

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610035481.5

[51] Int. Cl.

A61K 36/537 (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/11 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月15日

[11] 授权公告号 CN 100512830C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[22] 申请日 2006.5.17

[21] 申请号 200610035481.5

[73] 专利权人 广州白云山和记黄埔中药有限公司

地址 510515 广东省广州市白云区沙太北路 389 号

[72] 发明人 李楚源 林青 黄琳 肖晓丽

王德勤 陈薇

[56] 参考文献

CN1415303A 2003.5.7

中医药防治老年痴呆的研究进展. 覃仁安等. 中国处方药, 第8期. 2004

审查员 凌宇静

[74] 专利代理机构 广州创颖专利事务所

代理人 曹可芬

权利要求书 1 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

治疗老年痴呆症的药物组合物

[57] 摘要

治疗老年痴呆症的药物组合物, 涉及以植物为原料的医药制品。它由药用活性部位和常规的药用辅料按常规的中药制剂工艺制成的口服制剂, 其药用活性部位主要是由丹参、三七药材制备而成, 1g 的药用活性部位干品中含有丹参酮 II A 1.79 ~ 9.01mg, 丹酚酸 B 35.87 ~ 225.23mg, 丹参素 4.93 ~ 45.05mg, 原儿茶醛 0.10 ~ 4.50mg, 三七皂苷 R1 3.14 ~ 22.50mg; 丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛 : 三七皂苷 R1 的重量比为 4 ~ 20 : 80 ~ 500 : 11 ~ 100 : 0.2 ~ 10 : 7 ~ 50。本发明所提供的药物, 对防治老年痴呆症疗效确切; 产品的有效成分组成、含量和比例明确, 产品质量可控和可操作性好; 可大批量生产。

1、一种治疗老年痴呆症的药物组合物，由药用活性部位和常规的药用辅料按常规的中药制剂工艺制成的口服制剂，其特征在于：1g 的药用活性部位干品中含有丹参酮 II A 1.79~9.01mg，丹酚酸 B 35.87~225.23 mg，丹参素 4.93~45.05mg，原儿茶醛 0.10~4.50 mg，三七皂苷 R1 3.14~22.50 mg；丹参酮 II A：丹酚酸 B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷 R1 的重量比为 4~20：80~500：11~100：0.2~10：7~50，所说的药用活性部位是取丹参药材碎为小段，乙醇浸泡 0.5~2 小时，热回流 0.5~1 小时，滤过，收集乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 I；药渣以 80%乙醇热回流 0.5~1 小时，滤过，收集 80%乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 II；药渣再以水回流 1~2 小时，滤液浓缩得相浸膏 III，将三七粉碎成 80 目以上的细粉，与丹参浸膏 I、II 和 III 拌匀，在 70~90℃ 下干燥 36~83 小时，所得的药用活性部位干品，水分≤5%。

2、根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于：所说的 1g 药用活性部位干品中含有丹参酮 II A 2.83~9.01mg，丹酚酸 B 53.81~225.23 mg，丹参素 7.85~45.05mg，原儿茶醛 0.16~4.5 mg，三七皂苷 R1 3.14~22.50 mg；丹参酮 II A：丹酚酸 B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷 R1 的重量比为 6.3~20：120~500：17.5~100：0.3~10：7~50。

3、根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于：所说的 1g 药用活性部位干品中还含有隐丹参酮 1.52~9.00mg、二氢丹参酮 0.63~4.50 mg、丹参酮 I 1.35~9.00 mg、人参皂苷 Rg1 18.83~135.14 mg、人参皂苷 Rb1 15.70~112.61mg。

4、根据权利要求 3 所述的药物组合物，其特征在于：所说的 1g 药用活性部位干品中含有隐丹参酮 2.42~9.00mg、二氢丹参酮 0.99~4.50 mg、丹参酮 I 2.11~9.00 mg。

5、根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于：所说的口服制剂是片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂。

6、根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于：所说的丸剂是水丸、小蜜丸、大蜜丸、浓缩丸、滴丸。

治疗老年痴呆症的药物组合物

技术领域

本发明涉及以植物为原料的医药制品，具体涉及用于制备治疗老年痴呆症的药物。

背景技术

老年痴呆是早老期与老年期人脑功能失调的一种表现，是以智力衰退和行为人格变化为特征的一种病症，包括阿尔茨海默氏病（简称 AD）、血管性痴呆（简称 VD）、混合型痴呆和其它如外伤、帕金森痴呆，其中阿尔茨海默氏病和血管性痴呆是老年痴呆中最主要的两大类型，患病率占有所有痴呆症的 90%以上。

AD 的病理改变主要以老年斑(SP)和神经纤维缠结(NFT)为二大病理标志，前者主要与 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 聚集、纤维化和沉积关系特别密切。老年斑的核心成分是 β -淀粉样肽 (β -AP)，它是由淀粉样蛋白前体(APP)在加工修饰过程中经不同的剪切方式形成氨基酸残基所组成， β -淀粉样肽的聚集和纤维状沉积产生的神经毒性被认为是 AD 发病的主要原因之一。因此干扰 β -淀粉样蛋白形成和沉积的研究将可能成为治疗 AD 的最有希望的方法之一。自由基损伤作用对 AD 的发病过程有显著影响，并被认为参与 AD 病人脑细胞的死亡过程，抗自由基作用可以减轻痴呆病变的发展，因此抗氧化剂有预防和治疗 AD 的作用。

现有治疗老年痴呆的西药主要为改善胆碱能神经传递的药物，如他克林(tacrine)、Donepezil、加兰他敏、石杉碱甲等，由于存在肝毒性以及对症状却不对病因的治疗模式产生不稳定的疗效，使其使用倍受争议。另外促代谢药物、激素疗法、抗炎治疗、抗氧化剂、抗淀粉样蛋白、钙通道阻滞剂、抗脑缺血等均探索性地用于 AD 与 VD 的治疗，疗效有待肯定。

中国专利 CN1546112A 公开了复方丹参片可用于治疗老年痴呆症，而目前临床使用的情况主以治疗冠心病心绞痛为主，其工艺及质量标准均为针对心血管系统疾病的治疗而制定的，由于其工艺条件决定了其药物的活性成分组成中丹参酮 II A、丹酚酸 B、丹参素和原儿茶醛的含量均较低，致使对治疗老年痴呆症的疗效不理想；CN1348815A 专利也提到了一种复方丹参滴丸可应用于治疗老年痴呆症，但是采用该专利所说的复方丹参滴丸的制备工艺所提取的活性成分中无丹参酮 II A 等脂溶性成分，原儿茶醛和丹酚酸 B 的含量很少，主要是含丹参素，所以对治疗老年痴呆症效果不佳，而仅对治疗冠心病、心绞痛有较好

的疗效。

我们以丹参药材(产地:山东,取五个不同的批号:041105、041106、041202、050101、050104)和三七药材(产地:云南,批号041204)按2005版药典复方丹参片项下制备,丹参加乙醇加热回流1.5小时,提取液滤过,滤液回收乙醇并浓缩为稠膏,备用;药渣加50%乙醇加热回流1.5小时,提取液滤过,滤液回收乙醇并浓缩为稠膏,备用;药渣加水煎煮2小时,煎液滤过,滤液浓缩为稠膏。三七粉碎为细粉,与上述浓缩浸膏混匀、干燥得干品。

以丹参药材(同制复方丹参片的五个批号,产地:山东,批号041105、041106、041202、050101、050104)和三七药材(产地:云南,批号041204)按2005版药典复方丹参滴丸项下,丹参、三七加水煎煮,煎液滤过,滤液浓缩,加入乙醇,静置使沉淀,取上清液,回收乙醇,浓缩成稠膏,干燥得干品。

上述二种方法制得的药用活性部位1g干品,测定丹参酮II A、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛和三七皂苷的含量结果见表1。

表1 复方丹参片、复方丹参滴丸药用活性部位1g干品成分测定结果 (单位: mg/g)

样品	丹参酮II A	丹酚酸 B	丹参素	原儿茶醛	三七皂苷 R1
复方丹参片 05001	1.0503	27.6667	4.2519	0.0954	3.7514
复方丹参片 05002	0.9924	26.5460	4.0147	0.0913	3.7670
复方丹参片 05003	1.0460	24.7981	3.8986	0.1189	3.8062
复方丹参片 05004	0.9596	25.2564	3.5671	0.1008	3.9633
复方丹参片 05005	1.1211	28.0789	3.8986	0.1189	3.7857
复方丹参滴丸 05001	-	16.2112	4.8631	0.0125	3.7559
复方丹参滴丸 05002	-	17.7998	4.2235	0.0141	3.7935
复方丹参滴丸 05003	-	18.4700	4.2698	0.0090	3.8427
复方丹参滴丸 05004	-	17.4004	4.4650	0.0091	3.7274
复方丹参滴丸 05005	-	18.4700	3.7902	0.0104	3.8742

由此可见,复方丹参片药用活性部位干品中丹参酮II A ($C_{19}H_{18}O_3$)的含量在0.96~1.12 mg/g、丹酚酸 B ($C_{36}H_{30}O_{16}$)含量在24.8~28.08 mg/g,制备的复方丹参片均可达到《中华人民共和国药典》2005版复方丹参片项下规定每片含丹参酮II A ($C_{19}H_{18}O_3$),不得少于0.20mg,含丹酚酸 B 的量不得少于5.0mg的要求,即相当于1g药用活性成分的干品中含丹参酮II A 不得少于0.9mg,丹酚

酸 B 不得少于 22.5mg。但作为药用治疗老年痴呆症则其含量偏低；复方丹参滴丸无丹参酮 II A 成分，丹酚酸 B 含量偏低。

文献“中国药理学与毒理学杂志” 1994, 8 (1): 19 报道了丹参酮 II A 能抑制脑缺血引起的脑细胞损伤，并具有抗氧化作用，对脑神经细胞有较好的保护作用。文献“Phytomedicine” 2003, 10(4):286 在大鼠局灶脑缺血研究中发现，丹参酮可缩小脑组织缺血面积，缓解脑缺血引起的症状，有脑保护作用。在文献“Free Radic Biol Med” 1996, 20(6):801 中认为丹参酮对大鼠脑微粒体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性有促进作用。

可见，丹参酮 II A 是防治 AD 和 VD 的有效成分。

文献“药学学报” 1992, 27 (2): 96 和“Acta Pharmacol Sin” 2000, 21(8):463 报道了丹酚酸 B 有很强的清除自由基抗氧化的作用，可通过抗氧化作用保护神经细胞，而且对 β -淀粉样蛋白聚集有明显的抑制作用；“药学学报” 2000, 35 (12): 881-885 丹酚酸类混合物对脑缺血有较好的保护作用，可抑制突触体 Glu 释放，并有清除氧自由基 (ROS) 和改善学习记忆障碍等作用；“医药导报” 2004, 23 (6): 355 认为丹酚酸对小鼠大鼠等动物脑缺血和缺血再灌注引起的脑损伤有保护作用，可以缩小缺血面积，减少脑组织中 MDA 含量，缓解由于脑缺血引起的行为学障碍，并对由此引起的记忆功能障碍有明显的改善作用。对化学物质损伤记忆获得障碍有一定改善作用。

可见丹酚酸 B 为代表的丹酚酸类成分是防治 AD 和 VD 的有效成分。

在文献“上海医科大学学报” 1987, 14 (1): 25；“上海第二医科大学学报” 1990, 10 (3): 208；“中西医结合杂志” 1983, 3 (5): 297；“药学学报” 1982, 17 (3): 226；“中西医结合杂志” 1984, 4 (9): 565；“中国免疫学杂志” 1995, 11 (6): 370；“中药药理与临床” 1990, 6 (4): 31 在分别报道了丹参素可改善微循环障碍及降低血浆乳酸含量；提高机体抗凝和纤溶活性；有明显的抗凝血作用；可显著舒张动物冠状动脉；抑制血小板合成与释放 TXA_2 等前列腺素类血管物质；通过对单核细胞分泌炎性细胞因子的调节作用；抑制钙内流产生抗炎及增强机体免疫调节的作用。

可见，丹参素也是防治 AD 和 VD 的有效成分。

众多的文献：中华医学杂志, 1973, 53(4):204-205. 苏州医学院学报, 1982, 2:1-2. 日本公开特许公报(A), 昭 58-83619, 1983-05-19. 血瘀证与活血化瘀研究[M]. 北京:

学苑出版社, 1990, 198-200. Acta Univ. Palackianae Olomucensis, 1958, 2(14): 135-143.报道了原儿茶醛有扩张冠状动脉、降低心肌氧耗量、抑制血小板聚集、清除自由基和抗脂质氧化、抗炎等作用。我们通过研究也发现了原儿茶醛有显著的 DPPH 自由基清除作用及超氧阴离子自由基抑制作用, 清除率和抑制率均高于丹酚酸 B。

故原儿茶醛也是防治 AD 和 VD 不可缺少的一种有效成分。

文献“中国临床康复”2004, 8(34): 7876 报道了三七总皂苷具有抗氧化作用, 并可减轻细胞对 A β 淀粉样肽的神经毒性反应和促进细胞突起生长的作用, 表明三七总皂苷能对老年性痴呆的病理发展有拮抗作用; 另外, 在文献“药学学报”2005, 40(5): 385; “中国医科大学学报”2000, 29(3): 170; “中国现代应用药学”2002, 19(2): 101; “遵义医学院学报”2003, 26(4): 325; 南华大学学报(医学版), 2001, 29(2): 113 分别报道认为人参皂苷 Rg1 能上调脑内 Ach 水平和 M-胆碱受体数, 具有促智作用; 自由基引发的脂质过氧化能造成细胞成分间的交联, 可使整个神经元丧失功能。人参皂苷具有抗自由基氧化作用, 对海马神经元具有明显的抗氧化作用, 减轻对海马等部位超微结构的损害降低细胞死亡率; 在脑缺血小鼠实验中, 人参皂苷可抑制自由基的生成, 降低卒中指数及死亡率, 延长存活时间, 对缺血性脑损伤具有一定的保护作用; 人参总皂苷能够减弱由自由基所致的大鼠皮层神经元损伤, 且随着剂量的加大其保护作用也随之增强; 人参皂苷能降低脑缺血后脑组织中丙二醛(MDA)的含量, 增加超氧化物歧化酶(SOD)的活力, 说明人参皂苷在脑缺血中具有抗氧自由基损伤, 抗脂质过氧化的作用。

以上说明了三七皂苷 R1 为代表的皂苷类成分是防治 AD 和 VD 的有效成分。

因此, 对于治疗老年痴呆症的丹参制剂中, 提供一种能定量控制丹参酮 II A、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、三七皂苷 R1 等有效成分量的产品很有必要。

发明内容

本发明的目的是以丹参、三七为主要原料, 按一定的工艺和质量控制方法, 提供一种用于防治老年痴呆有显著疗效的新药。

为达到本发明的目的, 我们首先用丹参的脂溶性部位及水溶性部位、三七的醇提取物, 按均匀设计安排样品的配制, 以老年痴呆相关模型进行体外药效实验, 确定用于防治老年痴呆症的药用活性成分的组成。

采用体外高通量筛选方法确定有效成分及与疗效相关的含量和比例。

1 实验样品的制备

1.1 丹参脂溶性提取物的制备：唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎，碎为小于 1.5cm 的小段，加乙醇浸泡 1h，70℃热回流 0.5h，过滤，回收乙醇，冷冻干燥，即得。经测定，脂溶性提取物仅含有丹参酮 II A、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I 等丹参脂溶性成分，无丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛成分。

1.2 丹参水溶性提取物 I 的制备：唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎，碎为细粉，加水浸泡 12h，搅拌，过滤，冷冻干燥，即得。经测定，水溶性提取物 I 仅含有丹酚酸 B 及丹参素、原儿茶醛，无丹参酮 II A、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I 等丹参脂溶性成分。

1.3 丹参水溶性提取物 II 的制备：唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎，碎为小于 1.5cm 的小段，加水浸泡 1h，100℃热回流 20h，过滤，冷冻干燥，即得。经测定，水溶性提取物 II 仅含有丹参素、原儿茶醛及极少量丹酚酸 B 成分（可忽略不计），无丹参酮 II A、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I 等丹参脂溶性成分。

1.4 三七提取物的制备：五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根，碎为细粉，70%乙醇浸泡 1h，70℃热回流 1h，过滤，回收乙醇，冷冻干燥，即得。经测定，三七提取物含三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 等成分。

1.5 市售复方丹参片提取物：经测定结果：每片含丹参酮 II A 0.2854mg、隐丹参酮 0.2930mg、二氢丹参酮 0.1235mg、丹参酮 I 0.2744mg、丹酚酸 B 6.1117mg、丹参素 1.9302mg、原儿茶醛 0.0038mg、三七皂苷 R1 0.5544mg、人参皂苷 Rg1 3.6967mg、人参皂苷 Rb1 2.7958mg

1.6 丹参酮 II A、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 对照品均购自中国药品生物制品检定所。

2 体外筛选实验

2.1 beta-分泌酶（BACE）抑制剂及有效成分配比的筛选

2.1.1 实验材料与仪器：

醋酸钠缓冲液 (PH4.0)。重组人 BACE-1, 荧光底物 IV (均购自 R&D 公司)。仪器: Beckman2000 机器人, POLARSTAR GALAXY 微板光学测定仪, 荧光测定 384 孔板 (BMG 产品)。

2.1.2 实验方法:

2.1.2.1 样品制备

按 U_{12} (12^5) 均匀设计表比例配制筛选样品。

表 1 U_{12} (12^4) 均匀设计表 单位: mg/2.33g 干膏

编号	1 丹参酮 IIA	2 丹酚酸 B	3 丹参素*	4 三七皂苷
1	6.5	50	25	10
2	3.5	10	15	8
3	4.5	90	10	12
4	5	20	30	4
5	4	80	17.5	1
6	1.5	120	12.5	5
7	2.5	40	7.5	2
8	1	70	27.5	6
9	6	60	5	7
10	5.5	110	22.5	3
11	2	30	20	11
12	3	100	32.5	9

*以丹参素为指标的提取物中, 含有相当于丹参素量 2% 的原儿茶醛。

2.1.2.2 实验步骤

依次在 384 孔板加入样品溶液, 醋酸钠缓冲液, BACE, 反应温度 25℃, 再加入荧光底物 IV, 底物终浓度 10 μ M, 酶终浓度 4 μ g/mL, 测定波长 $E_x=320$ nm, $E_m=405$ nm, 记录荧光值变化斜率作为酶活性, 与标准对照比较计算对什么酶的抑制率。在 384 孔板中 8 孔作为对照。

2.1.3 实验结果:

表 2 beta-分泌酶 (BACE) 抑制剂筛选样品的抑制率 (按日服用剂量筛选)

编号	样品	抑制率 %
1	均匀 1	39.08
2	均匀 2	13.05

3	均匀 3	37.26
4	均匀 4	47.19
5	均匀 5	53.07
6	均匀 6	71.42
7	均匀 7	41.30
8	均匀 8	43.13
9	均匀 9	35.08
10	均匀 10	48.54
11	均匀 11	40.10
12	均匀 12	63.47
13	丹参酮 IIA	41.44
14	丹酚酸 B	59.07
15	丹参素	29.53
16	三七皂苷 R1	14.44
17	隐丹参酮	10.89
18	二氢丹参酮	18.16
19	丹参酮 I	9.68
20	原儿茶醛	26.49
21	人参皂苷 Rg1	33.39
22	人参皂苷 Rb1	12.68
23	市售复方丹参片提取物**	18.79

** 为 2 个平行样品测定的平均值

均匀设计样品以 SPSS10.0 软件处理, 选入阈值 1, 剔除阈值 1, 得多元线性回归方程: $Y=24.4356+0.2857X_2+0.4752X_3-4.5488X_4$, $F_{0.05}(3, 8)=5.6241 > F_{0.05}(3, 8)=4.07$, 方程显著, 复相关系数 $r=0.83$ (其中 X_2 为丹酚酸 B, X_3 为丹参素, X_4 为三七皂苷 R1, Y 为抑制率)。

结果发现: 丹酚酸 B 与丹参素含量高、三七皂苷 R1 含量低, 对提高抑制率有利; 丹参酮 IIA 似与 beta-分泌酶抑制作用无关。综合实际实验样品的抑制率发现, 原复方丹参片抑制率 18.79%, 实验样品的抑制率超过 50%, 最高可达 71.42%。最优比例样品的理论抑制率为 69.61%, 与实际抑制率最高的样品接近。

2.2 丁酰胆碱酯酶抑制剂筛选模型

2.2.1 实验材料与仪器:

丁酰胆碱酯酶测试盒 (南京建成生物工程研究所), 二硫双硝基苯甲酸

(Sigma 公司)。仪器：721 分光光度计。

2.2.2 实验方法：

2.2.2.1 样品制备

按表 1 比例配制筛选样品。

2.2.2.2 实验步骤

以 0.05M 的磷酸缓冲液 1:80 稀释人血浆得到应用酶液。首先将候选化合物 5 μ l 与酶液 10 μ l 温孵 30min 后，依次加入底物氯化丁酰巯基胆碱试液 (终浓度 3mM) 以及显色剂二硫双硝基苯甲酸 (终浓度 0.25mM)，混匀，于 30 $^{\circ}$ C 温孵，读取比色值 OD412。

2.2.3 实验结果：

表 3 抑制剂筛选样品的抑制率 (按日服用剂量筛选)

编号	样品	抑制率 %
1	均匀 1	12.19
2	均匀 2	15.27
3	均匀 3	18.57
4	均匀 4	14.06
5	均匀 5	67.92
6	均匀 6	14.50
7	均匀 7	16.37
8	均匀 8	7.07
9	均匀 9	30.56
10	均匀 10	5.97
11	均匀 11	13.62
12	均匀 12	12.68
13	丹参酮 IIA	6.19
14	丹酚酸 B	17.78
15	丹参素	10.00
16	三七皂苷 R1	20.55
17	隐丹参酮	18.73
18	二氢丹参酮	24.46
19	丹参酮 I	5.53
20	原儿茶醛	6.91
21	人参皂苷 Rg1	16.12
22	人参皂苷 Rb1	15.42

23	市售复方丹参片提取物**	16.92
----	--------------	-------

** 为 2 个平行样品测定的平均值

根据实验结果分析：原复方丹参片抑制率 16.92%，实验样品的抑制率超过 20%，最高可达 67.92%。其中丹参酮 IIA 含量较高的 5、9 号样抑制率比较高，估计有效部位主要是丹参脂溶性成分为主。同浓度下单体抑制率由高至低为：二氢丹参酮 > 三七皂苷 R1 > 隐丹参酮 > 人参皂苷 Rg1。

2.3 抗氧化模型-DPPH（二苯三硝基苯肼）自由基清除

2.3.1 仪器：Zenyth 200rt 酶标仪。

2.3.2 实验方法：

2.3.2.1 样品制备

按表 1 比例配制筛选样品。

2.3.2.2 实验方法

将一定浓度的 DPPH 190ul，然后加入 10ul 样品。空白对照组加 10ul 乙醇，总体积 200ul，摇匀，于室温下避光放置 30 min 后，酶标仪测定 DPPH 混合溶液在 517 nm 处吸光值(A)。计算 DPPH 的清除率。

2.3.3 实验结果：

表 4 抗氧化模型-DPPH 自由基清除率（按日服用剂量筛选）

编号	样品	清除率 %
1	均匀 1	20.82
2	均匀 2	10.94
3	均匀 3	6.84
4	均匀 4	11.70
5	均匀 5	18.09
6	均匀 6	17.78
7	均匀 7	20.21
8	均匀 8	15.65
9	均匀 9	11.70
10	均匀 10	19.45
11	均匀 11	12.16
12	均匀 12	12.16
13	丹参酮 IIA	-1.82
14	丹酚酸 B	52.74

15	丹参素	49.24
16	三七皂苷 R1	1.98
17	隐丹参酮	13.98
18	二氢丹参酮	1.82
19	丹参酮 I	8.21
20	原儿茶醛	60.03
21	人参皂苷 Rg1	0.91
22	人参皂苷 Rb1	1.37
23	市售复方丹参片提取物**	7.75

** 为 2 个平行样品测定的平均值

均匀设计样品以 SPSS 软件处理, 选入阈值 1, 剔除阈值 1, 得多元线性回归方程:

$Y=38.5833-6.5146X_1-0.0471X_2-12.8129X_4+0.5367X_1^2-0.0196X_3^2-0.0123X_1X_2+0.0492X_1X_3+0.3874X_1X_4+0.0115X_2X_4+0.4045X_3X_4$, $F_{0.05}(10, 1)=3486.7 > F_{0.05}(10, 1)=241$, 方程显著, 复相关系数 $r=0.9999$ (其中 X_1 为丹参酮 II A, X_2 为丹酚酸 B, X_3 为丹参素, X_4 为三七皂苷 R1, Y 为清除率)。

优化计算为: $X_1=6.50$, $X_2=119.98$, $X_3=32.49$, $X_4=12.00$, $Y=44.11$ 。

结果发现: 原复方丹参片抗氧化 DPPH 自由基清除率 7.75%, 实验样品的清除率可达到 20%, 最优比例样品的理论清除率为 44.11%。同浓度下单体清除率最高可达 60.03%。同浓度下单体清除率由高至低为: 原儿茶醛 > 丹酚酸 B > 丹参素。多种主要成分含量高, 对提高清除自由基作用有利。

2.4 抗氧化模型-超氧阴离子自由基抑制实验

2.4.1 实验仪器: 微孔板闪烁发光计数仪 Topcount。

2.4.2 实验方法:

2.4.2.1 样品制备

按表 1 比例配制筛选样品。

2.4.2.2 实验方法

采用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶-鲁米诺体系检测。向 96 孔板中加入 10 μ l 筛选样品, 空白组加入等量的磷酸盐缓冲液, 加黄嘌呤-鲁米诺液 188 μ l, 加黄嘌呤氧化酶 2 μ l, 启动发光, 连续测量 6 次, 每次持续 6 秒, 取 6 次的平均值。

2.4.3 实验结果:

表5 抗氧化模型-超氧阴离子自由基抑制率 (按日服用剂量筛选)

编号	样品	抑制率/%
1	均匀 1	80
2	均匀 2	80
3	均匀 3	80
4	均匀 4	80
5	均匀 5	95
6	均匀 6	80
7	均匀 7	80
8	均匀 8	80
9	均匀 9	80
10	均匀 10	80
11	均匀 11	80
12	均匀 12	80
13	丹参酮 IIA	80
14	丹酚酸 B	95
15	丹参素	95
16	三七皂苷 R1	—
17	隐丹参酮	—
18	二氢丹参酮	—
19	丹参酮 I	—
20	原儿茶醛	99
21	人参皂苷 Rg1	—
22	人参皂苷 Rb1	—
23	市售复方丹参片提取物**	80

** 为 2 个平行样品测定的平均值

根据实验结果分析：抗氧化模型-超氧阴离子自由基作用的成分主要为丹参水溶性成分和丹参酮 IIA，即丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛和丹参酮 IIA 含量高，对提高抑制率有利。单体抑制率由高至低为：原儿茶醛 > 丹参素 > 丹酚酸 B > 丹参酮 IIA。

2.5 抗氧化模型-抗脂质过氧化作用实验

2.5.1 实验材料与仪器：丹参脂溶性提取物，丹参水溶性提取物 I，丹参水溶性提取物 II，三七提取物。丹参酮 IIA、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 对

照品均购自中国药品生物制品检定所。仪器：721 分光光度计。

2.5.2 实验方法:

2.5.2.1 样品制备

按表 1 比例配制筛选样品。

2.5.2.2 实验方法

微粒体制备:大鼠禁食过夜,断头处死,先用冷的 TMS 缓冲液(Tris-HCl 0.05 mmol.L⁻¹, 蔗糖 0.2 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol.L⁻¹, pH 7.4)经门静脉冲洗肝脏至土黄色,取肝脏制成匀浆,3000 g 离心 20 min,再将上清液 1.05×10⁵g 离心 60 min,沉淀即为微粒体。将肝微粒体重悬于 TMS 缓冲液中,稀释至蛋白含量为 15 g.L⁻¹(用考马斯亮兰法测蛋白浓度),储存于-60℃冰箱备用。以上操作在 4℃ 条件下完成。

反应体系中含微粒体 0.1 ml,加入溶剂或不同浓度的待测药物 0.01 ml(阳性对照不加待测药物),半胱氨酸(0.01 mol.L⁻¹)0.02 ml,硫酸亚铁(1 mmol.L⁻¹)0.05 ml(空白对照不加硫酸亚铁),用 0.1 mol.L⁻¹PBS(pH 7.4)补充至总体积为 1 ml。37℃共温育 30 min 后,加三氯乙酸和硫代巴比妥酸显色剂,测定脂质过氧化物丙二醛的含量。

待测药物的作用以 MDA 生成的抑制率(IR%)表示。

$$IR\% = \frac{[(OD \text{ 阳性对照} - OD \text{ 空白对照}) - (OD \text{ 样品} - OD \text{ 空白对照})]}{(OD \text{ 阳性对照} - OD \text{ 空白对照})} \times 100\%$$

2.5.3 实验结果:

表 5 抗脂质过氧化作用 MDA 生成的抑制率 (按日服用剂量筛选)

编号	样品	抑制率 %
1	均匀 1	0.39
2	均匀 2	2.75
3	均匀 3	22.09
4	均匀 4	19.93
5	均匀 5	5.34
6	均匀 6	25.23
7	均匀 7	9.42
8	均匀 8	16.01
9	均匀 9	10.16
10	均匀 10	2.32

11	均匀 11	0.20
12	均匀 12	20.64
13	丹参酮IIA	17.30
14	丹酚酸 B	11.73
15	丹参素	5.57
16	三七皂苷 R1	19.42
17	隐丹参酮	16.87
18	二氢丹参酮	26.64
19	丹参酮 I	16.32
20	原儿茶醛	25.70
21	人参皂苷 Rg1	18.09
22	人参皂苷 Rb1	8.87
23	市售复方丹参片提取物**	8.77

** 为 2 个平行样品测定的平均值

均匀设计样品以 SPSS 软件处理, 选入阈值 3, 剔除阈值 3, 得多元线性回归方程:

$Y=2.1792+2.4477X_1+0.8159X_3-0.4182X_1^2-6.1492X_4^2-0.013X_2X_3+0.2916X_2X_4$,
 $F_{0.01}(6, 5)=64.23158 > F_{0.01}(6, 5)=10.67$, 方程高度显著, 复相关系数 $r=0.9936$ (其中 X_1 为丹参酮 II A, X_2 为丹酚酸 B, X_3 为丹参素, X_4 为三七皂苷 R1, Y 为清除率)。

优化计算为 $X_1=2.87$, $X_2=119.36$, $X_3=5.28$, $X_4=2.89$, $Y=50.59$ 。

结果分析: 原复方丹参片抑制率 18.79%, 实验样品的抑制率可达 50%, 最高可达 71.42%, 最优化比例样品的理论清除率为 50.59%, 实际抑制率可能高于理论值, 抗脂质过氧化作用显著。同浓度下单体抑制率由高至低为: 二氢丹参酮 > 原儿茶醛 > 人参皂苷 Rg1 > 三七皂苷 R1。

根据上述五个实验结果结合筛选样品的直接分析导出: 除了 beta-分泌酶抑制剂筛选中, 三七皂苷 R1 含量低, 对提高抑制率有利外, 各模型均呈现有效成分含量高对提高指标 (活性) 有利的现象。另外, 以丹参素为指标的提取物中, 含有不少于丹参素量 2% 的原儿茶醛。因此, 依丹参素的情况, 有效成分原儿茶醛在各模型中也具有含量高对提高活性有利的情况。在 beta-分泌酶抑制剂筛选实验中, 均匀设计 5 号样品在丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛 : 三七皂苷 R1 为 4 : 80 : 17.5 : 0.35 : 1 (即 1g 的药用活性部位干品中含有丹参酮 II A 1.79mg, 丹酚酸 B 35.87 mg, 丹参素 4.93 mg, 原儿茶醛 0.10mg,) 时已

有53%的抑制率，三七皂苷R1虽无beta-分泌酶抑制作用，但具有显著的抗自由基活性。考虑到beta-分泌酶抑制剂的应用在AD防治中是比较重要的途径，认为按此比例及三七皂苷R1中等剂量是有效成分的下限。由此得出1g的药用活性部位干品中含有丹参酮IIA 1.79~9.01mg，丹酚酸B 35.87~225.23 mg，丹参素 4.93~45.05 mg，原儿茶醛 0.10~4.50 mg，三七皂苷R1 3.14~22.50 mg，丹参酮IIA：丹酚酸B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷R1的重量比为4~20:80~500:11~100:0.2~10:7~50。最佳疗效的药用活性部位干品中含有丹参酮IIA 2.83~9.01 mg，丹酚酸B 53.81~225.23mg，丹参素 7.85~45.05 mg，原儿茶醛 0.16~4.5 mg，三七皂苷R1 3.14~22.50mg，丹参酮IIA：丹酚酸B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷R1的重量比为6.3~20：120~500：17.5~100：0.3~10：7~50。

本发明的技术方案是：用于预防和治疗老年痴呆症的药物组合物，由药用活性部位和常规的药用辅料按常规的中药制剂工艺制成的口服制剂，其药用活性部位是主要由丹参、三七药材制备而成，1g的药用活性部位干品中含有丹参酮IIA 1.79~9.01mg，丹酚酸B 35.87~225.23 mg，丹参素 4.93~45.05 mg，原儿茶醛 0.10~4.50 mg，三七皂苷R1 3.14~22.50 mg；丹参酮IIA：丹酚酸B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷R1的重量比为4~20：80~500：11~100：0.2~10：7~50。为了使药物的疗效更佳，可优选药用活性部位干品中含有丹参酮IIA 2.83~9.01 mg，丹酚酸B 53.81~225.23mg，丹参素 7.85~45.05 mg，原儿茶醛 0.16~4.5 mg，三七皂苷R1 3.14~22.50mg；丹参酮IIA：丹酚酸B：丹参素：原儿茶醛：三七皂苷R1的重量比为6.3~20：120~500：17.5~100：0.3~10：7~50。

用高效液相色谱法测定本发明所说的1g药用活性部位干品中还可以测得含有隐丹参酮 1.52~9.00mg、二氢丹参酮 0.63~4.50 mg、丹参酮I 1.35~9.00 mg、人参皂苷Rg1 18.83~135.14 mg、人参皂苷Rb1 15.70~112.61 mg；当1g药用活性部位干品中还含有隐丹参酮 2.42~9.00 mg、二氢丹参酮 0.99~4.50 mg、丹参酮I 2.11~9.00 mg、人参皂苷Rg1 18.83~135.14 mg、人参皂苷Rb1 15.70~112.61mg时更佳。

本发明的产品，所说的药用活性部位，可以是采用如上述体外试验的方法，用丹参脂溶性提取物，丹参水溶性提取物I，丹参水溶性提取物II，三七提取

物及丹参酮IIA、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮I、丹酚酸B、丹参素、原儿茶醛、三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1等复配而成。为了获得简单易行的制备方法，又保证药物的质量，我们对制备工艺条件进行研究，可优选得到如下的制备方法：所说的药用活性部位是取丹参药材，碎为小段，用乙醇浸泡0.5~2小时，热回流0.5~1小时，滤过，收集乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏I；药渣以80%乙醇热回流0.5~1小时，滤过，收集80%乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏II；药渣再以水热回流1~2小时，滤液浓缩得浸膏III；将三七粉碎成80目以上的细粉，与丹参浸膏I、II和III拌匀，干燥；在70~90℃下干燥36~83小时为佳，得的药用活性部位干品，水分≤5%。

丹参药材需粉碎为小段，是为了在提取时间内将主要分布于木质部的丹酚酸类成分较完全地提取出来；先用乙醇浸泡0.5~2小时，可减少丹参用乙醇热回流提取的时间，减少受热易降解的丹参酮类的损失，提高了丹参酮类成分的含量；丹酚酸在提取过程受热可分解为丹参素，1分子的丹酚酸分解可得到3分子的丹参素，所以在提取时必需控制提取加热的时间和浸膏干燥的时间，在不同的干燥温度，干燥加热使丹酚酸类有规律地转化为丹参素和原儿茶醛，经实验发现丹参素和原儿茶醛是药效活性的主要成分之一，在产品中需有一定的含量规定，为保证丹酚酸B、丹参素和原儿茶醛三者含量都达到要求，所以干燥温度与干燥时间范围需控制。

本发明提供的药物组合物是取药用活性部位干品，添加常规的药用辅料，按常规的中成药制剂工艺制成口服制剂，所说的口服制剂优选制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂，其丸剂可以是水丸、小蜜丸、大蜜丸、浓缩丸、滴丸等。

用于本发明中丹参酮IIA、丹酚酸B、丹参素、原儿茶醛、三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Rb1、隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮I的含量测定方法均采用高效液相色谱法（HPLC）。

测定方法如下：

1、丹参酮IIA（可同时测定隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮I）含量测定方法

色谱条件与系统适用性条件：C18柱；流动相：甲醇-水（80:20）；检测波长：254nm。理论板数按丹参酮IIA峰计算应不低于2000。

对照品溶液的制备 取丹参酮IIA、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮I适量，

精密称定，置棕色量瓶中，加甲醇制成每 1ml 含丹参酮 II A 2.4 μ g、二氢丹参酮 2.7 μ g、隐丹参酮 2.1 μ g、丹参酮 I 2.1 μ g 混合溶液，即得。

供试品溶液的制备 取丹参药材 0.2g，加 75% 甲醇 25ml，加热回流 1h，过滤，滤液浓缩至 1 ml，即得。取丹参颗粒 1g，精密称定，置具塞棕色瓶中，精密加入甲醇 25ml，密塞，称定重量，超声处理，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，取续滤液，置棕色瓶中，即得。取丹参制剂，研为细粉，精密称定 1g，置具塞棕色瓶中，精密加入甲醇 25ml，密塞，称定重量，超声处理，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，取续滤液，置棕色瓶中，即得。

2 丹参素（以丹参素钠计算，可同时测定原儿茶醛）含量测定方法

色谱条件与系统适用性条件：C₁₈ 柱；流动相：0.5% 醋酸水—甲醇（80:20）；检测波长：280nm。理论板数按丹参素峰计算应不低于 2000。

对照品溶液的制备 取丹参素钠、原儿茶醛适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含丹参素 100 μ g、原儿茶醛 100 μ g 溶液，即得。

供试品溶液的制备 取丹参药材 0.2g，加甲醇 15ml，超声处理，过滤，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，即得。取丹参颗粒 1g，精密称定，精密加入甲醇 15ml，密塞，称定重量，超声处理 15min，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，即得。取丹参制剂，研为细粉，精密称定 1g，置具塞棕色瓶中，精密加入甲醇 15ml，密塞，称定重量，超声处理，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，即得。

3 丹酚酸 B 含量测定方法

色谱条件与系统适用性条件：C₁₈ 柱；流动相：甲醇-乙腈-甲酸-水（30:10:1:59）；检测波长：286nm。理论板数按丹酚酸 B 峰计算应不低于 2000。

对照品溶液的制备 取丹酚酸 B 适量，精密称定，置棕色量瓶中，加水制成每 1ml 含丹酚酸 B 60 μ g 溶液，即得。

供试品溶液的制备 取丹参药材粉末 0.2g 置具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 50ml，称定重量，加热回流 1h，取出，放冷，再称定重量，用 75% 甲醇补足减失的重量，过滤，取续滤液，即得。取丹参颗粒 0.15g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加水 50ml，密塞，称定重量，超声处理，放冷，称定重量，用水补足减失的重量，摇匀，取续滤液，即得。取丹参制剂，研为细粉，精密称定，

置具塞锥形瓶中，加水 50ml，密塞，称定重量，超声处理，放冷，称定重量，用水补足减失的重量，摇匀，取续滤液，即得。

4 三七皂苷 R1（可同时测定人参皂苷 Rg1、Rb1）含量测定方法

色谱条件与系统适用性条件：C18 柱；流动相：乙腈为流动相 A，水为流动相 B，按梯度洗脱进行，0~12min，流动相 A—流动相 B（19：81），12~60min，流动相 A—流动相 B（19~36：81~64）；检测波长：203nm。理论板数按三七皂苷 R1 峰计算应不低于 4000。

对照品溶液的制备 取三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含三七皂苷 R1 0.1mg、人参皂苷 Rg1 0.4mg、人参皂苷 Rb1 0.1mg 混合溶液，即得。

供试品溶液的制备 取丹参药材粉末 0.6g，精密称定，精密加入甲醇 50ml，称定重量，放置过夜，置 80℃水浴上保持微沸 2h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，过滤，摇匀，取续滤液，即得。取丹参颗粒粉末 1g，精密称定，精密加入甲醇 50ml，称定重量，放置过夜，置 80℃水浴上保持微沸 2h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，过滤，摇匀，取续滤液，即得。取丹参制剂，研为细粉，精密称定 1g，精密加入甲醇 50ml，称定重量，放置过夜，置 80℃水浴上保持微沸 2h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，过滤，摇匀，取续滤液，即得。

本发明的有益效果：1、本发明所提供的组合物，对防治 AD 和 VD 的老年痴呆症疗确切，比已有的复方丹参片、复方丹参滴丸效果显著；2、产品的有效成分组成、含量和比例明确，产品质量可控和可操作性好；3、可大批量生产。

下面通过实施例进一步阐述本发明的技术方案和效果

具体实施方式

实施例 1：

取丹参药材（产地：山东，批号 0411053）100Kg、三七药材（产地：云南，批号 0412041）30Kg，丹参药材碎为小段，用 8 倍量乙醇浸泡 1 小时后加热回流 0.5 小时，滤过，收集乙醇滤液，回收乙醇并浓缩至相对密度为 1.35 的浸膏 I；药渣以 80%乙醇热回流 1 小时，滤过，收集 80%乙醇滤液，回收乙醇并浓缩至相对密度为 1.36 的浸膏 II；最后以水热回流 1.5 小时，滤液浓缩至相对密度为 1.29 的浸膏 III；将三七粉碎成 80 目以上的细粉，与丹参浸膏 I、II 和 III 混

匀，在 90℃左右干燥 36h，制得的药用活性部位干品（干膏）55 Kg，水分≤5%。用上述的高效液相色谱法方法测定，每 1g 干膏中含丹参酮 II A 2.66mg，丹酚酸 B 48.81mg，丹参素 7.15mg，原儿茶醛 0.12 mg，三七皂苷 R1 5.34mg，隐丹参酮 2.72 mg，二氢丹参酮 1.12 mg，丹参酮 I 2.00 mg，人参皂苷 Rg1 22.66 mg，人参皂苷 Rb1 19.87 mg)；丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛:三七皂苷 R1 的重量比为 6:109:16:0.27:12。加辅料（13%糊精、24%糖粉、22%单糖浆、4%淀粉、0.5%硬脂酸镁）制成颗粒 65 Kg，用常规工艺制备压片，片剂。该片剂每片重 0.3g，每片含丹参酮 II A 0.675mg，丹酚酸 B 12.34mg，丹参素 1.81mg，三七皂苷 R1 1.38mg，隐丹参酮 0.69 mg、二氢丹参酮 0.28 mg、丹参酮 I 0.51mg、原儿茶醛 0.03mg、人参皂苷 Rg1 5.76 mg、人参皂苷 Rb1 5.05mg。口服剂量：每次 3 片，每日 3 次。

实施例 2：取丹参药材（产地：山东，批号 0501001）150Kg、三七药材（产地：云南，批号 0412041）45Kg，丹参药材碎为小段，用乙醇浸泡 2 小时，热回流 0.5 小时，滤过，收集乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 I；药渣以 80%乙醇热回流 0.5 小时，滤过，收集 80%乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 II；最后以水热回流 1.5 小时，滤液浓缩得浸膏 III。将三七粉碎成 80 目以上的细粉，与丹参浸膏 I、II 和 III 混匀，在 80℃左右干燥 50h。共得干膏 72Kg，水分≤5%。

用上述的高效液相色谱法方法测定，每 1g 干膏中含丹参酮 II A 2.98mg，丹酚酸 B 45.79mg，丹参素 7.44mg，三七皂苷 R1 5.27mg，隐丹参酮 3.02 mg、二氢丹参酮 1.30 mg、丹参酮 I 2.29 mg、原儿茶醛 0.13 mg、人参皂苷 Rg1 23.81 mg、人参皂苷 Rb1 20.78 mg；丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛:三七皂苷 R1 的重量比为 6.6:102:17:0.29:12。

实施例 3：取丹参药材 100Kg（产地：山东，批号 0501021）、三七药材（产地：云南，批号 0501001）30Kg，丹参药材碎为小段，乙醇浸泡 1 小时，热回流 1 小时，滤过，收集乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 I；药渣以 80%乙醇热回流 0.5 小时，滤过，收集 80%乙醇滤液，回收乙醇并浓缩得浸膏 II；最后以水热回流 2 小时，滤液浓缩得浸膏 III。将三七粉碎成 80 目以上的细粉，与丹参浸膏 I、II 和 III 混匀，在 75℃左右干燥 70h，共得干膏 50.66Kg，水分≤5%。

用上述的高效液相色谱法方法测定，每 1g 干膏中含丹参酮 II A 2.56mg，丹酚酸 B 50.03mg，丹参素 7.34mg，三七皂苷 R1 6.15mg，隐丹参酮 2.60 mg、二

氢丹参酮 1.04 mg、丹参酮 I 1.90 mg、原儿茶醛 0.16 mg、人参皂苷 Rg1 24.25 mg、人参皂苷 Rb1 19.99 mg; 丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛:三七皂苷 R1 的重量比为 5.7:112:16:0.36:14。

实施例 4: 取丹参药材 20Kg (产地: 山东, 批号 0502002)、三七药材 (产地: 云南, 批号 0502001) 6Kg, 丹参药材碎为小段, 乙醇浸泡 1.5 小时, 热回流 0.5 小时, 滤过, 收集乙醇滤液, 回收乙醇并浓缩得浸膏 I; 药渣以 80%乙醇热回流 0.5 小时, 滤过, 收集 80%乙醇滤液, 回收乙醇并浓缩得浸膏 II; 最后以水热回流 1.5 小时, 滤液浓缩得浸膏 III。将三七粉碎成 80 目以上的细粉, 与丹参浸膏 I、II 和 III 混匀, 在 70℃ 左右干燥 83h, 共得干膏 9.70Kg, 水分 ≤ 5%。

用上述的高效液相色谱法方法测定, 每 1g 干膏中含丹参酮 II A 2.75mg, 丹酚酸 B 50.46mg, 丹参素 7.00mg, 原儿茶醛 0.18mg, 三七皂苷 R1 5.55mg; 丹参酮 II A : 丹酚酸 B : 丹参素 : 原儿茶醛:三七皂苷 R1 的重量比为 6:113:16:0.4:12。

实施例 5、制剂的制备

颗粒剂: 取实施例 2 的干膏 7.2Kg, 加辅料 (糖粉) 制成颗粒 20.2Kg。该颗粒用 HPLC 法测定每 g 含丹参酮 II A 0.83mg, 丹酚酸 B 19.72mg, 丹参素 3.09mg, 原儿茶醛 0.05mg, 三七皂苷 R1 1.82mg。口服剂量: 每次 2g, 每日 3 次。

胶囊剂: 取实施例 2 的干膏 7.2Kg, 加辅料 (淀粉) 制成颗粒 9.4Kg, 装胶囊。该胶囊颗粒用 HPLC 法测定每 g 含丹参酮 II A 1.78mg, 丹酚酸 B 42.37mg, 丹参素 6.64mg, 三七皂苷 R1 3.91mg。口服剂量: 每次 1~2 胶囊, 每日 3 次。

小丸: 取实施例 3 的干膏 10Kg, 加辅料 (淀粉) 制成小丸 12.7 Kg (每 10 丸重 0.3g)。小丸用 HPLC 法测定 10 丸含丹参酮 II A 0.70mg, 丹酚酸 B 13.79mg, 丹参素 1.93mg, 原儿茶醛 0.03 mg, 三七皂苷 R1 1.25mg。口服剂量: 每次 30 丸, 每日 3 次。

水丸: 取实施例 3 的干膏 10Kg, 加辅料 (淀粉) 制成水丸 12.0 Kg。该水丸每 10 丸含丹参酮 II A 0.68mg, 丹酚酸 B 13.77mg, 丹参素 1.97mg, 原儿茶醛 0.03 mg, 三七皂苷 R1 1.32mg。口服剂量: 每次 30 丸, 每日 3 次。

小蜜丸: 取实施例 3 的干膏 10Kg, 加辅料 (蜂蜜、淀粉) 制成小蜜丸 13 Kg。该小蜜丸每 10 丸含丹参酮 II A 0.71mg, 丹酚酸 B 14.09mg, 丹参素 1.93mg, 原儿茶醛 0.03 mg, 三七皂苷 R1 1.18mg。口服剂量: 每次 30 丸, 每日 3 次。

大蜜丸：取实施例3的干膏10Kg，加辅料（蜂蜜）制成大蜜丸12.2Kg。该每丸含丹参酮II A 2.09mg，丹酚酸B 42.52mg，丹参素 5.83mg，原儿茶醛 0.10 mg，三七皂苷 R1 3.75mg。口服剂量：每次1丸，每日3次。

下面用体内试验验证本发明产品对治疗老年痴呆症的效果：

1 实验材料

实验动物：SD大鼠，体重300-380g，雌雄不拘，SPF级。

药物及试剂：取实施例2的产品、市售复方丹参片、有效部位按成分含量配制的含量下限组和上限组。以上药物实验前粉碎，过100目筛，溶于新鲜蒸馏水中，配成浓度为6%的水溶液贮存于4℃冰箱中备用。D-半乳糖（AMRSCO公司分装），Ibotenic acid(IBO)（Sigma公司）。

实验仪器：大鼠立定位仪，牙科钻车。

2 实验内容

2.1 对老年痴呆动物空间认知障碍的影响（Morris水迷宫行为学实验）

2.1.1 实验方法

采用Ibotenic acid(IBO)致大鼠老年痴呆模型，建成模型后，将存活动物随机分为10组。各组连续灌胃2个月，进行Morris行为学实验，连续6天。实验第一阶段：1~5天为训练阶段，实验第二阶段：第6天进行行为学实验。

2.1.2 实验结果

结果数据以SPSS10.0软件处理，见表2：

表2 实施例2丹参制剂对老年痴呆模型动物空间认知障碍改善的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 g/kg	至各象限跨越原平台的次数/次			
			R	P	L	0
手术对照组	10	-	6.70±2.95	9.25±2.98	9.31±2.75	5.52±2.31
模型组	9	-	4.40±3.37	5.27±2.00	6.47±2.09	3.55±2.10
石杉碱甲	8	2.3×10 ⁵	7.25±4.76	8.45±2.64	6.83±3.87	4.83±3.37
复方丹参片	7	0.32	6.67±1.50*	8.11±4.89	8.66±3.40	5.50±2.93
复方丹参滴丸	8	0.089	7.18±1.88	6.78±2.45	7.21±3.40	6.99±2.37
本发明有效成分含量下限组 [△]	8	0.30	7.03±1.25*	8.22±3.48	8.88±2.85	6.72±3.17

本发明有效成分含量上限组 [△]	8	0.30	8.49±1.83	7.47±2.69	7.90±3.46	7.40±2.28
实施例2样品低剂量组	7	0.16	8.23±0.79**	7.83±2.95	9.27±3.12	7.77±1.93
实施例2样品中剂量组	9	0.30	7.56±1.39*	7.90±3.33	8.65±3.54	7.85±1.09
实施例2样品高剂量组	8	0.44	6.97±3.51	8.33±3.55	8.23±4.22	6.96±1.73

注：与模型组比较，*P<0.05，** P<0.01；[△]为本发明药用活性有效部位按成分含量配制。

结果表明，实施例2丹参制剂及复方丹参片对AD大鼠的空间认知障碍有明显改善作用。实施例2低、中剂量组、有效成分含量下限组与模型组比较差异性显著，其中中剂量组与模型组比较差异性高度显著。高剂量组、有效成分含量上限组与模型组比较无显著性差异，说明有效成分含量在一定范围内即可，显著提高它们的含量并不能增加有效性。丹参滴丸组与模型组比较无显著性差异。实施例2丹参制剂与复方丹参片组比较，从实施例2丹参制剂与模型组比较结果和复方丹参片与模型组比较结果来看，实施例2丹参制剂在差异水准上比复方丹参片更显著，证明疗效更好。

2.2 对老年痴呆动物记忆功能障碍改善的影响

2.2.1 实验方法

大鼠避暗箱实验。将大鼠随机分为10组。给药2个月后，置于避暗箱明箱内，当大鼠进入暗箱后，电击1秒，取出。1周后重复实验，记录大鼠由明箱进入暗箱的时间及次数、个数，结果见表3。

表3 实施例2的丹参制剂对老年痴呆模型动物记忆功能障碍改善的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 g/kg	实验结果		
			潜伏期/s	5分钟内进入次数	进入暗室鼠数
手术对照组	10	-	233.3±125.7**	0.70±0.95*	2
模型组	9	-	66.4±102.09	3.40±2.87	8
石杉碱甲	9	2.3×10 ⁵	186.8±93.87	0.85±1.76*	1
复方丹参片	9	0.32	243.5±165.5*	0.42±0.79*	2
复方丹参滴丸	8	0.089	177.5±106.3*	1.67±1.42	1

本发明有效成分含量下限组 [△]	9	0.30	229.2±136.8*	0.78±1.40*	3
本发明有效成分含量上限组 [△]	7	0.30	184.1±100.6*	1.45±1.66	2
实施例2样品低剂量组	9	0.16	288.2±113.1**	0.48±0.98*	2
实施例2样品中剂量组	7	0.30	246.6±104.8**	0.78±0.31**	3
实施例2样品高剂量组	8	0.45	322.2±59.2**	0.87±0.88*	3

注：与模型组比较，*P<0.05，** P<0.01；[△]为本发明药用活性有效部位按成分含量配制。

结果表明，实施例2提供的丹参制剂对AD大鼠的记忆功能障碍有明显改善作用。实施例2低、中、高剂量组与模型组比较差异性显著（P <0.05~0.01）。阳性药物石杉碱甲、复方丹参片也有一定作用。实施例2丹参制剂、复方丹参片、有效成分含量下限组和上限组与模型组比较差异性显著，而实施例2低、中、高剂量组在差异水准上比复方丹参片更显著（即高度显著），证明疗效更好。有效成分含量在一定范围内即可，显著提高它们的含量并不能增加有效性。