65：25：4，V/V/V）混合液，制成 2.5%浓度的溶液，加入层析柱，调整流速 5ml/分钟，用氯仿—甲醇—水（65：25：4，V/V/V）混合液 20L 洗脱，然后改用氯仿—甲醇—水（60：35：8，V/V/V）混合液 12L 洗脱，收集后洗脱液 10L，减压浓缩后用 4 倍体积的 -20℃预冷丙酮沉淀，-20℃静止 2 小时后倾去上层清液，余下部分在 1000 转/分下离心 10 分钟，得到的沉淀用适量丙酮洗 2 次，真空干燥，将干燥物溶于水得神经节苷脂提取液，浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 0.01~0.5mg 脑提取液脑提取液；

(3) 将上述提取液混合，使混合液中多肽的重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 6.1~100 倍，使混合液中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸重量的 0.1~100 倍，经后处理，得成品制剂。

上述步骤（1）的 B) 中，使用的胰蛋白酶为常规市售产品，为了使本发明生产工艺、产品质量稳定，应尽可能由固定生产商提供；酶解 pH 值优选为 7.8~8.2，酶解温度优选为 37~42℃；为保持温度稳定，可采取夹层水浴保温的方法。保温结束后应调节 pH3.8~4.2 后再加热。

上述步骤（1）的 C) 中，超滤膜优选为截留分子量为 6000-10000 的超滤膜，更优选截留分子量为 8000 的超滤膜。使用的超滤膜为市售产品，其生产商应为行业认可的生产单位，使用的滤膜型号与尺寸可根据具体的生产量、选用的超滤器尺寸来确定。

上述步骤（2）的 B) 中，氯仿—甲醇混合液加入量以完全溶解干燥物为准。

上述步骤（2）中丙酮的加入量以不再有沉淀析出为准。

上述步骤（2）的 D) 中，所用的层析柱通过如下过程制备：将硅胶颗粒过筛选 60~80 目的均匀颗粒，在 110℃下干燥 1 小时，使其活化，然后用 5 倍柱体积的氯仿-甲醇（5~20：0.5~3，V/V）混合

液作为载体，将硅胶调成糊状，使其均匀分散后装入 80×10cm 的层析柱，即得。其中优选的氯仿-甲醇混合比为 9:1 (V/V)。

本发明的减压蒸发的压力控制在 0.04~0.08MPa 左右。

上述步骤(3)中成品制剂的剂型为药剂学上可接受的剂型，比如片剂、胶囊、口服液、小容量注射剂、大输液或冻干粉针等，优选为小容量注射剂、大输液或冻干粉针，最优选为小容量注射剂。因此，所述步骤(3)所述的后处理可以是按照制备药剂学上可接受的剂型的常规方法进行。

本发明的制备方法采用硅胶柱一步纯化得混合神经节苷脂，先减压浓缩后用预冷丙酮沉淀，真空干燥后溶于蒸馏水，作为神经节苷脂提取液备用，使制得的提取物有效成分收率较高，组分更合理，同时也节省了操作时间，降低了原辅料消耗。神经节苷脂具有感知、传递细胞内外信息的功能，参与细胞的识别、粘着、生长、分化以及细胞信息传递等过程。作为某些神经递质、激素、病毒和干扰素的受体，具有参与神经组织的分化、再生、修复，与神经冲动的传导、细胞间的识别作用。能加速损伤的神经组织的再生修复，促进神经支配功能恢复，减低兴奋性氨基酸的释放，从而减轻细胞毒性和血管水肿，是脑血管意外治疗的良药，用于治疗老年性痴呆及其它神经性疾病取得良好疗效。

次黄嘌呤是参与人体生命活动的重要物质。次黄嘌呤与小分子多肽、氨基酸配合，有促进机体代谢作用，对心血管系统疾病有改善血液循环障碍、降低血管阻力、增加心肌利用氧等作用，能促进造血系统活动增强，白血球数量增多，同时有增加血管弹性、防止血管硬化作用。

本发明所述的药物组合物中含有活性多肽、次黄嘌呤和多种神经节苷脂，同时本发明药物组合物中含有活性多肽、次黄嘌呤和多种神经节苷脂利于吸收和利用，能促进心、脑组织的新陈代谢，参与脑组织神经元的生长、分化和再生过程，改善心脑血管循环和脑代谢功能，可应用于制备治疗心肌和脑部疾病引起的功能障碍药物方面，可用于治疗心肌梗死、痴呆、脑外伤、脑水肿等症；本发明药物组合物作为制备治疗老年性痴呆、脑血管意外创伤及创伤后的中枢神经系统后遗症、冠心病、心绞痛、心肌疾病、脑血管病、以及缺血性和出血性脑病变等药物中的应用。

本发明研究人员进行大量实验发现，当该药物组合物中活性多肽重量为神经节苷脂中唾液酸的 64 倍时，当该药物组合物中次黄嘌呤重量为神经节苷脂中唾液酸 2.5 倍时，三者的协同作用最好，更利于人体的吸收和利用。本发明优选药物组合物注射液的常规用量为：

规格 2ml:6.4mg (多肽): 100 μg (唾液酸): 0.25mg(次黄嘌呤)；

5ml:16.0mg (多肽): 250 μg (唾液酸): 0.625mg(次黄嘌呤)；

10ml:32.0mg (多肽): 500 μg (唾液酸): 1.25mg(次黄嘌呤)；

肌肉注射：2~4ml/次，2 次/日或遵医嘱；

静脉滴注：10-20ml/次，加入 300ml 0.9%氯化钠注射液或 5%葡萄糖注射液，缓慢滴注(每分钟 2ml)，1 次/日，两周为一疗程。

本发明所述的药物组合物含有营养肌体组织特别是心脑血管组织的活性物质，采用神经节苷脂与多肽及次黄嘌呤的协同作用，达到了最佳的临床效果。

本发明药物组合物注射液含有营养肌体组织特别是心脑血管组织的活性物质，包括活性多肽、神经节苷

脂、次黄嘌呤等物质，能促进心、脑组织的新陈代谢，参与脑组织神经元的生长、分化和再生过程，改善心脑血管循环和脑代谢功能，可用于治疗心肌和脑部疾病引起的功能障碍；用于治疗心肌梗死、痴呆、脑外伤、脑水肿等症；本发明药物组合物在制备治疗老年性痴呆、脑血管意外创伤及创伤后的中枢神经系统后遗症、冠心病、心绞痛、心肌疾病、脑血管病、以及缺血性和出血性脑病变治疗药物上的用途。

具体实施方式

实施例 1

步骤（1）：

取新鲜兔肌肉 10kg，加 10L 水匀浆，匀浆后冷冻，融化后加热 75~80℃，保温 20 分钟，降温后离心，离心条件为 4000 转/分，离心时间为 20 分钟，保留上清液，上清液过滤，得滤液；在滤液中加入胰蛋白酶保温水解，胰蛋白酶浓度为 0.2%，水解条件为 pH=7.8~8.2，保温 37~42℃，保温时间为 2 小时；酶解后，酶解液调 pH 值为 3.8-4.2，加热至 80-85℃，保持 20 分钟，降温后离心，离心条件为 4000 转/分，离心时间为 20 分钟，保留上清液，上清液过滤得滤液。

滤液调 pH 值为 6.8-7.2，加热至 80-85℃，保持 20 分钟，降温后离心，离心条件为 4000 转/分，离心时间为 20 分钟，保留上清液，上清液过滤，滤液用截留分子量为 8000 的超滤膜超滤，超滤液为肌肉提取液，滤液减压浓缩至 800ml，其中多肽含量为 5mg/ml，其中次黄嘌呤含量为 0.2mg / ml；

步骤（2）：

取 10kg 新鲜猪脑用 40L 丙酮匀浆，匀浆液用滤纸过滤，得滤渣 2500g，滤渣用 10L 氯仿—甲醇（1：1）混合液抽提三次，分别过滤后合并滤液，使用旋转蒸发器，在 37℃减压蒸干，得干燥物 1.25g。干燥物用 20L 氯仿—甲醇混合液（2：1，V/V）溶解，加入 250ml 的 0.1mol/LKCl 溶液。室温搅拌 1 小时，转移到分液漏斗中静置 8 小时。分液后，上相用等体积的氯仿—甲醇—水（86：14：1，V/V/V）洗 1 次；下相用等体积的氯仿—甲醇—水（3：48：47，V/V/V）洗 1 次；合并 2 次上相于 37℃减压浓缩至约 5L，-20℃预冷丙酮沉淀，真空干燥。

层析柱通过如下过程制备：将硅胶颗粒过筛选 80 目的均匀颗粒，在 110℃下干燥 1 小时，使其活化，然后用 5 倍柱体积的氯仿-甲醇（9：1，V/V）混合液作为载体，将硅胶调成糊状，使其均匀分散后装入 80×10cm 的层析柱，即可。

将前述真空干燥物 1.2g 溶于氯仿—甲醇—水（65：25：4，V/V/V）50ml 加入层析柱，调整流速 5ml/分钟，用氯仿—甲醇—水（65：25：4，V/V/V）20L 溶液洗脱，然后改用氯仿—甲醇—水（60：35：8）12L 洗脱，收集后洗脱液 10L，减压浓缩后用 40L 的 -20℃预冷丙酮沉淀，-20℃静置 2 小时，倾去上层清液，离心 10 分钟（1000rpm），沉淀用适量丙酮洗 2 次，沉淀真空干燥过夜。

将 1.2g 干燥物溶于 1200ml 注射用水，作为神经节苷脂提取液备用，浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 1mg/ml。

步骤（3）：

将兔肌肉提取液 1280ml 和猪脑神经节苷脂提取液 100ml 混合，加注射用水到 2L，无菌过滤后灌装

成 2ml/支, 高压灭菌, 包装入库, 每支含有 6.4mg 多肽、100 μ g 唾液酸、0.25mg 次黄嘌呤。

实施例 2

步骤 (1):

取新鲜鹿肌肉肌肉 10kg, 加 16L 水匀浆, 匀浆后冷冻, 融化后加热 75~80 $^{\circ}$ C, 保温 25 分钟, 降温后离心, 离心条件为 3500 转/分, 离心时间为 30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 得滤液; 在滤液中加入胰蛋白酶保温水解, 胰蛋白酶浓度为 0.8%, 水解条件为 pH=7.8~8.2, 保温 39~45 $^{\circ}$ C, 保温时间为 3 小时; 酶解后, 酶解液调 pH 值为 3.9-4.1, 加热至 80 $^{\circ}$ C, 保持 15 分钟, 降温后离心, 离心条件为 4000 转/分, 离心时间为 30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤得滤液。

滤液调 pH 值为 6.9~7.1, 加热至 85 $^{\circ}$ C, 保持 20 分钟, 降温后离心, 离心条件为 4000 转/分, 离心时间为 30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 滤液用截留分子量为 10000 的超滤膜超滤, 超滤液为肌肉提取液, 滤液减压浓缩至 800ml, 其中多肽含量为 8mg/ml, 其中次黄嘌呤含量为 0.5mg / ml;

步骤 (2):

取 10kg 新鲜牛脑用 35L 丙酮匀浆, 匀浆液用滤纸过滤, 得滤渣 2500g, 滤渣用 7.5L 氯仿—甲醇 (5: 1) 混合液抽提三次, 分别过滤后合并滤液, 使用旋转蒸发器, 在 37 $^{\circ}$ C 减压蒸干, 得干燥物 1.25g。干燥物用 20L 氯仿—甲醇混合液 (10: 1, V/V) 溶解, 加入 1000ml 的 0.1mol/L KCl 溶液。室温搅拌 1 小时, 转移到分液漏斗中静置 10 小时。分液后, 上相用等体积的氯仿—甲醇—水 (50: 10: 0.5, V/V/V) 洗 1 次; 下相用等体积的氯仿—甲醇—水 (1: 30: 35, V/V/V) 洗 1 次; 合并 2 次上相于 37 $^{\circ}$ C 减压浓缩至约 2.5L, -20 $^{\circ}$ C 预冷丙酮沉淀, 真空干燥。

层析柱通过如下过程制备: 将硅胶颗粒过筛选 70 目的均匀颗粒, 在 110 $^{\circ}$ C 下干燥 1 小时, 使其活化, 然后用 5 倍柱体积的氯仿-甲醇 (20: 3, V/V) 混合液作为载体, 将硅胶调成糊状, 使其均匀分散后装入 80 \times 10cm 的层析柱, 即可。

将前述真空干燥物 1.2g 溶于氯仿—甲醇—水 (30: 50: 40, V/V/V) 120ml 加入层析柱, 调整流速 5ml/分钟, 用氯仿—甲醇—水 (90: 15: 6, V/V/V) 30L 溶液洗脱, 然后改用氯仿—甲醇—水 (80: 20: 5) 8L 洗脱, 收集后洗脱液 12L, 减压浓缩后用 35L 的 -20 $^{\circ}$ C 预冷丙酮沉淀, -20 $^{\circ}$ C 静止 2 小时, 倾去上层清液, 离心 10 分钟 (1000rpm), 沉淀用适量丙酮洗 2 次, 沉淀真空干燥过夜。

将 1.16g 干燥物溶于 800ml 注射用水, 作为神经节苷脂提取液备用, 浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 1.45mg/ml。

步骤 (3):

将鹿肌肉提取液 800ml 和牛脑神经节苷脂提取液 200ml 混合, 加水注射用水至 2L, 无菌过滤后灌装成 2ml/支, 高压灭菌, 包装入库, 每支含有 6.4mg 多肽、290 μ g 唾液酸、0.4mg 次黄嘌呤。

实施例 3

步骤 (1):

取新鲜兔肌肉 10kg, 加 25L 水匀浆, 匀浆后冷冻, 融化后加热 75 $^{\circ}$ C, 保温 25 分钟, 降温后离心, 离心条件为 3800 转/分, 离心时间为 30 分钟, 保留上清液, 上清液过滤, 得滤液; 在滤液中加入胰蛋白

酶保温水解,胰蛋白酶浓度为 0.2%,水解条件为 pH=8.1~8.4,保温 39~42℃,保温时间为 2 小时;酶解后,酶解液调 pH 值为 3.9-4.0,加热至 85℃,保持 20 分钟,降温后离心,离心条件为 4000 转/分,离心时间为 20 分钟,保留上清液,上清液过滤得滤液。

滤液调 pH 值为 7.2~7.4,加热至 85℃,保持 20 分钟,降温后离心,离心条件为 4000 转/分,离心时间为 20 分钟,保留上清液,上清液过滤,滤液用截留分子量为 6000 的超滤膜超滤,超滤液为肌肉提取液,滤液减压浓缩至 800ml,其中多肽含量为 4mg/ml,其中次黄嘌呤含量为 0.4mg / ml;

步骤 (2):

取 10kg 新鲜马脑用 30L 丙酮匀浆,匀浆液用滤纸过滤,得滤渣 2500g,滤渣用 12.5L 氯仿—甲醇 (20: 1) 混合液抽提三次,分别过滤后合并滤液,使用旋转蒸发器,在 37℃ 减压蒸干,得干燥物 1.25g。干燥物用 20L 氯仿—甲醇混合液 (30: 1, V/V) 溶解,加入 500ml 的 0.1mol/LKCl 溶液。室温搅拌 1 小时,转移到分液漏斗中静置 16 小时。分液后,上相用等体积的氯仿—甲醇—水 (120: 35: 5, V/V/V) 洗 1 次;下相用等体积的氯仿—甲醇—水 (10: 68: 77, V/V/V) 洗 1 次;合并 2 次上相于 37℃ 减压浓缩至约 10L, -20℃ 预冷丙酮沉淀,真空干燥。

层析柱通过如下过程制备: 将硅胶颗粒过筛选 80 目的均匀颗粒,在 110℃ 下干燥 1 小时,使其活化,然后用 5 倍柱体积的氯仿-甲醇 (15: 2, V/V) 混合液作为载体,将硅胶调成糊状,使其均匀分散后装入 80×10cm 的层析柱,即可。

将前述真空干燥物 1.2g 溶于氯仿—甲醇—水 (80: 10: 20, V/V/V) 24ml 加入层析柱,调整流速 5ml/分钟,用氯仿—甲醇—水 (75: 15: 10, V/V/V) 20L 溶液洗脱,然后改用氯仿—甲醇—水 (40: 50: 15) 15L 洗脱,收集后洗脱液 8L,减压浓缩后用 40L 的 -20℃ 预冷丙酮沉淀, -20℃ 静止 2 小时,倾去上层清液,离心 10 分钟 (1000rpm),沉淀用适量丙酮洗 2 次,沉淀真空干燥过夜。

将 1.25g 干燥物溶于 500ml 注射用水,作为神经节苷脂提取液备用,浓度为每 1ml 含神经节苷脂以唾液酸计 2.5mg/ml。

步骤 (3):

将兔肌肉提取液 800ml 和马脑神经节苷脂提取液 200ml 混合,加水注射用水至 2L,无菌过滤后灌装成 2ml/支,高压灭菌,包装入库,每支含有 3.2mg 多肽、500μg 唾液酸、0.32mg 次黄嘌呤。

实施例 4

步骤 (1):

取新鲜鹿肌肉 10kg,加 25L 水匀浆,参照实施例 1 步骤 (1) 制备鹿肌肉提取液备用,其中多肽含量为 1.6mg/ml。超滤液为肌肉提取液,滤液减压浓缩至 800ml,其中多肽含量为 5.4mg/ml,其中次黄嘌呤含量为 0.25mg / ml;

步骤 (2):

取 10kg 新鲜马脑用 45L 丙酮匀浆,参照实施例 1 步骤,制备神经节苷脂提取液备用,浓度为每 1ml 含 1 含神经节苷脂以唾液酸计 10mg/ml。

步骤 (3): 按照实施例 3 的操作,制得注射液。

实施例 5

步骤 (1):

参照实施例 1 步骤 (1), 其中多肽含量为 5mg/ml, 其中次黄嘌呤含量为 0.2mg / ml;

步骤 (2):

取 10kg 新鲜狗脑用 40L 丙酮匀浆, 参照实施例 1 步骤, 制备神经节苷脂提取液备用, 浓度为每 1ml 含 1 含神经节苷脂以唾液酸计 100 μ g /ml。

步骤 (3):

肌肉提取液 800ml 和狗脑神经节苷脂提取液 800ml 混合, 加注射用水至 2L, 无菌 过滤后灌装成 2ml/支, 高压灭菌, 包装入库, 每支含有 4.0mg 多肽、80 μ g 唾液酸、0.16mg 次黄嘌呤。

实施例 6

步骤 (1):

同实施例 1 步骤 (1)。

步骤 (2):

同实施例 1 步骤(2)。取 10kg 新鲜猪脑用 35L 丙酮匀浆, 参照实施例 1 步骤, 制备猪脑神经节苷脂提取液备用, 浓度为每 1ml 含唾液酸 400 μ g 唾液酸。

按照实施例 5 的操作, 制得注射液。

实施例 7

步骤 (1):

同实施例 1 步骤 (1)。

步骤 (2):

取 10kg 新鲜羊脑用 35L 丙酮匀浆, 参照实施例 1 步骤, 制备羊脑神经节苷脂提取液备用, 浓度为每 1ml 含唾液酸 400 μ g 唾液酸。

步骤 (3):

将兔肌肉提取液 2000ml 和羊脑神经节苷脂提取液 250ml 混合, 无菌过滤后灌装成 2ml/支, 高压灭菌, 包装入库, 每支含有 10 mg 多肽、100 μ g 唾液酸、0.4mg 次黄嘌呤。

实施例 7~11

参照实施例 1~9 中步骤 (1) 和 (2), 步骤 (3) 将肌肉提取液和脑神经节苷脂提取液进行混合后, 按本领域技术人员公知的方法, 制成颗粒, 干燥后压制成片, 即得药物组合物的片剂。

实施例 12~21

参照实施例 1~9 中步骤 (1) 和 (2), 步骤 (3) 将肌肉提取液和脑神经节苷脂提取液进行混合后, 加入适宜的赋型剂 (如右旋糖酐 40、甘露醇等), 进行除菌灌装后, 按本领域技术人员公知的方法, 经冷冻干燥制成冻干粉针产品。

实施例 22~28

参照实施例 1~9 中步骤 (1) 和 (2), 步骤 (3) 将肌肉提取液和脑神经节苷脂提取液进行混合后,

加入适量注射用水投入到稀配罐中；在浓配罐中按最终配制总体积的 0.9%加入氯化钠，加入 0.4%活性炭煮沸脱炭过滤，冷却后，将药液过滤至稀配罐中，在稀配罐中补加注射用水至配液量，调 PH 为 7.2~7.5，过滤。灌封于输液瓶中，100℃流通蒸汽灭菌 45 分钟，即得输液产品。

实验例 1

本实验例为本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）外观、pH 值、蛋白质项目的检测。

本发明药物组合物注射液为无色或微黄澄明液体。

按照中国药典 2000 年版二部附录 VI H 测定，本发明药物组合物注射液 pH 值为 6.0-8.0，符合注射液标准。

取本发明药物组合物注射液 1ml，加 20%磺基水杨酸溶液 1ml，没有浑浊产生，说明本发明注射液蛋白质检查符合规定。

实验例 2

本实验例为本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）多肽的定性测定。

取本发明药物组合物注射液 1ml，加茚三酮试液 3 滴，加热，呈紫色，为肽键（-CO-NH-）的特征反应，说明本发明药物组合物注射液含有多肽。

实验例 3

本实验例为本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）神经节苷脂的定性测定。

按照中国药典 2000 年版二部附录 VB 试验，采用薄层色谱法，以单一神经节苷脂 GM1 为对照品，加磷酸盐缓冲液（pH=7.4），制成每 1ml 含 0.2mg 的溶液，作为对照品溶液。分别取本发明药物组合物注射液及对照品溶液各 50ul，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以氯仿—甲醇—0.2%氯化钙溶液（60:45:10，V/V/V）为展开剂，展开后，晾干，喷以间苯二酚溶液，喷后即加玻片封盖（两玻片间需用夹夹紧），120℃加热至斑点清晰，谱图显示本发明药物组合物注射液色谱图主斑点的颜色及位置与对照品色谱图的斑点一致。此实验结果表明，本发明药物组合物注射液中含有神经节苷脂，主要为神经节苷脂 GM1。

实验例 4

本实验例为本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）毒性实验参数：

- 细菌内毒素测定：依照中国药典 2000 年版二部附录 XIE 进行检查，本发明药物组合物注射液每 1ml 中含细菌内毒素的量小于 4EU。
- 异常毒性测定：依照中国药典 2000 年版二部附录 XI C 静脉注射法检查，符合规定。
- 毒性实验测定：LD₅₀ 为 298±79mg/Kg，最大耐受量超过成人用量的 250 倍。
- 长期毒性测定：连续给药三个月观察血、尿指标，病理检查均未见异常。

- 过敏性试验：取体重 250-350g 健康豚鼠 6 只，间日腹腔注射本发明药物组合物注射液 0.5ml，连续 3 次，在第三次注射后的第十四天，自静脉注射本品 1.0ml，注射后 15 分钟内观察动物，均不出现连续干咳、连续前爪抓鼻、明显耸毛、四肢发软、躺卧、呼吸困难、痉挛、虚脱及死亡现象。连续观察 3 天，动物健存。

结论：本发明药物组合物注射液符合注射液要求，无任何毒性作用，应用人体安全。

实验例 5

本实验例为本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）高分子量物质测定：

按照中国药典 2000 年版二部附录 V D 中高效液相色谱法进行测定。

色谱条件与系统适用性试验：用凝胶色谱柱（TSK GEL 2000SWxl 7.8mm*300mm，5um）；流动相为三氟醋酸-乙腈-水（0.05：10：90）；检测波长为 214nm。理论板数按胰岛素峰计算应不得低于 3000。

对照品溶液的制备：取胰岛素（分子量 5800）适量，用流动相制成每 1ml 中含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。

测定法：取对照品溶液和本发明药物组合物注射液各 20ul，分别注入液相色谱仪，记录色谱图 2、3，小于胰岛素峰保留时间的峰面积，按面积归一化法计算，不得超过 4.0%。

该药物组合物注射液通过静脉滴注途径给药，根据专家意见，增加高分子量物质检查。根据三批样品的测定结果，高分子量物质限定为“小于胰岛素峰保留时间的峰面积，按面积归一化法计算，不超过 4.0%”。

实验例 6

本实验例定量测定本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）的多肽含量。

取注射液适量，加水制成每 1ml 中约含 0.15mg 的多肽的溶液，作为供试品溶液，精密量取 1.0ml，照福林酚测定法测定。

按照实施例 1 所述的方法进行小试得到三组产品，测定结果参见下表，多肽含量为标示量的 85—115%。

组	占标示量%
1	107.7
2	104.7
3	109.6

Folin—酚测定法：

试剂 碱性铜溶液 取氢氧化钠 10g，碳酸钠 50g，加水 400ml 使溶解，作为甲液；取酒石酸钾 0.5g，加水 50ml 使其溶解，另取硫酸铜 0.25g，加水 30ml 使其溶解，将两液混合，作为乙液。

临用前，合并甲、乙两液，并加水至 500ml。

操作法 对照品溶液的制备 取牛血清白蛋白对照品，加水制成每 1ml 中含 0.3mg 的溶液。

供试品溶液的制备 照各品种项下规定的方法制备。

标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.1ml、0.3ml、0.5ml、0.7ml、0.9ml，分别置具塞

试管中，各加水至 1.0ml，再分别加入碱性铜试液 1.0ml，摇匀，各加入福林酚试液（取福林试液中的贮备液 1→16）4.0ml，立即混匀，置 55℃水浴中准确反应 5 分钟，置冷水浴 10 分钟，照分光光度法（中国药典 2000 年版二部附录Ⅳ B）在 650nm 的波长处测定吸收度；以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与相应吸收度计算回归方程。

测定法 精密量取供试品溶液 1.0ml，照标准曲线的制备项下的方法，“自加入碱性铜试液”起，依法测定，从回归方程计算多肽的含量，并乘以稀释倍数，即得。

实验例 7

本实验例定量测定本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）的唾液酸含量。

采用间苯二酚测定法测定，唾液酸含量为标示量的 85~115%。参见下表。

组	占标示量%
1	101.9
2	101.9
3	102.2

间苯二酚测定法：

试剂：

- 1、间苯二酚贮存液：取间苯二酚 2g，加水 100ml 溶解，作为贮存液（可 4℃保存数月）。
- 2、硫酸铜溶液（0.1mol/L）：取硫酸铜 2.5g，加水 100ml 溶解，即得。
- 3、间苯二酚溶液：取间苯二酚贮存液 10ml，加硫酸铜溶液 0.25ml，加盐酸 80ml，加水至 100ml。

操作法：

- （1）参比溶液的制备：取唾液酸参比试剂适量，加 0.9%氯化钠溶液制成每 1ml 中含 50 μg 的溶液。
- （2）标准曲线的制备：精密量取参比溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0ml，分别置具塞试管中，各加水至 2.0ml，再分别加入间苯二酚溶液 2.0ml，摇匀，置水浴中反应 15 分钟，取出置冷水中 10 分钟。分别加醋酸正丁酯-正丁醇（85：15）5ml，剧烈振摇后放置 15 分钟。取上层液于 585nm 波长处测定吸收度；同时以 0 管作为空白。以测得的吸收度与对应的浓度计算回归方程，其相关系数应大于 0.995。
- （4）测定法：精密量取本品 2.0ml，照标准曲线的制备项下的方法，自“精密加入间苯二酚溶液”起，依法测定，从回归方程求得供试品溶液的浓度，并乘以稀释倍数，即为唾液酸含量。

实验例 8

本实验例定量测定本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）的次黄嘌呤含量。

采用高效液相色谱法测定，次黄嘌呤含量为标示量的 85~115%。参见下表。

组	占标示量%
1	105.0
2	104.2
3	102.6

高效液相色谱法：

色谱条件与系统适用性试验：用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；磷酸二氢钾（0.001mol/L,pH6.9）

一甲醇（100：0.2）为流动相；检测波长为 260nm，理论板数按次黄嘌呤峰计算应不低于 5000，次黄嘌呤峰与黄嘌呤峰的分离度应符合规定。

对照品溶液的制备：取次黄嘌呤对照品适量，加水制成每 1ml 中含次黄嘌呤 10 μg 的溶液作为对照品溶液。另取次黄嘌呤和黄嘌呤适量加水制成每 ml 中含次黄嘌呤 25 μg 及黄嘌呤 2.5 μg 的溶液，作为系统适用性试验用溶液。

供试品溶液的制备：取本品适量，加水制成每 1 取本品适量，加水制成每 1ml 中含次黄嘌呤 10 μg 的溶液作为对照品溶液。

测定法：取系统适用性试验用溶液 20 μl 注入液相色谱仪中，记录色谱图，计算分离度应符合规定。另取对照品溶液、供试品溶液各 20 μl 分别注入液相色谱仪中，记录色谱图，按外标法以峰面积计算。

实验例 9

本实验例定性测定本发明本发明最优选药物组合物小容量注射液（实施例 1，每 ml 含 3.2mg 多肽、50 μg 唾液酸、0.125mg 次黄嘌呤）的次黄嘌呤。

本法按次黄嘌呤含量测定项下方法测定，记录色谱图，次黄嘌呤峰的保留时间应与对照品峰的保留时间相同。根据三批样品检测，次黄嘌呤峰的保留时间与对照品峰的保留时间相同。

取本品 1ml，加丙酮数毫升，应产生白色混浊。

比较例 1

本比较例说明本发明实施例 1 所述药物组合物治疗脑血管病(脑卒中)的临床效果优于脑复素注射液(吉林大学白求恩制药厂)。

1、资料与方法

采用盲目随机对照分为治疗组和对照组各 36 例。

治疗组（实施例 1 注射液）23 例，女 13 例，年龄 40-75 岁，平均 56 岁。

对照组（脑复素注射液）24 例，女 12 例，年龄 40-80 岁，平均 61 岁。

2、结果

治疗组在治疗后神经体征明显改善（ $p < 0.05$ ），而对照组改善不明显（ $p > 0.05$ ），证明治疗组效果优于对照组。

治疗中未见近期副反应及并发症。

3、讨论：

研究结果表明，从治疗结束时神经功能缺损积分减少数结果看，经统计学处理，治疗组效果优于对照组（ $p > 0.05$ ），在从临床疗效比较，治疗组有效率为 87%，对照组有效率为 21%，经 χ^2 检验治疗组疗效明显高于对照组（ $p < 0.01$ ），以上结果证明本发明药物组合物注射液对脑血管病有明显疗效，并使死亡率明显降低。

比较例 2

本比较例说明在治疗老年性急性脑卒中，本发明药物组合物注射液疗效优于专利申请 CN03137463.8 实施例 1 所述的注射液以下简称（对照产品 1）。

1、对象：所有人选病例均按中华医学会第2次脑血管学术会议制定的标准，经详细询问病史，神经系统检查及头颅CT和（或）MR检查确诊。所有病人均为首次发病，按改良爱丁堡斯堪的纳维亚（改良SSS评分），疾病程度为中、重度，均未给予溶栓治疗，因经济问题未完成治疗疗程的不参与评价。治疗组36例，男22例，女14例，平均年龄72岁（54-82岁），其中脑梗塞20例，脑出血11例，蛛网膜下腔出血5例；随机选择以往用脑苷肌肽注射液治疗的患者30例为对照组，男21例，女9例，平均年龄76岁（62-90岁），其中脑梗塞18例，脑出血10例，蛛网膜下腔出血2例。两组基线资料有可比性。

2、治疗方法：

治疗组：本发明药物组合物注射液一次10-20ml加入300ml氯化钠注射液或5%葡萄糖注射液中，每日1次，缓慢滴注，维持4-6周。

对照组：对照产品1，每次20ml，每日1次，15天为一疗程，一般用2个疗程以上。

对两组患者伴有糖尿病及高血压者给予相应对症治疗。治疗组治疗前后均检查肝肾功能、血常规及心电图。

3、疗效评定：根据改良SSS评分法，对入院时和出院时患者的神经功能损伤进行评价。

基本痊愈：SSS评分减少90%以上；

显著进步：SSS评分减少46-89%；

进 步：SSS评分减少18-45%；

无 变 化：SSS评分变化在18%以下；

恶 化：SSS评分增加大于18%。

4、结果：

治疗组治疗前后，肝肾功能、血常规及心电图无明显变化。

两组疗效见表9：

组别	例数	基本痊愈	显数	进步	无变化	恶化	显效率	有效率
治疗组	36	5 (13.9)	20 (55.6)	9 (25)	2 (5.5)	0	25 (69.5) *	34 (94.5) **
对照组	30	3 (10.0)	16 (53.3)	8 (26.7)	3 (10.0)	0	19 (63.3)	27 (90.0)

以上说明在治疗老年性急性脑卒中，本发明药物组合物注射液疗效优于含有多肽和神经节苷脂的注射液。