



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101797307 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 201010146367.6

(22) 申请日 2010.04.09

(71) 申请人 广州中医药大学

地址 510405 广东省广州市番禺区大学城外
环东路 232 号

(72) 发明人 林朝展 祝晨蓁

(74) 专利代理机构 广州市天河庐阳专利事务所
44244

代理人 胡济元

(51) Int. Cl.

A61K 36/85(2006.01)

A61K 31/7032(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61K 127/00(2006.01)

A61K 135/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种含苯乙醇苷的枇杷叶紫珠提取物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种含苯乙醇苷的枇杷叶紫珠提取物,该提取物的主要成分为苯乙醇苷类化合物,是用水或 50 ~ 75 % (v/v) 的乙醇回流提取马鞭草科紫珠属枇杷叶紫珠 (Callicarpakochiana) 茎叶所得的提取液用大孔树脂纯化得到,其中含有 40 ~ 55 % (w/w) 的连翘酯苷和 10 ~ 30 % (w/w) 的毛瑞花糖苷。经动物实验发现,本发明所述的提取物对正常小鼠以及多种记忆损伤模型动物均有增强或改善学习记忆的功能,可用于制备治疗老年性痴呆症的药物,尤其是治疗血管性痴呆症 (Vascular Dementia, VD) 的药物。

1. 一种含苯乙醇苷的枇杷叶紫珠提取物,该提取物中含有 40 ~ 55% (w/w) 的连翘酯苷和 10 ~ 30% (w/w) 的毛瑞花糖苷;所述的提取物是由以下方法制备得到的:

(1) 取枇杷叶紫珠的茎叶粗粉,用第一极性溶剂提取 2 ~ 3 次,每次加 10 ~ 30 倍体积第一极性溶剂,在常压下加热回流提取 1.0 ~ 1.5 小时,滤出提取液;合并提取液,减压浓缩至比重 1.10 ~ 1.20 (50℃),加乙醇至含醇量达 60% (v/v),冷藏 12 小时,滤去不溶物后减压浓缩至无醇味,然后在 5 ~ 20℃ 下,1000 ~ 3000rpm 高速离心,分离出上清液;

(2) 取上清液,以 0.5 ~ 2BV/h 的流速加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中,待吸附饱和后,先用 5 ~ 10BV 第二极性溶剂以 0.5 ~ 2BV/h 的流速洗脱,再用第三极性溶剂进行洗脱,收集第三极性溶剂的洗脱液,浓缩,干燥即得;

上述步骤中,所述第一极性溶剂是水或 50 ~ 75% (v/v) 乙醇;第二极性溶剂为水;第三极性溶剂是 20 ~ 30% (v/v) 甲醇或 30 ~ 40% (v/v) 乙醇。

2. 如权利要求 1 所述提取物,其特征在于所述的提取物中还含有不超过提取物总质量 5% (w/w) 的以下成分:cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomisideA、luteosideB、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside。

3. 权利要求 1 或 2 所述提取物的制备方法,该方法由以下步骤组成:

(1) 取枇杷叶紫珠的茎叶粗粉,用第一极性溶剂提取 2 ~ 3 次,每次加 10 ~ 30 倍体积第一极性溶剂,在常压下加热回流提取 1.0 ~ 1.5 小时,滤出提取液;合并提取液,减压浓缩至比重 1.10 ~ 1.20 (50℃),加乙醇至含醇量达 60% (v/v),冷藏 12 小时,滤去不溶物后减压浓缩至无醇味,然后在 5 ~ 20℃ 下,1000 ~ 3000rpm 高速离心,分离出上清液;

(2) 取上清液,以 0.5 ~ 2BV/h 的流速加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中,待吸附饱和后,先用 5 ~ 10BV 第二极性溶剂以 0.5 ~ 2BV/h 的流速洗脱,再用第三极性溶剂进行洗脱,收集第三极性溶剂的洗脱液,浓缩,干燥即可;

上述步骤中,所述第一极性溶剂是水或 50 ~ 75% (v/v) 乙醇;第二极性溶剂为水;第三极性溶剂是 20 ~ 30% (v/v) 甲醇或 30 ~ 40% (v/v) 乙醇。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中第一溶剂提取的次数为 2 次,第一次提取 1.5 小时,第二次提取 1.0 小时,所述的第一溶剂为水。

5. 权利要求 1 或 2 所述提取物在制备治疗老年性痴呆药物中的应用。

一种含苯乙醇苷的枇杷叶紫珠提取物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及治疗神经系统疾病的药物,特别是治疗老年性痴呆症的药物。

背景技术

[0002] 随着世界人口老龄化的不断加剧,与衰老有关的许多疾病如神经退行性疾病正严重影响着人们的健康和生活质量。血管性痴呆 (Vascular Dementia, VD) 是老年痴呆症的一种类型。国外研究表明,随着年龄的增长,VD 的发病率呈上升趋势,在欧洲和美国 VD 是仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的最常见的痴呆,约占所有痴呆的 10%~50%。研究表明,血管性痴呆是唯一一类可治疗和预防的痴呆。由于发病机制的多样化,药物治疗疗效有限且差异较大,临床化学药物还存在一定的不良反应。研究显示,天然药物在防治 VD 方面具有独特的优势,尤其是单味中药或其有效部位、有效成分在用于 VD 防治时,具有选择性高、针对性强等特点,不仅能够从多途径、多靶点对 VD 进行干预,而且副作用少。因此开发和研究具有防治 VD 的天然药物具有广阔的前景。

[0003] 近年来,韩国学者开始系统研究紫珠属植物的化学成分和药理活性,从紫珠属植物白棠子树 (*C. dichotoma*) 分离出包括连翘酯苷 (forsythosides B) 和毛瑞花糖苷 (acteoside) 在内的 10 种苯乙醇苷类化合物,并发现这些成分对胱氨酸诱导的大鼠大脑皮层细胞损伤的保护作用;文中还介绍了所述 10 种苯乙醇苷类化合物是采用下述分离方法得到:8.5Kg 干燥白棠子树的茎叶用 70% 甲醇提取,得到 780g 提取物,然后经正己烷、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分馏,得到正丁醇分馏产物 360g;正丁醇分馏产物经 Amberlite XAD-2 分离 (H_2O -MeOH 洗脱) 得到 A-1 ~ A-10 十个组分;取 A-3 (20g) 经 ODS gel column (500g, 8×60 cm, H_2O -MeOH 洗脱) 和 repeated semi-preparative HPLC (Microsorb C_{18} 80-299, 10×250 mm) 分离出 10 个苯乙醇苷类化合物,其中连翘酯苷 15mg,毛瑞花糖苷 78mg (Koo KA, et al. *Planta Med*, 2005, 71 (8): 778 ~ 780.)。另有文献对其中的毛瑞花糖苷 (acteoside) 的药理作用做了进一步研究,发现其对东莨菪碱诱导的记忆障碍具有改善作用 (Ki Yong Lee, *Biol. Pharm. Bull*, 2006, 29 (1): 71 ~ 74.)。尽管上述文献报道了从紫珠属植物中提取出可能具有治疗老年痴呆潜力的苯乙醇苷类化合物,但从 Koo KA 的报道中可以看出,其提取方法的苯乙醇苷类化合物得率极低,360g 的正丁醇分馏物 (植物用量为 8.5kg) 中只提取到连翘酯苷 15mg、毛瑞花糖苷 78mg,其他几类化合物也均是毫克级别的产量,难以产业化。因此, Koo KA 所公开方法的分离纯化方法必须进行改进,否则尽管用 70% 甲醇提取可能将药材中所含苯乙醇苷类化合物基本溶出,但其浓度无法达到临床上可接受的要求。此外, Koo KA 所公开的方法还存在有机溶剂毒副作用大和用量大等不足。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种枇杷叶紫珠提取物。

[0005] 本发明解决上述问题的技术方案是:

[0006] 一种含苯乙醇苷的枇杷叶紫珠提取物,该提取物中含有 40 ~ 55% (w/w) 的连翘酯苷和 10 ~ 30% (w/w) 的毛瑞花糖苷;所述的提取物是由以下方法制备得到的:

[0007] (1) 取枇杷叶紫珠的茎叶粗粉,用第一极性溶剂提取 2 ~ 3 次,每次加 10 ~ 30 倍体积第一极性溶剂,在常压下加热回流提取 1.0 ~ 1.5 小时,滤出提取液;合并提取液,减压浓缩至比重 1.10 ~ 1.20 (50℃),加乙醇至含醇量达 60% (v/v),冷藏 12 小时,滤去不溶物后减压浓缩至无醇味,然后在 5 ~ 20℃ 下,1000 ~ 3000rpm 高速离心,分离出上清液;

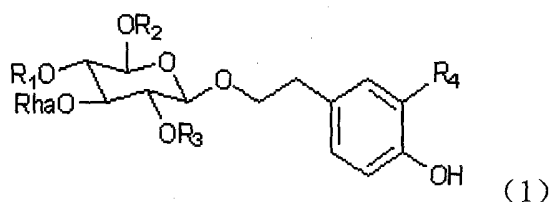
[0008] (2) 取上清液,以 0.5 ~ 2BV/h 的流速加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中,待吸附饱和后,先用 5 ~ 10BV 第二极性溶剂以 0.5 ~ 2BV/h 的流速洗脱,再用第三极性溶剂进行洗脱,收集第三极性溶剂的洗脱液,浓缩,干燥即得;

[0009] 上述步骤中,所述第一极性溶剂是水或 50 ~ 75% (v/v) 乙醇;第二极性溶剂为水;第三极性溶剂的极性比第二极性溶剂低,可以是 20 ~ 30% (v/v) 甲醇或 30 ~ 40% (v/v) 乙醇。

[0010] 本发明所述提取物还含有 cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomioside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside,其总含量不超过所述提取物总质量的 5%。

[0011] 为了方便理解本发明提取物中的成分,所述提取物中的主要成分苯乙醇苷类化合物可用通式 (1) 表示:

[0012]

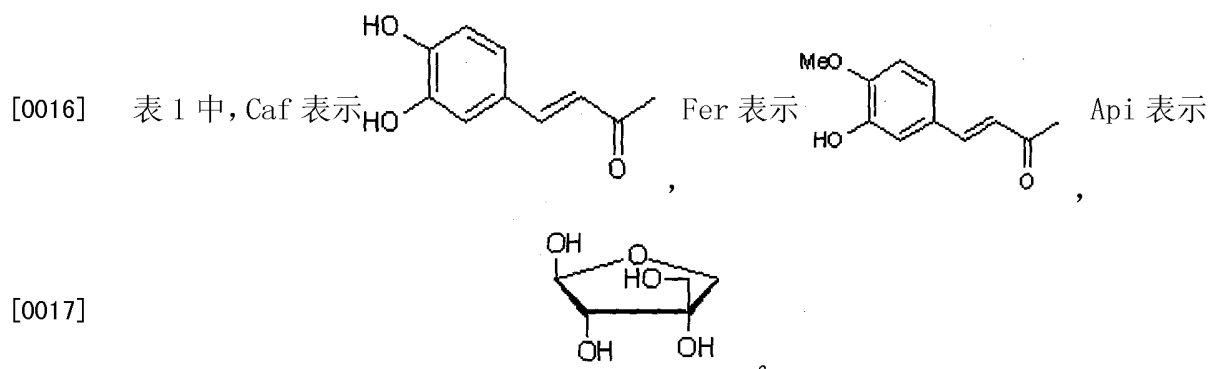


[0013] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 的结构分别如表 1 所示:

[0014] 表 1

[0015]

Compound Name	R_1	R_2	R_3	R_4
Luteoside B	H	Caf	Api	OH
Luteoside C	H	Fer	Api	OH
Syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside	Caf	H	H	H
Cistanoside D	Fer	H	H	OMe
Lamiophlomioside A	Fer	Api	H	OMe
Acteoside	Caf	H	H	OH
Forsythosides B	Caf	Api	H	OH
Cistanoside C	Caf	H	H	OMe
isoacteoside	H	Caf	H	OH



[0018] 本发明所述提取物可由以下方法制备得到：

[0019] (1) 取枇杷叶紫珠的茎叶粗粉,用第一极性溶剂提取 2 ~ 3 次,每次加 10 ~ 30 倍体积第一极性溶剂,在常压下加热回流提取 1.0 ~ 1.5 小时,滤出提取液;合并提取液,减压浓缩至比重 1.10 ~ 1.20 (50℃),加乙醇至含醇量达 60% (v/v),冷藏 12 小时,滤去不溶物后减压浓缩至无醇味,然后在 5 ~ 20℃ 下,1000 ~ 3000rpm 高速离心,分离出上清液;

[0020] (2) 取上清液,以 0.5 ~ 2BV/h 的流速加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中,待吸附饱和后,先用 5 ~ 10BV 第二极性溶剂以 0.5 ~ 2BV/h 的流速洗脱,再用第三极性溶剂进行洗脱,收集第三极性溶剂的洗脱液,浓缩,干燥即得。该第三极性溶剂与第二极性溶剂相比,极性较低;

[0021] 上述步骤中,所述第一极性溶剂是水或 50 ~ 75% (v/v) 乙醇;第二极性溶剂为水;第三极性溶剂的极性比第二极性溶剂低,可以是 20 ~ 30% (v/v) 甲醇或 30 ~ 40% (v/v) 乙醇。

[0022] 本发明方法中,

[0023] 步骤 (1) 的最佳提取条件为:用水提取 2 次,每次加 30 倍水,分别提取 1.5 小时和 1 小时;

[0024] BV 表示倍柱体积,BV/h 表示倍柱体积每小时。

[0025] 本发明人抛开了现有技术中提取紫珠植物中苯乙醇苷类化合物的方法(即甲醇提取+正丁醇分馏),采用 3 种极性较强的溶剂按一定顺序提取结合大孔树脂纯化的方式,从枇杷叶紫珠获得苯乙醇苷类化合物含量极高(总含量可达 50 ~ 85%)的提取物,该提取物不必经进一步的分离纯化为纯物质即具有显著的治疗老年性痴呆症的疗效。此外,本发明方法简便,提取率高,提取溶剂无毒害,有利于工业化生产。

[0026] 经动物实验证实,本发明所述的提取物对正常小鼠以及多种记忆损伤模型动物均有增强或改善学习记忆的功能,可用于制备治疗老年性痴呆症的药物,尤其是治疗血管性痴呆症(Vascular Dementia, VD)的药物。所述药物可以是肠溶胶囊、软胶囊、滴丸、分散片、颗粒剂等。

[0027] 以下通过具体实验来进一步说明本发明的有益效果:

[0028] 1、本发明提取物对正常小鼠学习记忆功能的影响

[0029] (1) 昆明种小鼠,按一下分组进行跳台试验和避暗试验:

[0030] 空白对照组:不给予任何药物。

[0031] 阳性对照组:以吡拉西坦片(Piracetam)为阳性对照药,灌胃给药,每天一次,连续灌服 7 天。

[0032] 本发明提取物高剂量组 : 按 $200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药, 连续灌服 7 天。

[0033] 本发明提取物低剂量组 : 按 $100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药, 连续灌服 7 天。

[0034] (2) 实验方法

[0035] 跳台实验方法 : 末次给药后次日开始训练。将动物放入反应箱适应环境 3min, 然后立即通以 36V 连续电流刺激 5min, 小鼠受到电击后正常逃避反应是跳上橡皮台。小鼠双足同时接触铜栅为触电, 视为错误反应。多数动物可能再次或多次跳到铜栅上, 受到电击又迅速跳回到橡皮台上。如此训练 5min, 并记录每鼠 5min 内受到电击的次数, 以此评价学习成绩。24h 后重复测验, 将小鼠放在跳台上并开始计时, 记录动物第一次跳下平台的潜伏期 (若超过 3min 则按 3min 计算), 同时记录 3min 内的错误反应次数, 以此评价记忆保持成绩。

[0036] 避暗实验方法 : 实验开始时将小鼠头部背向洞口放入明室, 同时开始计时, 动物穿过洞口进入暗室受到电击, 立即停止计时, 取出小鼠, 记录每只小鼠从放入明室至进入暗室受到电击所需的时间, 此即为潜伏期, 以此评价学习成绩。24h 后重做测试, 记录潜伏期和 5min 内的电击次数, 以此评价记忆保持成绩。

[0037] (3) 实验结果 : 各给药组与对照组对正常小鼠学习记忆的影响结果参见图 1 ~ 4。

[0038] 由图 1 和图 2 可知, 与空白对照组相比, 本发明提取物的高剂量组 ($200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, HPC)、低剂量组 ($100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, LPC) 均能明显减少小鼠学习记忆的错误数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 延长潜伏期 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 学习记忆保持能力都有显著的提高, 吡拉西坦 $500\text{mg}/\text{kg}$ 剂量组对正常小鼠跳台错误数有显著的减少作用 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 本发明提取物的高、低剂量组在跳台实验中均能明显提高正常小鼠的学习记忆能力。由图 3 和图 4 可知, 与空白对照组相比, 只有本发明提取物的高剂量组具有明显减少正常小鼠进入暗箱的次数 ($P < 0.05$) 和延长小鼠进入暗箱的潜伏期 ($P < 0.05$) 的作用, 其他组别对正常小鼠的学习记忆成绩无显著性影响。

[0039] 2、本发明提取物对 30% 乙醇诱导的小鼠记忆再现缺失的保护作用

[0040] (1) 昆明种小鼠, 除空白对照组外, 其余各组用 30% 乙醇诱导的小鼠记忆再现缺失, 然后分为以下 4 个实验组 :

[0041] 模型对照组 : 不给予任何药物。

[0042] 阳性对照组 : 以吡拉西坦片 (Piracetam) 为阳性对照药, 灌胃给药, 每天一次, 连续灌服 7 天。

[0043] 本发明提取物高剂量组 : 按 $200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药, 连续灌服 7 天。

[0044] 本发明提取物低剂量组 : 按 $100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药, 连续灌服 7 天。

[0045] (2) 实验方法 : 与实验 1 相同。

[0046] (3) 实验结果 : 各给药组与对照组对 30% 乙醇诱导的小鼠记忆再现缺失的保护作用结果参见图 5 ~ 8。

[0047] 由图 5 和图 6 可知, 模型组与空白对照组相比, 逃避潜伏期显著缩短, 记忆保持能力显著降低, 表明造成了记忆再现障碍, 30% 乙醇所致的小鼠记忆损伤模型复制成功。给药后, 对本发明提取物的高剂量组 ($200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, HPC)、低剂量组 ($100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, LPC) 与模型组进行观察比较, 结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$) 和延长潜伏期 ($P < 0.01$), 提高学习记忆保持能力。吡拉西坦组对小鼠跳台错误数有显著的减少作用 ($P < 0.01$), 同时延长小鼠进入暗箱潜伏期 (P

< 0.01)。实验结果显示,本发明提取物能显著地拮抗由 30%乙醇造成的小鼠记忆再现障碍。由图 7 和图 8 可知,模型组与空白对照组相比,错误次数明显增多,逃避潜伏期显著缩短,记忆保持能力显著降低,造成了记忆再现障碍,表明乙醇所致的小鼠记忆损伤模型复制成功。给药后,对本发明提取物的高、低剂量组与模型组进行观察比较,结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$) 和延长潜伏期 ($P < 0.01$),提高学习记忆保持能力。吡拉西坦组对小鼠跳台错误数有显著的减少作用 ($P < 0.01$),同时延长小鼠进入暗箱潜伏期 ($P < 0.01$)。实验结果显示,本发明提取物能显著地拮抗由 30%乙醇造成的小鼠记忆再现障碍,较高剂量组的作用效果较为显著,且优于阳性对照药。

[0048] 3、本发明提取物对 NaNO_2 致小鼠记忆巩固障碍的影响

[0049] (1) 昆明种小鼠,除空白对照组外,其余各组用 NaNO_2 诱导的小鼠记忆巩固障碍,然后分为以下 4 个实验组:

[0050] 模型对照组:不给予任何药物。

[0051] 阳性对照组:以吡拉西坦片 (Piracetam) 为阳性对照药,灌胃给药,每天一次,连续灌服 7 天。

[0052] 本发明提取物高剂量组:按 $200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药,连续灌服 7 天。

[0053] 本发明提取物低剂量组:按 $100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药,连续灌服 7 天。

[0054] (2) 实验方法:与实验 1 相同。

[0055] (3) 实验结果:各给药组与对照组对 NaNO_2 诱导的小鼠记忆巩固障碍的影响结果参见图 9 ~ 12。

[0056] 由图 9 和图 10 可知,模型组与空白对照组相比,错误次数明显增多,潜伏期显著缩短,造成了记忆巩固障碍,表明 NaNO_2 所致的小鼠记忆巩固障碍模型复制成功。给药后,对本发明提取物的高剂量组 ($200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, HPC)、低剂量组 ($100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, LPC) 与模型组进行观察比较,结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),延长潜伏期 ($P < 0.01$),学习记忆巩固能力有显著的提高。吡拉西坦 $500\text{mg}/\text{kg}$ 剂量组对小鼠跳台错误数有显著的减少作用 ($P < 0.05$),同时延长小鼠进入暗箱潜伏期 ($P < 0.01$)。

[0057] 由图 11 和图 12 可知,模型组与空白对照组相比,错误次数明显增多,潜伏期显著缩短,造成了记忆巩固障碍,表明 NaNO_2 所致的小鼠记忆巩固障碍模型复制成功。给药后,对本发明提取物的高、低剂量组与模型组进行观察比较,结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$),延长潜伏期 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),学习记忆能力有显著的提高,且高剂组作用强度超过吡拉西坦组 ($P < 0.05$)。实验结果显示,本发明提取物的高、低剂量组均能明显地对抗由 NaNO_2 诱导的小鼠记忆巩固障碍,且高剂量组作用比低剂量组效果更明显。

[0058] 4、本发明提取物对东莨菪碱诱导的小鼠记忆获得障碍的影响

[0059] (1) 昆明种小鼠,除空白对照组外,其余各组用东莨菪碱诱导的小鼠记忆获得障碍,然后分为以下 4 个实验组:

[0060] 模型对照组:不给予任何药物。

[0061] 阳性对照组:以吡拉西坦片 (Piracetam) 为阳性对照药,灌胃给药,每天一次,连

续灌服 7 天。

[0062] 本发明提取物高剂量组：按 $200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药，连续灌服 7 天。

[0063] 本发明提取物低剂量组：按 $100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 本发明提取物灌胃给药，连续灌服 7 天。

[0064] (2) 实验方法：与实验 1 相同。

[0065] (3) 实验结果：各给药组与对照组对东莨菪碱诱导的小鼠记忆获得障碍的影响结果参见图 13 ~ 16。

[0066] 由图 13 和图 14 可知，模型组与空白对照组相比，错误次数明显增多，潜伏期显著缩短，造成了记忆获得性障碍，表明东莨菪碱所致的小鼠记忆障碍模型复制成功。给药后，对本发明提取物的高剂量组 ($200\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, HPC)、低剂量组 ($100\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, LPC) 与模型组进行观察比较，结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$)，延长潜伏期 ($P < 0.01$)，学习记忆能力有显著的提高。吡拉西坦 $500\text{mg}/\text{kg}$ 剂量组对小鼠跳台错误数有显著的减少作用 ($P < 0.05$)，同时延长小鼠进入暗箱潜伏期。实验结果显示，本发明提取物的高、低剂量组均能明显地对抗由东莨菪碱诱导的小鼠记忆获得性障碍。

[0067] 由图 15 和图 16 可知，模型组与空白对照组相比，错误次数明显增多，潜伏期显著缩短，造成了记忆获得性障碍，表明东莨菪碱所致的小鼠记忆获得障碍模型复制成功。给药后，对本发明提取物的高、低剂量组与模型组进行观察比较，结果显示本发明提取物的高、低剂量组均能显著性减少小鼠学习记忆的错误次数 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，延长潜伏期 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，学习记忆能力有显著的提高，且高剂组作用强度超过吡拉西坦组 ($P < 0.05$)。实验结果显示，本发明提取物的高、低剂量组均能明显地对抗由东莨菪碱诱导的小鼠记忆获得性障碍，并呈现一定的量效关系。

[0068] 5、本发明提取物对大脑中动脉梗死 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型大鼠学习记忆行为能力及脑和血清中生化指标活性的影响

[0069] 本实验采用大脑中动脉梗死 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 法制作 VD 大鼠模型，观察本发明提取物对模型大鼠学习记忆行为能力及脑和血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 含量、单胺氧化酶 (MAO-B) 活性和乙酰胆碱酯酶活性的影响。

[0070] 5.1 实验材料

[0071] 实验材料：手术剪（直、弯）、微动脉夹、显微手术镊、尼龙线、手术缝线、缝合针、孔巾、手术固定板、Morris 水迷宫及玻璃平台、电动离心机、玻璃匀浆器、电热恒温水浴箱、托盘式扭力天平。水合氯醛（广东省医学实验动物中心制备），SOD、MDA、MAO-B、AChE 测定试剂盒，均为南京建成生物工程研究所产品。本发明提取物的冻干品，实验时用双蒸水配成浓度为 $0.05\text{g}/\text{mL}$ 的混悬液，喜德镇（天津华津制药厂与北京诺华制药有限公司合作生产，批号：080917），用前用双蒸水经超声细胞粉碎机制成浓度为 $0.625\text{mg}/\text{mL}$ 的混悬液，药物配制后置 4°C 冰箱保存备用，用前摇匀。

[0072] 5.2 动物及分组

[0073] SD 健康大白鼠 60 只，雌雄各半，体重 $200\text{g} \sim 220\text{g}$ （广东省医学实验动物中心供给，合格证号：No. 0010256），实验条件下自然饮食，适应环境一周后进行实验。分为 6 组，即含苯乙醇苷的制剂高、低剂量组，喜德镇组，模型组，假手术组和正常组各 10 只。

[0074] 5.3 模型制备及动物处理

[0075] 采用改良线栓法制成大脑中动脉梗死模型：大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射 (0.35mL/100g) 麻醉后, 将其仰卧固定, 以络合碘消毒颈部皮肤, 行颈部右侧切口, 于胸骨舌骨肌与胸骨甲状肌间分离出右颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA), 并挂线备用, 结扎 ECA 与 CCA, 用微动脉夹夹闭 ICA 远心端后, 迅速于 ECA 与 ICA 分叉处作一切口, 从切口处插入一端加热成光滑球形尼龙线 (直径为 0.25mm, 距球端 2cm 处作标记)。线插入 ICA 后, 于入口处稍稍结扎尼龙线与入口处 ICA 段, 然后松开夹闭 ICA 的动脉夹, 继续插入尼龙线至稍有阻力后略回撤, 至线插入深度为 18mm ~ 20mm, 实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。再次结扎入口处, 尼龙线外留约 3cm, 缝合皮肤。2h 后轻轻提拉所留线头至有阻力, 实现大脑中动脉再灌, 则造模完成。正常组大鼠不作任何手术处理。假手术组只结扎 ECA 与 ICA。取造模成功的大鼠随机分为模型组、含苯乙醇苷的制剂组和西药组均 10 只。含苯乙醇苷的制剂高、低剂量组分别给予灌胃 (200、100mg · kg · d⁻¹), 西药组给予喜德镇灌胃 (0.625mg · kg · d⁻¹), 模型组、假手术组和正常组均给予蒸馏水 1mL/100g 灌胃。术后第 1 天即用药, 每日灌胃 1 次, 连续给药 21d 后, 进行行为学测试, 然后取脑测定相应指标。

[0076] 5.4 相关指标检测

[0077] 用 Morris 水迷宫训练, 该训练包括隐匿平台搜索实验和探索实验。动物熟悉平台两次后, 每只动物每天上下午各训练 1 次, 连续训练 5d, 分别得到潜伏期数据和探索实验数据, 该数据反映动物的学习与记忆能力。为排除感觉或运动功能障碍对空间学习记忆的影响, 最后进行可见平台实验。行为学测试后, 将动物断头, 冰盘上快速取脑, 弃去嗅球和小脑, 称量海马组织 100mg 左右, 用预冷的生理盐水制成 1% 匀浆, 3000r/min 离心 10min, 取上清液, 4℃ 保存备测, 严格按试剂盒说明书测定 SOD 活力、MDA 含量、MAO-B (机体衰老正相关酶) 活性和 AchE (乙酰胆碱酯酶) 活性。

[0078] 5.5 统计学处理

[0079] 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验结果采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理, 组间差异的显著性用方差分析法检验, 组间两两比较用 t 检验。

[0080] 5.6 实验结果

[0081] 5.6.1 行为学检测结果

[0082] 结果如表 2 所示。表 2 的结果显示, 在 Morris 水迷宫隐匿平台搜索实验中, 与正常组相比, 含苯乙醇苷的制剂高、低剂量组、阳性对照组和模型组的逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$), 而以模型组的逃避潜伏期最长 ($P < 0.05$), 假手术组与正常组相比较无统计学意义 ($P > 0.05$); 探索实验结果中, 正常组和假手术组动物的平均穿越次数最多, 含苯乙醇苷的制剂组和阳性对照组动物穿越次数多于模型组 ($P < 0.05$); 在可见平台实验中, 5 组动物的逃避潜伏期没有明显的组间差异。

[0083] 表 2 本发明提取物对大鼠水迷宫实验的测定结果

[0084] ($\bar{x} \pm s$) (n = 10, mean ± S. D.)

[0085]

组别	隐匿平台搜索实验 (s)	探索实验 (/min)	可见平台实验 (s)
正常组	7.7±3.5 [#]	16.4±5.5 [#]	11.9±4.5
假手术组	8.8±4.1 [#]	14.9±3.8 [#]	11.7±2.4
模型组	29.7±8.6 [*]	4.6±0.8 [*]	12.2±3.9
制剂高剂量组	16.7±5.3 ^{*#}	10.2±2.6 ^{*#}	12.5±3.5
制剂低剂量组	21.3±3.5 ^{*#}	8.4±2.5 ^{*#}	10.7±4.4
阳性对照组	20.6±6.5 ^{*#}	8.8±2.2 ^{*#}	11.5±3.5

[0086] 注：与正常组比较，*P < 0.05；与模型组比较，[#]P < 0.05。

[0087] 5.6.2 对大鼠血清和脑匀浆中 MDA 和 SOD 活性的影响

[0088] 结果如表 3 和 4 所示。从表 3 可以看出，与正常组比较，模型组大鼠血清和脑中 MDA 含量显著提高 (P < 0.05)，痴呆大鼠在给予本发明提取物后血清及脑中 MDA 的含量均有不同程度的降低，其中高剂量组对血清中 MDA 抑制率高于低剂量组，且均优于阳性对照组。

[0089] 表 3 本发明提取物对血管性痴呆大鼠血清和脑中 MDA 含量的影响

[0090] (n = 10, mean ± S. D.)

[0091]

组别	MDA (nmol/ml) / Rate of inhibition (%)			
	Serum		Brain	
正常组	26.7±1.5 [#]	42.8 [#]	328.4±5.5	28.2
假手术组	33.8±3.3 [#]	38.4 [#]	345.9±3.8	23.6
模型组	46.7±7.6 [*]	-	444.6±0.8 [*]	-
本发明提取物高剂量组	25.8±4.3 ^{*#}	62.1 ^{*#}	356.2±2.6 ^{*#}	29.7 ^{*#}
本发明提取物低剂量组	27.3±5.2 ^{*#}	57.2 ^{*#}	372.4±2.5 ^{*#}	25.1 ^{*#}
阳性对照组	26.4±4.5 ^{*#}	33.9 ^{*#}	403.6±2.2 ^{*#}	22.9 ^{*#}

[0092] 注：与正常组比较，*P < 0.05；与模型组比较，[#]P < 0.05。

[0093] 从表 4 可以看出，与正常组比较，模型组大鼠血清和脑中 SOD 活性显著降低 (P < 0.05)，痴呆大鼠在给予本发明提取物后血清及脑中 SOD 活性均显著提高，高、低剂量组对血清中 SOD 提高率在 100% 以上，且均优于阳性对照组。

[0094] 表 4 本发明提取物对血管性痴呆大鼠血清和脑中 SOD 活性的影响

[0095] (n = 10, mean ± S. D.)

组别	Activity of SOD (nU/ml) / Rate of inhibition (%)			
	Serum		Brain	
正常组	83.7±12.3 [#]	50.2 [#]	45.5±5.2 [#]	49.3 [#]
假手术组	78.8±13.8 [#]	36.2 [#]	44.3±4.6 [#]	23.6 [#]
模型组	65.3±7.6 [*]	-	28.6±6.8	-
本发明提取物高剂量组	93.8±13.6 ^{*#}	114.3 ^{*#}	56.3±7.6 ^{*#}	117.7 ^{*#}
本发明提取物低剂量组	93.3±15.4 ^{*#}	110.9 ^{*#}	50.4±6.4 ^{*#}	96.3 ^{*#}
阳性对照组	83.4±14.3 ^{*#}	33.9 ^{*#}	40.5±6.6 ^{*#}	43.8 ^{*#}

[0096]

[0097] 注：与正常组比较，* $P < 0.05$ 与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。

[0098] 5.6.3 对大鼠脑中 MAO-B 活性的影响

[0099] 结果如表 5 所示，与正常组比较，模型组大鼠脑中 MAO-B 的活性明显提高 ($P < 0.05$)。痴呆大鼠在给予本发明提取物后，脑中 MAO-B 活性均显著降低 ($P < 0.05$)，高、低剂量组对脑中 MAO-B 抑制率在 60% 以上，且均优于阳性对照组。

[0100] 表 5 本发明提取物对血管性痴呆大鼠脑中 MAO-B 活性的影响

[0101] ($n = 10$, mean \pm S. D.)

组别	Brain	
	Activity of MAO-B (U/h/mg·prot)	Rate of inhibition (%)
正常组	2.53 \pm 0.62 [#]	66.3 [#]
假手术组	2.98 \pm 0.45 [#]	30.5 [#]
模型组	3.00 \pm 0.48 [*]	-
本发明提取物高剂量组	2.60 \pm 0.46 ^{*#}	69.7 ^{*#}
本发明提取物低剂量组	2.68 \pm 0.32 ^{*#}	63.2 ^{*#}
阳性对照组	2.78 \pm 0.55 ^{*#}	62.9 ^{*#}

[0103] 注：与正常组比较，* $P < 0.05$ 与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。

[0104] 5.6.4 对大鼠脑中 AchE 活性的影响

[0105] 结果如表 6 所示，与正常组比较，模型组大鼠脑中 AchE 的活性明显提高 ($P < 0.01$)。痴呆大鼠在给予本发明提取物后，能显著抑制脑中 AchE 活性 ($P < 0.01$)，高剂量组对脑中 AchE 抑制效果最强达到 35.3%。

[0106] 表 6 本发明提取物对血管性痴呆大鼠脑中 AchE 活性的影响

[0107] ($n = 10$, mean \pm S. D.)

组别	Brain	
	Activity of AchE (U/h/mg·prot)	Rate of inhibition(%)
正常组	0.626 \pm 0.035 [#]	-
假手术组	0.463 \pm 0.041 [#]	10.3 [#]
模型组	0.524 \pm 0.078 [*]	-
本发明提取物高剂量组	0.339 \pm 0.022 ^{*#}	35.3 ^{*#}
本发明提取物低剂量组	0.422 \pm 0.029 ^{*#}	19.5 ^{*#}
阳性对照组	0.428 \pm 0.032 ^{*#}	18.3 ^{*#}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.01$ 。

附图说明

[0110] 图 1 是给予不同药物的正常小鼠跳台错误次数的比较柱形图，其中 Cont 为空白对照组，HPC 为本发明提取物高剂量组，LPC 为本发明提取物低剂量组，Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0111] 图 2 是给予不同药物的正常小鼠第一次跳下平台潜伏期的比较柱形图，其中 Cont 为空白对照组，HPC 为本发明提取物高剂量组，LPC 为本发明提取物低剂量组，Pirac 为阳性

药物吡拉西坦片对照组。

[0112] 图 3 是给予不同药物的正常小鼠进入暗箱次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0113] 图 4 是给予不同药物的正常小鼠进入暗箱潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0114] 图 5 是给予不同药物的 30%乙醇所致记忆损伤小鼠跳台错误次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,EtOH 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0115] 图 6 是给予不同药物的 30%乙醇所致记忆损伤小鼠第一次跳下平台潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,EtOH 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0116] 图 7 是给予不同药物的 30%乙醇所致记忆损伤小鼠进入暗箱次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,EtOH 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0117] 图 8 是给予不同药物的 30%乙醇所致记忆损伤小鼠进入暗箱潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,EtOH 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0118] 图 9 是给予不同药物的 NaNO_2 所致记忆巩固障碍小鼠跳台错误次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组, NaNO_2 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0119] 图 10 是给予不同药物的 NaNO_2 所致记忆巩固障碍小鼠第一次跳下平台潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组, NaNO_2 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0120] 图 11 是给予不同药物的 NaNO_2 所致记忆巩固障碍小鼠进入暗箱次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组, NaNO_2 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0121] 图 12 是给予不同药物的 NaNO_2 所致记忆巩固障碍小鼠进入暗箱潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组, NaNO_2 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0122] 图 13 是给予不同药物的东莨菪碱所致记忆获得障碍小鼠跳台错误次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,Scop 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0123] 图 14 是给予不同药物的东莨菪碱所致记忆获得障碍小鼠第一次跳下平台潜伏期的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,Scop 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为本发明提取物低剂量组,Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0124] 图 15 是给予不同药物的东莨菪碱所致记忆获得障碍小鼠进入暗箱次数的比较柱形图,其中 Cont 为空白对照组,Scop 为模型对照组,HPC 为本发明提取物高剂量组,LPC 为

本发明提取物低剂量组, Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

[0125] 图 16 是给予不同药物的东莨菪碱所致记忆获得障碍小鼠进入暗箱潜伏期的比较柱形图, 其中 Cont 为空白对照组, Scop 为模型对照组, HPC 为本发明提取物高剂量组, LPC 为本发明提取物低剂量组, Pirac 为阳性药物吡拉西坦片对照组。

具体实施方式

[0126] 制备例

[0127] 例 1

[0128] 取干燥的枇杷叶紫珠 5kg, 粉碎成粗粉。

[0129] 取枇杷叶紫珠粗粉, 加水 20 倍量浸泡 1 小时, 在常压下加热回流提取 1.5 小时, 趁热过滤, 药渣再加水 15 倍, 加热回流提取 1 小时, 趁热过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩至比重 1.15 (50℃), 加乙醇至含醇量达 60%, 冷藏 12 小时, 倾出上清液, 将残留的悬浊液过滤, 合并上清液和滤液。将乙醇提取液减压浓缩至无醇味, 在 5 ~ 20℃ 下以 2000rpm 离心, 取上清液, 以 1BV/h (倍柱体积每小时) 的流速上大孔吸附树脂柱 (AB-8 型大孔吸附树脂, 天津南开大学化工厂生产), 待吸附饱和后, 先用 8 倍柱体积水以 1.5BV/h 的流速洗脱树脂柱, 再用 30% 乙醇以 1BV/h 的流速洗脱, 收集 10 倍柱体积的 30% 乙醇洗脱液, 减压回收乙醇, 浓缩, 干燥, 即得含苯乙醇苷的提取物 208g。

[0130] 以高效液相色谱法测定连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomiside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 的含量:

[0131] 固定相为色谱柱: Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6×250mm, 5 μ m); 保护柱: Analytical Guard Cartridge System (phenomenex, USA); 流动相: 甲醇-0.1% 冰醋酸溶液 (30 : 70); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30±1℃; 检测波长为 334nm; 分析周期: 45min。

[0132] 精密称取 60℃ 减压干燥 24 小时的连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomiside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 适量, 分别用流动相溶解于 5.0mL 量瓶中, 摇匀, 备用。分别吸取一定量的上述标准品溶液, 混合均匀, 配制成混合对照品溶液。最终对照品溶液中连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomiside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 的浓度依次为 3.124、1.258、0.435、0.836、0.682、0.562、0.831、0.456 和 0.724mg·mL⁻¹。

[0133] 供试品溶液的制备是取本发明所述含苯乙醇苷的制剂 20mg, 加流动相溶解并定容至 10mL。精密吸取上述溶液 2mL 至 10mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 用 0.4 μ m 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 取连续滤液约 1.0mL, 作为供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μ L 连续进样 3 次, 测定峰面积, 采用线性回归方程计算即得。检测结果显示连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomiside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 的含量分别为 53.2%、25.8%、0.64%、1.87%、0.53%、0.38%、0.82%、0.34% 和 0.93%。

[0134] 例 2

[0135] 取干燥的枇杷叶紫珠 6kg, 粉碎成粗粉。

[0136] 取枇杷叶紫珠粗粉, 加水 30 倍浸泡 1 小时, 在常压下加热回流提取 1.0 小时, 趁热过滤, 药渣再加水 20 倍, 加热回流提取 1 小时, 趁热过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩至比重 1.12(50℃), 加乙醇至含醇量达 60%, 冷藏 12 小时, 倾出上清液, 将残留的悬浊液过滤, 合并上清液和滤液。将乙醇提取液减压浓缩至无醇味, 在 5~20℃下以 2000rpm 离心, 取上清液加于已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂生产), 以 2BV/h(倍柱体积每小时)的流速上大孔吸附树脂柱, 待吸附饱和后, 先用 6 倍柱体积水以 1.5BV/h 的流速洗脱树脂柱, 再用 40%乙醇以 1BV/h 的流速洗脱, 收集 8 倍柱体积的 40%乙醇洗脱液, 减压回收乙醇, 浓缩, 干燥, 即得含苯乙醇苷的提取物 325g。采用制备例 1 的方法测定该提取物中连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomioside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 含量分别为 45.6%、10.2%、0.73%、1.68%、0.42%、0.31%、0.74%、0.28% 和 0.85%。

[0137] 例 3

[0138] 取干燥的枇杷叶紫珠 10kg, 粉碎成粗粉。

[0139] 取枇杷叶紫珠粗粉, 加水 30 倍浸泡 1 小时, 在常压下加热回流提取 1.0 小时, 趁热过滤, 药渣再加水 20 倍, 加热回流提取 1 小时, 趁热过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩至比重 1.12(50℃), 加乙醇至含醇量达 60%, 冷藏 12 小时, 倾出上清液, 将残留的悬浊液过滤, 合并上清液和滤液。将乙醇提取液减压浓缩至无醇味, 在 5~20℃下以 2000rpm 离心, 取上清液加于已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂, 以 2BV/h(倍柱体积每小时)的流速上大孔吸附树脂柱, 待吸附饱和后, 先用 6 倍柱体积水以 1.5BV/h 的流速洗脱树脂柱, 再用 40%乙醇以 1BV/h 的流速洗脱, 收集 8 倍柱体积的 40%乙醇洗脱液, 减压回收乙醇, 浓缩, 干燥, 即得含苯乙醇苷的提取物 463g。采用制备例 1 的方法测定该提取物中连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomioside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 含量分别为 48.7%、16.8%、0.96%、1.82%、0.46%、0.35%、0.82%、0.41% 和 0.98%。

[0140] 例 4

[0141] 取干燥的枇杷叶紫珠 5kg, 粉碎成粗粉。

[0142] 取枇杷叶紫珠粗粉, 加 50%乙醇 30 倍浸泡 1 小时, 在常压下加热回流提取 1.0 小时, 趁热过滤, 药渣再加 50%乙醇 20 倍, 加热回流提取 1 小时, 趁热过滤, 合并两次提取液, 减压浓缩至比重 1.12(50℃), 将提取液减压浓缩至无醇味, 在 5~20℃下以 2000rpm 离心, 取上清液加于已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂生产), 以 2BV/h(倍柱体积每小时)的流速上大孔吸附树脂柱, 待吸附饱和后, 先用 5 倍柱体积水以 1.0BV/h 的流速洗脱树脂柱, 再用乙醇以 1BV/h 的流速洗脱, 收集 8 倍柱体积的乙醇洗脱液, 减压回收乙醇, 浓缩, 干燥, 即得含苯乙醇苷的提取物 243g。采用制备例 1 的方法测定该提取物中连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomioside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 含量分别为 49.3%、14.7%、0.86%、1.38%、0.26%、0.37%、0.83%、0.32% 和 1.06%。

[0143] 例 5

[0144] 取干燥的枇杷叶紫珠 5kg, 粉碎成粗粉。

[0145] 取枇杷叶紫珠粗粉,加 75%乙醇 25 倍浸泡 1 小时,在常压下加热回流提取 1.0 小时,趁热过滤,药渣再加 75%乙醇 20 倍,加热回流提取 1 小时,趁热过滤,合并两次提取液,减压浓缩至比重 1.13(50℃),将提取液减压浓缩至无醇味,在 5~20℃下以 2000rpm 离心,取上清液加于已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂生产),以 2BV/h(倍柱体积每小时)的流速上大孔吸附树脂柱,待吸附饱和后,先用 8 倍柱体积水以 2.0BV/h 的流速洗脱树脂柱,再用甲醇以 1BV/h 的流速洗脱,收集 8 倍柱体积的甲醇洗脱液,减压回收甲醇,浓缩,干燥,即得含苯乙醇苷的提取物 258g。采用制备例 1 的方法测定该提取物中连翘酯苷、毛瑞花糖苷、cistanoside C、异毛瑞花糖苷、cistanoside、lamiophlomiside A、luteoside B、luteoside C 和 syringalide A 3'- α -L-Rhamnopyranoside 含量分别为 43.6%、18.3%、0.58%、1.73%、0.46%、0.21%、0.65%、0.26%和 0.76%。

[0146] 本发明方法的苯乙醇苷类成分提取率与文献报道的比较

[0147] 下面将本方法制备的提取物与文献(Kyung Ah Koo, Planta Medica, 2005, 71: 778~780.)报道的共有的三种苯乙醇苷类成分(连翘酯苷、毛瑞花糖苷、异毛瑞花糖苷)进行比较,进一步说明本方法的有益效果。

[0148] 表 7 本发明方法的苯乙醇苷类成分提取率与文献报道的比较结果

[0149]

化合物名称	制备例 1 (%)	制备例 2 (%)	制备例 3 (%)	制备例 4 (%)	制备例 5 (%)	文献值 (%)
连翘酯苷	2.21	2.47	2.25	2.40	2.25	1.76×10^{-4}
毛瑞花糖苷	1.07	0.55	0.78	0.71	0.94	9.18×10^{-4}
异毛瑞花糖苷	0.08	0.09	0.08	0.07	0.09	4.35×10^{-4}

[0150] 从表 7 比较的结果可看出,与文献报道的方法相比,本发明的方法可大大提高苯乙醇苷类成分的含量和得率,而且具有操作相对简单,提取溶剂可循环利用,环境污染小的特点。

[0151] 应用例

[0152] 例 1

[0153] 将制备例 1 所得提取物 150g 用适量乙醇稀释后,按照等量递加法分别与赋型剂 HPMC 和微粉硅胶按 1:1.5:0.5 的比例混合均匀,过 6 号筛制成颗粒,于 60℃温度下干燥 3 小时。取 1# 空肠溶胶囊,分别填充以上干燥颗粒,每 1 粒胶囊 0.3g,于囊口处涂一层阿拉伯胶浆,套封胶囊,用干燥纱布擦拭胶囊后,装于密闭棕色瓶内,即得。该制剂的用量为每天两次,每次 2 粒,口服。

[0154] 例 2

[0155] 将制备例 2 所得提取物 100g 与 225g 花生油混合,加入 25g 蜂蜡及 2g 吐温-80,再用旋转式扎囊机压制成 1000 粒软胶囊(0.3g/粒)。该制剂的用量为每天两次,每次 2 粒,口服。

[0156] 例 3

[0157] 将制备例 3 所得提取物 120g 与大豆油 150g 混合,加入 15.0g 蜂蜡及 2g 吐温-80,再用旋转式扎囊机压制成 1000 粒软胶囊(0.3g/粒)。该制剂的用量为每天两次,每次 4

粒,口服。

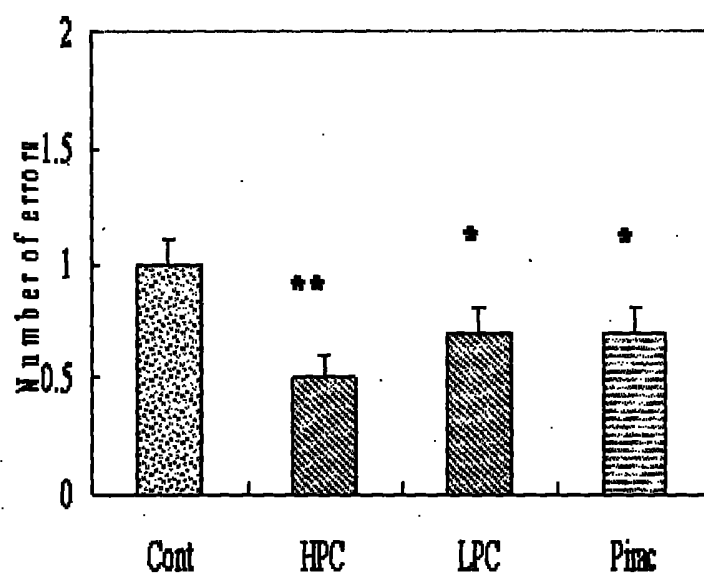


图 1

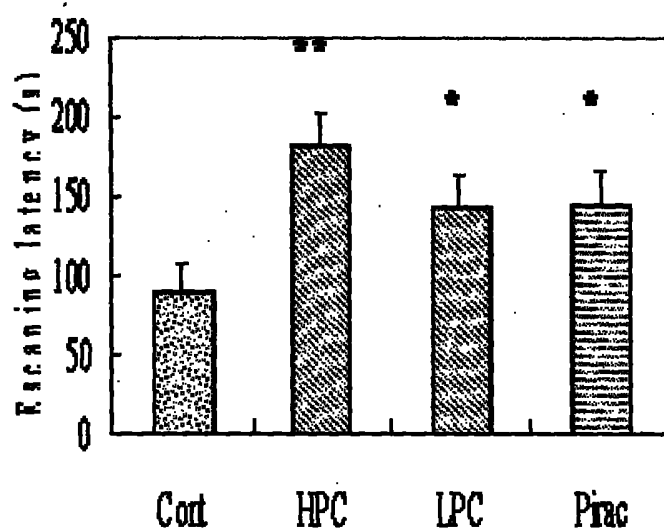


图 2

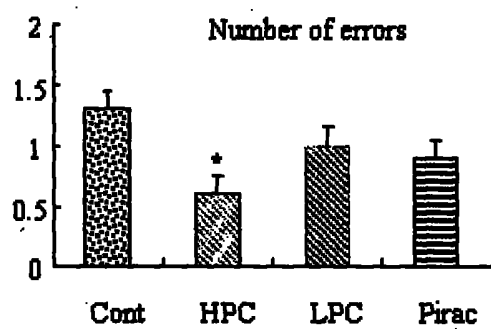


图 3

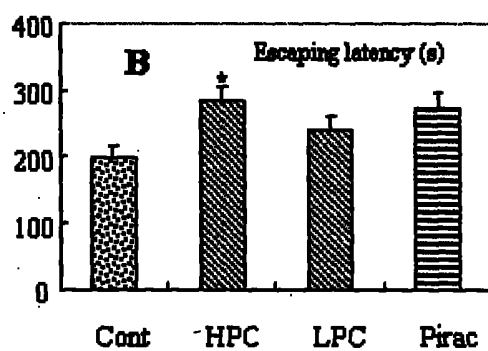


图 4

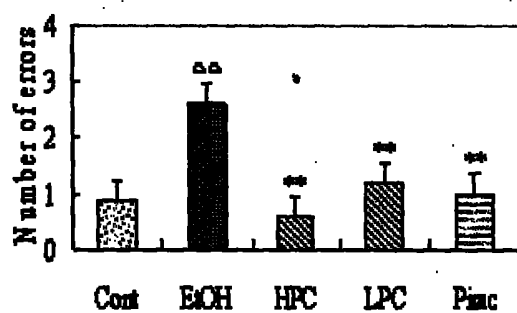


图 5

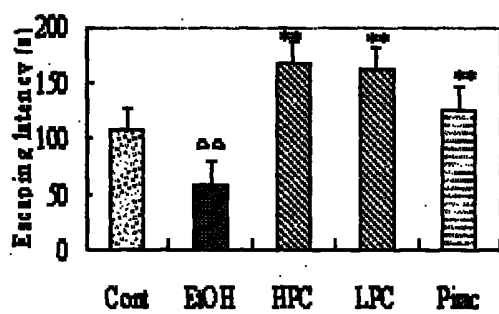


图 6

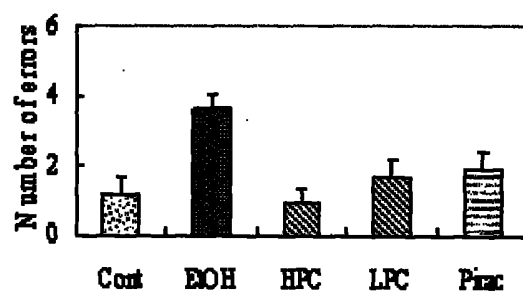


图 7

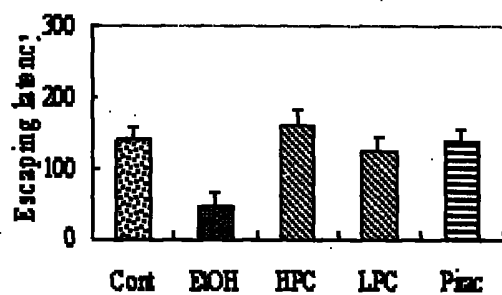


图 8

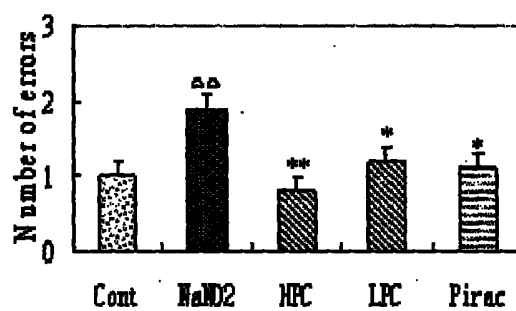


图 9

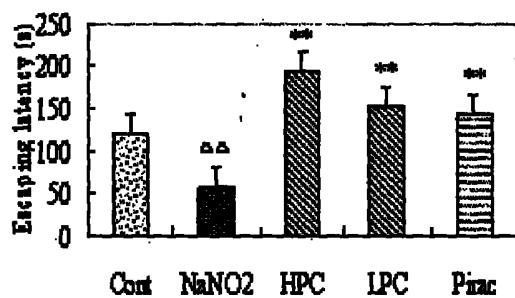


图 10

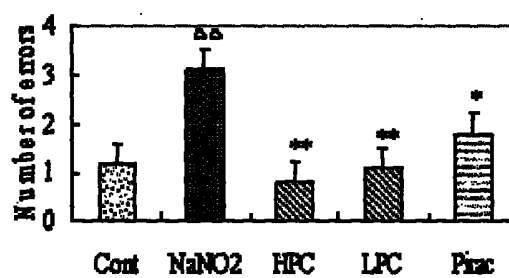


图 11

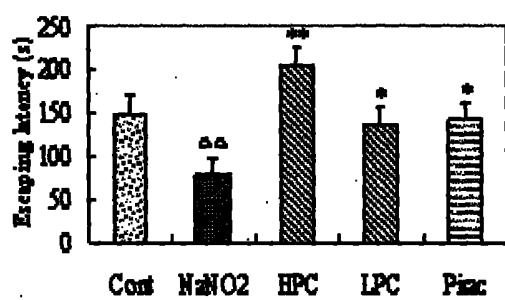


图 12

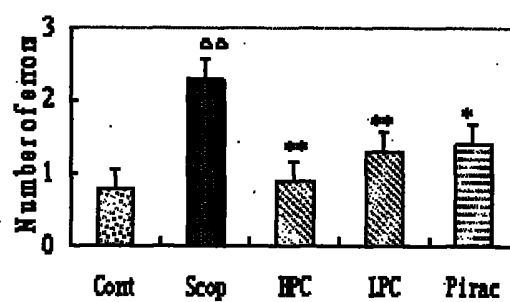


图 13

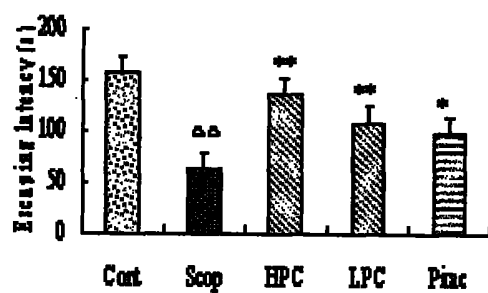


图 14

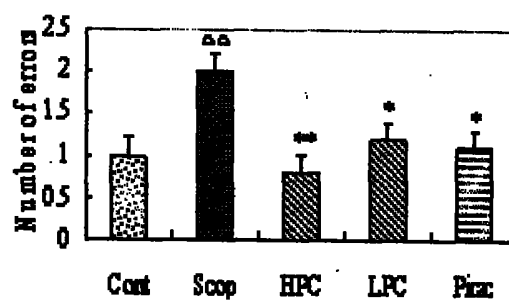


图 15

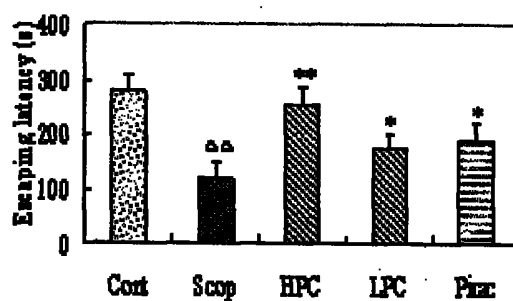


图 16