



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101856418 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 13

(21) 申请号 201010155728. 3

(22) 申请日 2010. 04. 27

(71) 申请人 贵阳春科药业技术研发有限公司

地址 550008 贵州省贵阳市金阳新区科技大厦 B 栋 6 楼

(72) 发明人 周强 皮海燕 罗阳洋 柳大勇

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 程新敏

(51) Int. Cl.

A61K 36/78 (2006. 01)

A61K 36/9062 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 1 页

(54) 发明名称

防治肾炎的药物制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种防治肾炎的药物制剂及其制备方法,它主要是由茅莓、车前草、鱼腥草、肾茶为原料药制成口服制剂或外用制剂,或者与玉米须、枸杞子、益智仁药材中的部分或全部配伍使用。本发明提供的配方具有清热利湿,宣肺益肾,健脾消肿之功效,对肺失宣肃、脾肾亏虚所致的肾炎水肿、头昏、耳鸣、咳嗽、神疲乏力、少气懒言、面色萎黄、脘腹满闷、时有恶心、腰膝酸软、纳差食少、阳萎早泄、舌质胖、脉沉细有很好的疗效,且其使用安全,无毒副作用,不产生耐药性,是一种安全、有效、质量可控的防治肾炎的中药新药。

1. 一种防治肾炎的药物制剂,其特征在于:它主要是由下列重量百分比的原料药制成:茅莓 10%~40%、车前草 25%~35%、鱼腥草 20%~30%、肾茶 15%~25%。

2. 按照权利要求 1 所述防治肾炎的药物制剂,其特征在于:各原料药的重量百分比为:茅莓 25%、车前草 30%、鱼腥草 25%、肾茶 20%。

3. 按照权利要求 1 所述防治肾炎的药物制剂,其特征在于:其中原料药还包括玉米须、枸杞子、益智仁,各原料药的重量百分比为:茅莓 5%~20%、车前草 14%~16%、鱼腥草 11%~14%、肾茶 9%~11%、玉米须 24%~26%、枸杞子 11%~14%、益智仁 11%~14%。

4. 按照权利要求 3 所述防治肾炎的药物制剂,其特征在于:各原料药的重量百分比为:茅莓 12.5%、车前草 15%、鱼腥草 12.5%、肾茶 10%、玉米须 25%、枸杞子 12.5%、益智仁 12.5%。

5. 一种如权利要求 1 或 2 所述防治肾炎的药物制剂的制备方法,其特征在于:取茅莓、车前草、鱼腥草、肾茶四味药材,加处方总量的 5~10 倍水煎煮 1~3 次,每次煎煮 1~3 小时,滤过,滤液浓缩至 60℃相对密度为 1.25~1.35 的浸膏,然后按常规制剂工艺制成不同的药物制剂。

6. 按照权利要求 5 所述防治肾炎的药物制剂的制备方法,其特征在于:所述的药物制剂为口服制剂或外用制剂,其中口服制剂包括汤剂、颗粒剂、散剂、口服液、糖浆剂、膏滋、丸剂、片剂、硬胶囊或软胶囊。

7. 一种如权利要求 3 或 4 所述防治肾炎的药物制剂的制备方法,其特征在于:取茅莓、车前草、鱼腥草、肾茶、玉米须、枸杞子、益智仁七味药材,加处方总量的 5~10 倍水煎煮 1~3 次,每次煎煮 1~3 小时,滤过,滤液浓缩至 60℃相对密度为 1.25~1.35 的浸膏,然后按常规制剂工艺制成不同的药物制剂。

8. 按照权利要求 7 所述防治肾炎的药物制剂的制备方法,其特征在于:所述的药物制剂为口服制剂或外用制剂,其中口服制剂包括汤剂、颗粒剂、散剂、口服液、糖浆剂、膏滋、丸剂、片剂、硬胶囊或软胶囊等。

防治肾炎的药物制剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种防治肾炎的药物制剂及其制备方法,属于中药技术领域。

背景技术

[0002] 肾炎是一种与感染有关的免疫反应性疾病,肾炎属于常见病、多发病,它没有年龄限制,既可发生于儿童,又可发生于成年人,尤其以儿童及青壮年比较多见。据中华医学会儿科肾脏学组统计全国 21 省市 2 岁~10 岁儿童为 9.84%,原发性肾小球肾炎是我国最常见的肾小球疾病,青壮年为原发性和继发性肾小球肾炎的高发人群。尤以 25 岁~34 岁年龄阶段发病率最高,结缔组织病的高发年龄也为 25 岁~34 岁。原发性肾小球肾炎占 26.8%,继发性肾小球肾炎占 72.8%,遗传性肾炎占 0.4%。原发性肾炎男女比例为 1.81:1,继发性肾炎男女之比为 0.46:1。临床上分为急性肾炎和慢性肾炎。急性肾炎病前及 1~3 周多有上呼吸道感染,起病后有浮肿血尿、高血压三大症状,慢性肾炎发病年龄多在青壮年期,具有水肿、蛋白尿、血尿、管型尿,高血压以及不同程度的肾功能减退。中医认为急慢性肾炎的发生系由外邪侵袭,脾肾亏损所致。急性肾小球肾炎(简称急性肾炎)是一种常见病,多数发生在感染后,尤其是溶血性链球菌感染后,也可见于其他感染。急性肾小球肾炎的临床表现主要有:多在上呼吸道感染、猩红热感染、皮肤化脓性感染 2~3 周后出现症状,如发热,头痛,恶心,呕吐,食欲不振,疲乏无力等,继而出现血尿,以肉眼血尿为多见。水肿,多先出现在面部,特别是以眼睑为甚,面部及眼睑肿胀,色苍白,呈现所谓的肾炎面容。下肢及阴囊水肿较甚,水肿进展较快。相当多的人出现高血压,成年人一般为 18.7kPa~22.7kPa / 12.0kPa~14.7kPa,血压增高往往与水肿同时出现,伴随出现相应的症状和体征。尿液检查可见蛋白尿,管型尿,红细胞,肌酐清除率下降。抗链“O”阳性,血沉加快等。慢性肾小球肾炎(简称慢性肾炎)是一组病因不同,病理变化多样的慢性肾小球疾病。临床特点为病程长,病情逐渐发展,有蛋白尿、血尿及不同程度高血压和肾功能损害,于患病 2~3 年或 20~30 年后,终将出现肾功能衰竭。慢性肾小球肾炎简称慢性肾炎,是以蛋白尿、血尿、高血压、水肿为基本临床表现,病情迁延,缓慢进展,可有不同程度的肾功能减退,严重者将发展为慢性肾衰竭的一但肾小球病而危及生命。笔者根据西医临床研究及病症常见表现,结合中医的基础理论认为:慢性肾炎的中医基本病机应为本虚标实——脾肾亏损,外邪侵袭,脏腑功能不足,导致湿浊停滞,瘀血内阻,而湿热瘀毒又反过来加重对正气的损伤,正虚邪实,互为因果夹杂致病,使疾病缠绵难愈。

[0003] 随着人口老龄化和人们生活方式的改变,传统的感染性疾病正在减少,慢性免疫性疾病正在成为威胁人类健康的第一因素。相对于其他慢性疾病,慢性肾脏病已经成为威胁人类健康的最常见的疾病之一。患有慢性肾脏病,如果得不到满意的控制终将进入慢性肾功能不全和尿毒症。为此,现在医学界已普遍认同慢性肾脏病已成为人类健康生命的“沉默杀手”,其原因是除了肾病综合征外,其他慢性肾病很少有自觉症状,也就是说,大多数慢性肾病早期只有尿的改变,而无其他症状,故在患病早期多被忽视。一旦在尿改变的基础上出现高血压、贫血、消化道反应(如:恶心、呕吐等),则大多数患者就已经进入了慢性肾功能

不全或尿毒症期。到目前为止,肾炎,尤其是慢性肾炎尚无很好的治疗药物,临床上多用利尿剂、血管紧张素转化酶抑制剂等,这类药品也只是对症治疗,治标不治本,同时该类药品毒副作用较大,长期服用,会诱发其他疾病,肝肾功能损害作用。中医认为肾炎病是风、热、火、湿、燥、淤、毒等兼夹客于血中,侵犯肾脏。如感冒发烧咽炎、生疮疖等感染,都对肾脏血流过滤有影响,还有就是其它病引起继发性肾炎。肾炎要是单火热炎症,用西药有可能治愈,如肾炎被风和热、湿和热、湿和毒、燥热和血淤等夹杂缠绕肾时,西药只能缓解症状,不能痊愈。这时中医有全方位的治疗方案,并能益气养血固本,因此效果非常明显。为了开发出能安全、有效防治肾炎的中药,申请人进行了大量的探索和研究。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种能安全、有效防治肾炎的药物制剂及其制备方法,本发明的药物药效快、无毒副作用,是一种安全、有效、质量可控的防治肾炎的中药新药。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下的技术方案:防治肾炎的药物制剂,它主要是由下列重量百分比的原料药制成:茅莓 10%~40%、车前草 25%~35%、鱼腥草 20%~30%、肾茶 15%~25%。

[0006] 上述防治肾炎的药物制剂中,各原料药的用量按照重量百分比计算,优选为:茅莓 25%、车前草 30%、鱼腥草 25%、肾茶 20%。

[0007] 上述防治肾炎的药物制剂的制备方法为:取茅莓、车前草、鱼腥草、肾茶四味,加处方总量的 5~10 倍水煎煮 1~3 次,每次煎煮 1~3 小时,滤过,滤液浓缩至 60℃ 相对密度为 1.25~1.35 的浸膏,然后按常规制剂工艺制成不同的药物制剂。

[0008] 上述防治肾炎的药物制剂的制备方法中,所述的药物制剂为口服制剂或外用制剂,其中口服制剂包括汤剂、颗粒剂、散剂、口服液、糖浆剂、膏滋、丸剂、片剂、硬胶囊或软胶囊等。

[0009] 前述防治肾炎的药物制剂中,为了达到更好的治疗效果,还可以加入原料药玉米须、枸杞子、益智仁,各原料药的重量百分比为:茅莓 5%~20%、车前草 14%~16%、鱼腥草 11%~14%、肾茶 9%~11%、玉米须 24%~26%、枸杞子 11%~14%、益智仁 11%~14%。

[0010] 上述防治肾炎的药物制剂中,各组分的用量优选为:茅莓 12.5%、车前草 15%、鱼腥草 12.5%、肾茶 10%、玉米须 25%、枸杞子 12.5%、益智仁 12.5%。

[0011] 上述防治肾炎的药物制剂的制备方法为:取茅莓、车前草、鱼腥草、肾茶、玉米须、枸杞子、益智仁七味药材,加处方总量的 5~10 倍水煎煮 1~3 次,每次煎煮 1~3 小时,滤过,滤液浓缩至 60℃ 相对密度为 1.25~1.35 的浸膏,然后按常规制剂工艺制成不同的药物制剂。

[0012] 上述防治肾炎的药物制剂的制备方法中,所述的药物可以制备成口服制剂或外用制剂,其中口服制剂包括汤剂、颗粒剂、散剂、口服液、糖浆剂、膏滋、丸剂、片剂、硬胶囊或软胶囊等。

[0013] 本发明的组方药物特性:茅莓:苦、涩,凉。清热凉血,散结止痛,利尿消肿。用于感冒发热,痢疾,肠炎,肝炎,肝脾肿大,肾炎水肿,泌尿系感染,结石,月经不调,白带。车前草:寒;甘;归肝、肾、肺、小肠经。清热利尿,祛痰,凉血,解毒。用于水肿尿少,热淋涩痛,暑湿泻

痢,痰热咳嗽。鱼腥草:辛;寒。肝;肺经。清热解毒,排脓消痈,利尿通淋。主治肺痈吐脓,痰热喘咳,热痢,热淋。枸杞子:甘,平。归肝、肾经。补肾益精,养肝明目,补血安神,生津止渴,润肺止咳。治肝肾阴亏,腰膝酸软,头晕,目眩,目昏多泪,虚劳咳嗽,消渴,遗精。益智仁:辛,温。入脾,肾经。温脾,暖肾,固气,涩精。治冷气腹痛,中寒吐泻,多唾,遗精,小便余沥,夜多小便。玉米须:甘,平。归肾、肝、胆经。利尿,泄热,平肝,利胆。治肾炎水肿,脚气,黄疸肝炎,高血压,胆囊炎,胆结石,糖尿病。肾茶,性凉、味微苦、归肾、膀胱经、具有清热除湿、排石化石、利尿通淋、排毒抗菌、抑制慢性肾衰竭之功能,有很强的药效,长期饮用可改善并增强肾功能。

[0014] 本发明的方解:中医理论讲,肾是人体水液代谢的重要器官,纳气、生髓、藏精。人体生命活动的基础物质是气、血、体液,心与肾、肝与肾、脾与肾,才能相互支配。所以,当肾脏发生炎症时,便会引起人体水肿、尿急、尿频、尿不出、尿血等症状。依据大量的医学资料证明,肾脏具有促进尿液生成,排泄机体代谢产物的功能,保持机体内环境净化因素的相对稳定,维持酸碱平衡,调节血压,因而肾脏的负担很重。慢性肾炎的发生主要责之于脾肾,与肺、肝等脏腑密切相关。盖肾主藏精,主水,司前后二阴,为人体阴阳之根本。若肾虚不固,不能分清别浊,精微物质外泄,则出现蛋白尿;肾虚气化不利,水液潴留,则可出现水肿。脾为后天之本,主运化水谷精微,为制水之脏。若脾虚不能运化水谷,导致水湿停聚,泛滥肌肤而发为水肿;脾虚不能固摄精微,清气不升,精微物质反而下注,故出现蛋白尿。肺为水之上源,主通调水道。若外邪侵袭,肺卫失和,郁闭肺气,水道闭塞,水液内停而为水肿。肝主疏泄,若七情伤肝、肝气郁结,导致三焦气机不畅,水液运行障碍,停聚力水肿。诚如《景岳全书·肿胀》所说:凡水肿等证,乃肺脾肾三脏相干之病。盖水为至阴,故其本在肾;水化于气,故其标在肺;水惟畏土,故其制在脾。治法多为清热利湿为主,兼以补肾健脾,宣肺益气固表等。

[0015] 本方主治肺失宣肃、脾肾亏虚所致的肾炎水肿、头昏、耳鸣、咳嗽、神疲乏力、少气懒言、面色萎黄、脘腹满闷、时有恶心、腰膝酸软、纳差食少、阳萎早泄、舌质胖、脉沉细,方中以茅莓清热利尿、凉血散结为主,是为君药;以车前草、肾茶、玉米须为臣药,助君药清热利尿之力;以鱼腥草清热解毒;排脓消痈;利尿通淋;以枸杞子、益智仁补肝肾、健脾胃;诸药合用,共收清热利湿,宣肺益肾,健脾消肿之功。

[0016] 本发明的功能主治:本发明药物具有清热利湿,宣肺益肾,健脾消肿。用于肺失宣肃、脾肾亏虚所致的肾炎水肿、头昏、耳鸣、咳嗽、神疲乏力、少气懒言、面色萎黄、脘腹满闷、时有恶心、腰膝酸软、纳差食少、阳萎早泄、舌质胖、脉沉细。

[0017] 为了验证本发明药物具有良好的治疗效果,申请人进行了一系列试验研究,具体如下:

一、临床应用

1、一般资料:临床共收治患者120例,男性78例,女性42例,年龄大者65岁,最小者14岁,病程最长者7年,最短者15天。本临床随机分成治疗组80例,对照组40例,两组无明显差异。

[0018] 2、治疗方法:治疗组按《中医病症诊断疗效标准》施治,证候:肺失宣肃、脾肾亏虚所致的肾炎水肿、头昏、耳鸣、咳嗽、神疲乏力、少气懒言、面色萎黄、脘腹满闷、时有恶心、腰膝酸软、纳差食少、阳萎早泄、舌质胖、脉沉细。临床检查早期出现蛋白尿,亦可见血尿,可出

现透明管型,上皮细胞。治以清热利湿,宣肺益肾,健脾消肿。服药方法:以茅莓 15g、车前草 18g、鱼腥草 15g、肾茶 12g、枸杞子 15g、益智仁 15g、玉米须 30g。煎汤内服,一日 1 剂,15 天为一疗程。对照组用地塞米松,每天 20mg 至 40mg,15 天为一疗程。

[0019] 3、疗效观察

3.1 观察项目:治疗前后全部患者均作血常规、尿常规、尿素氮、血压检测。

[0020] 3.2 疗效标准:有效:水肿全部消退,其他症状消失,实验室检查恢复正常;显效:水肿及其他症状减轻,实验室检查有改善;无效:水肿及其他症状实验室检查无变化。

[0021] 3.3 结果:治疗组 80 例,有效 32 例,显效 43 例,无效 5 例,总有效率为 93.75%;对照组 40 例,有效 12 例,显效 22 例,无效 6 例,总有效率为 85%。治疗组疗效明显高于对照组。见下表。

组别	病例数	有效	显效	无效	总有效率
治疗组	80例	32例(40%)	43例(53.75%)	5例(6.25%)	93.75%
对照组	40例	12例(30%)	22例(55%)	6例(15%)	85%

[0022] 4、讨论:慢性肾炎为内科难治疾病,西药疗效不够满意,且副作用大。中药在治疗慢性肾炎疗效满意,该方有清热利湿,宣肺益肾,健脾消肿等功效,值得临床推广应用。

[0023] 二、初步药效学试验及配方对比试验研究

采用动物实验,对本发明制剂体外抗菌、抗炎作用及大鼠实验性肾炎模型的作用进行了药效学初筛及配方对比研究,现将实验结果报告如下。

[0024] 1、实验材料

1.1 实验动物:昆明种小鼠,清洁级,体重 18-22g,大鼠,体重 180-220g,由重庆中药研究院实验动物中心提供。

[0025] 1.2 药品与试剂:受试药:本发明制剂肾炎 1 号和肾炎 2 号,为贵阳春科药业研发有限公司提供,规格:各 4 包×100g,临床用法与用量:一日 3 次,0.75g/次,临用时用蒸馏水配成混悬液备用;阳性对照药:中药雷公藤多甙片,黄石飞云制药有限公司,规格 10mg/片,每日每千克体重 1~1.5mg,分 3 次饭后服;化药醋酸泼尼松片,天津药业焦作有限公司,国药准字 H41020636,规格 0.5mg/片,一日 10-60mg。二甲苯为重庆化学试剂厂产品,批号:20060104。

[0026] 1.3 实验器材:BS110S 精密电子天平(北京赛多利斯股份公司),SHA-C 控温水浴振荡器(深圳天南海北实业公司),计时器(贵阳恒因生物公司)。

[0027] 2、方法与结果

2.1 体外抗菌试验

2.1.1 方法采用体外抗菌试验,测定受试药对金黄色葡萄球菌、变形杆菌、大肠杆菌、新生隐球菌、粪链球菌的最低抗菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。(1) 根据不同菌种选用不同培养基。(2) 将本发明制剂稀释制成不同药物浓度的培养基。(3) 分别定量接种不同的试验菌进行培养,观察测定管内能抑制该菌生长的 MIC。

[0028] 2.1.2 结果体外抑菌试验显示,本发明制剂 1 号在较低浓度(2mg/ml-5mg/ml)和配方 2 号在较低浓度(1mg/ml-3mg/ml)对变形杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有显著的抑

菌作用,配方2号优于配方1号。

[0029] 表1 本发明制剂的抑菌作用

菌种名称	菌种来源	最低抑菌浓度(MIC)	
		配方1号	配方2号
变形杆菌	CMCC6380	3mg/ml	1mg/ml
产气杆菌	CMCC45103	20mg/ml	15mg/ml
大肠杆菌	CMCC44185	5mg/ml	3mg/ml
粪链球菌	CMCC32135	15mg/ml	10mg/ml
金黄色葡萄球菌	CMCC26003	2mg/ml	1mg/ml

2.2 对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响

2.2.1 方法 取小鼠80只,体重为20~22g,随机分为8组,每组10只,分别为空白对照组、本发明制剂配方1号和2号(低剂量、中剂量、高剂量)组,阳性药组。灌胃给予生理盐水,不同浓度受试药本发明制剂(0.375g/kg、0.75g/kg、1.5g/kg)和阳性药(雷公藤多甙片:0.015g/kg),给药容积10ml/kg,连续给药5d,每天一次,末次给药1h后,将动物右耳前后两面涂二甲苯0.02ml/只,左耳不做任何处理。4h后将动物断椎处死,剪下双耳,用9mm直径打孔器分别在同一部位打下圆耳片,精密电子天平称重,每鼠右耳重量减去左耳重量为肿胀程度,并按公式计算肿胀抑制率。试验结果以平均值标准差表示,结果采用t检验, $P<0.05$ 显示具有显著性。

[0030] 2.2.2 结果 表2结果显示,与对照组比较,本发明制剂配方1号和配方2号1.5g/kg组对二甲苯致小鼠耳肿胀均有明显抑制作用,肿胀度明显减少,抑制率为95.8%($P<0.05$);本发明制剂配方1号和配方2号0.375g/kg、0.75g/kg组对二甲苯致小鼠耳肿胀均有一定的抑制作用趋势,但与对照组比较无明显统计学差异,不同配方之间其配方2号约优于配方1号,但无明显统计学差异。

[0031] 表2 本发明制剂对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	肿胀度(mg)	肿胀抑制率(%)
空白对照组	10	—	4.26 ± 2.14	—
配方1号低剂量组	10	0.375	2.76 ± 2.57	35.2
配方1号中剂量组	10	0.75	1.56 ± 1.98*	63.4
配方1号高剂量组	10	1.5	0.18 ± 2.45*	95.8
配方2号低剂量组	10	0.375	2.28 ± 1.69	46.5
配方2号中剂量组	10	0.75	1.13 ± 2.28*	73.5
配方2号高剂量组	10	1.5	0.14 ± 1.92*	96.7
雷公藤多甙片组	10	0.015	0.23 ± 2.37*	94.6

2.3 对小牛血清白蛋白所致大鼠实验性肾炎模型的防治作用

2.3.1 方法 清洁级SD大鼠(全雄),随机分为9组,每组10只,即:正常组、模型组、阳性药醋酸泼尼松组(0.005g/kg)、本发明制剂配方1号和配方2号剂高剂量(1.0g/kg)、中(0.5g/kg)、低剂量组(0.25g/kg)。各组大鼠给药35天,正常组及模型组均灌胃给予同体积的蒸馏水。于第14天,除正常组外,其余大鼠均一次性尾静脉注射小牛血清白蛋白1g/kg。给药35天后,将大鼠置于代谢笼,收集24小时尿,并测定尿蛋白含量。最后将大鼠处死,解

剖取两侧。肾脏固定于 10% 甲醛中,作病理组织学检验。

[0032] 2.3.2 结果 实验结果表明,模型组大鼠 24 小时尿蛋白排出量明显高于正常组,而 24 小时尿量未见明显变化。治疗慢性肾炎的中药给药组大鼠 24 尿蛋白排出量比模型组明显减少。病理检查结果表明,模型组与正常对照组比较,其肾小球数无明显变化,但蛋白管型及出血灶明显高于正常对照组,而本发明制剂各给药组蛋白管型明显减少,高剂量组 (1.0g/kg) 及中剂量组 (0.5g/kg) 与模型组相比,其出血灶明显减少,且效果优于本实验所用的阳性药。表明本发明制剂对小牛血清白蛋白引起的大鼠肾炎有明显的防治作用。配方 2 号约优于配方 2 号,但无明显统计学差异。

[0033] 表 3 本发明制剂对大鼠肾炎尿蛋白总量的影响 ($X \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	24 小时尿蛋白总量 (mg)		
		造型前	造型后	治疗后
正常对照组	-	13.58 $\pm$ 1.47	13.39 $\pm$ 1.47	13.26 $\pm$ 1.90
模型对照组	-	13.10 $\pm$ 1.74	116.08 $\pm$ 6.56 ^a	115.41 $\pm$ 6.08 ^a
配方 1 低剂量	0.25	12.99 $\pm$ 1.42	115.65 $\pm$ 4.70 ^a	79.19 $\pm$ 3.64 ^a
配方 1 中剂量	0.5	13.53 $\pm$ 1.00	115.67 $\pm$ 3.30 ^a	49.13 $\pm$ 3.57*
配方 1 高剂量	1.0	13.64 $\pm$ 1.14	116.32 $\pm$ 4.75 ^a	17.24 $\pm$ 1.23***
配方 2 低剂量	0.25	13.18 $\pm$ 1.56	116.44 $\pm$ 3.83 ^a	68.44 $\pm$ 2.86 ^a
配方 2 中剂量	0.5	13.47 $\pm$ 1.42	116.85 $\pm$ 4.36 ^a	44.27 $\pm$ 1.87*
配方 2 高剂量	1.0	12.87 $\pm$ 1.39	115.72 $\pm$ 3.45 ^a	14.18 $\pm$ 3.16***
醋酸泼尼松组	0.005	13.29 $\pm$ 1.65	115.22 $\pm$ 4.55 ^a	48.64 $\pm$ 2.59*

^a: P<0.001 (各组造型后及模型组治疗后与正常对照组比较),

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 (给药组与模型对照组比较)

3、结论

3.1 本发明制剂在体外抗菌实验中,对生殖道等常见致病菌:大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、产气杆菌、粪链球菌有抗菌作用,提示本发明制剂对上述致病菌所致泌尿道感染等能产生防治作用。

[0034] 3.2 本发明制剂 1.5g/kg 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀产生明显的抑制作用,提示该药有抑制急性炎症渗出作用。

[0035] 3.3 本发明制剂 1.0g/kg 对小牛血清白蛋白引起的大鼠肾炎有明显的防治作用,提示本发明制剂对肾炎能产生防治作用。

[0036] 3.4 本发明制剂配方 2 号 (茅莓 12.5%、车前草 15%、鱼腥草 12.5%、肾茶 10%、玉米须 25%、枸杞子 12.5%、益智仁 12.5%) 在不同试验中约优于配方 1 号 (茅莓 25%、车前草 30%、鱼腥草 25%、肾茶 20%)。提示本发明制剂配方 2 号对肾炎具有更好的防治作用。

[0037] 三、制剂制备工艺研究

1、处方:茅莓 262.5g、车前草 315g、鱼腥草 262.5g、肾茶 210g、枸杞子 262.5g、益智仁 262.5g、玉米须 525g。

[0038] 2、制法:取处方药药材,加水煎煮两次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.25 ~ 1.35 (60℃) 的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,灌装,制成 1000 粒,即得。

[0039] 4、工艺研究

4.1 提取工艺确定

4.1.1 处方分析：

(1) 茅莓：性平，味甘、酸。具有散瘀，止痛，解毒，杀虫。用于吐血、跌打刀伤、产后瘀滞腹痛、痢疾、痔疮、疥疮。本品叶含鞣质；预试茎含酚类、鞣质。在体内显抗肿瘤的治疗作用。

[0040] (2) 车前草：甘，寒，具有利尿，清热，明目，祛痰，用于小便不通，淋浊，带下，尿血，黄疸，水肿，热痢泄泻，鼻衄，目赤肿痛，喉痛，咳嗽，皮肤溃疡。含车前甙、桃叶珊瑚甙、乌苏酸、B-谷甾醇、正三十一烷、棕榈酸 B-谷甾酸酯、棕酸豆甾醇酯、维生素 B、维生素 C、以及车前果胶。蛋白质、琥珀酸、腺嘌呤、胆碱、梓醇、硬脂酸、花生酸、亚麻酸、亚没酸等脂肪酸。有利尿作用，并能增加尿素尿酸的排泄。能作用支气管分泌物增加呼吸运动变缓而有却化痰止咳作用。

[0041] (3) 鱼腥草：辛、微寒。具有清热解毒；排脓消痈；利尿通淋。主肺痈吐脓；痰热喘咳；喉蛾；热痢；痈肿疮毒；热淋。地上部分含挥发油、内含抗菌有效成分癸酰乙醛，月桂醛， α -蒎烯和芳樟醇。有抗菌的作用、抗病毒作用。

[0042] (4) 肾茶：性凉、味微苦、归肾、膀胱经、具有清热除湿、排石化石、利尿通淋、排毒抗菌、抑制慢性肾衰竭之功能，有很强的药效，长期饮用可改善并增强肾功能。

[0043] (5) 枸杞子：甘，平。具有滋补肝肾，益精明目。用于虚劳精亏，腰膝酸痛，眩晕耳鸣，内热消渴，血虚萎黄，目昏不明。含枸杞多糖、单糖、甜菜碱、脂肪酸、蛋白质和多肽、维生素 B1、维生素 B2、维生素 C、18 种氨基酸（含 8 种必需氨基酸）、微量元素（钙、锌、镁、铁、锰、磷等）。具有延缓衰老作用、抗肝损伤、降血糖、补肾功能。

[0044] (6) 益智仁：味辛；性温。具有温脾止泻摄涎；暖肾缩尿固精。主治脾胃虚寒；呕吐；泄泻；腹中冷育；口多唾涎；肾虚遗尿；尿频；遗精；白浊。含挥发油 1%-2%，油中含桉油精 55% 以及姜烯、姜醇、并含丰富的 B 族维生素及维生素 C，以及微量元素锰、锌、钾、钠、钙、镁、磷、铁、铜等。具有拮抗钙活性的作用、强心作用抗癌、控制回肠收缩等作用。

[0045] (7) 玉米须：性味：甘，平。具有利尿，泄热，平肝，利胆。治肾炎水肿，脚气，黄疸肝炎，高血压，胆囊炎，胆结石，糖尿病，吐血衄血，鼻渊，乳痈。含脂肪油 2.5%、挥发油 0.12%、树胶样物质 3.8%、树脂 2.7%、苦味糖甙 1.15%、皂甙 3.18%、生物碱 0.05%。还含隐黄素、抗坏血酸、泛酸、肌醇、维生素 K、谷甾醇、豆甾醇、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、草酸等。治疗慢性肾炎、肾病综合征、急性溶血性贫血并发血红蛋白尿。

[0046] 4.1.2 综上所述，结合处方中各药材的性质特点，本制剂决定采用水提法，现将其实验结果报告如下。

[0047] 4.2 煎煮工艺研究

4.2.1 因素水平确立：影响煎煮的因素主要有以下几个方面：加水量、煎煮时间、煎煮次数等。因此我们对这三个主要因素进行了 3 因素 3 水平的正交考察，以优选最佳工艺参数。正交试验的因素水平表见表 4。

[0048] 表 4 煎煮正交试验因素水平表

水 平	因 素		
	加水量 (倍) A	煎煮时间 (小时) B	煎煮次数 (次) C
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

4.2.2 指标选择: 试验拟采用综合评分法进行工艺条件优选, 由于干膏收率与效量不成正比关系, 规定其权衡分为 30 分; 60% 乙醇浸出物权衡分为 30 分; 处方中有效成分总黄酮, 能直接反映提取效果, 故规定这个指标的权衡分均为 40 分。

[0049] 4.2.3 样品制备: 取 1 处方量药材, 共计 120g, 按表 4 各正交试验条件进行水提, 药液用 300 目滤布过滤后, 浓缩并定容至 100ml。备用。

[0050] 4.2.4 干膏收率测定: 精密取各正交试验浓缩后的药液 25ml, 分别置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣于 105℃干燥 3 小时, 取出, 置干燥器中放置 30 分钟, 称重, 计算干膏收率。

[0051] 4.2.5 60% 乙醇浸出物测定: 精密取各正交试验浓缩后的药液 50ml, 分别加乙醇使含醇量达 60%, 静置冷藏 24 小时, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣于 105℃干燥 3 小时, 取出, 置于干燥器中放置 30 分钟, 称重, 计算浸出物收率。

[0052] 4.2.6 处方有效成分的测定

对照品的制备: 精密称取在 120℃干燥至恒重的芦丁对照品适量, 置 25ml 量瓶中, 加甲醇适量, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀; 精密量取 10ml, 置 100ml 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 制成每 1ml 中含芦丁 0.20192mg 的溶液, 即得对照品溶液。

标准曲线的制备: 精密量取对照品溶液 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 分别置 25ml 量瓶中, 各加水至 6.0ml, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1ml, 摇匀, 放置 6 分钟, 加 10% 硝酸铝溶液 1ml, 放置 6 分钟, 加氢氧化钠试液 10ml, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 分钟, 以相应试剂为空白; 照紫外-可见分光光度法, 在 510nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

供试品溶液的制备: 混匀, 取 0.2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25ml, 称重, 超声 10min, 放置室温, 用 70% 乙醇补足减失重量, 滤过, 精密吸取续滤液 1ml 至 25ml 容量瓶中, 加水至 5ml, 照标准曲线制备项下的方法, 自“加水至 6.0ml”起同法操作制得供试品溶液, 依法测定吸光度, 从标准曲线上读出供试品溶液中含无水芦丁的重量, 计算, 即得。

[0053] 4.2.7 绘制正交表分析优选最佳提取工艺

表 5 煎煮正交试验结果表

试验号	因 素				评价指标			
	A 加水量 (倍)	B 煎煮时间 (h)	C 煎煮次数	D 空白	干膏收率 (%)	60%乙醇 浸出物 (mg)	总黄酮提 取量 (mg)	综合评价
1	1	1	1	1	7.12	3.94	42.2	46.80
2	1	2	2	2	7.74	4.92	95.8	54.85
3	1	3	3	3	8.63	4.92	141.3	66.12
4	2	1	2	3	8.89	5.14	300.2	83.17
5	2	2	3	1	10.43	5.05	180.4	75.63
6	2	3	1	2	9.35	3.87	290.5	76.10
7	3	1	3	2	10.74	4.11	242.7	76.89
8	3	2	1	3	7.27	3.79	223.7	63.51
9	3	3	2	1	9.72	4.88	423.2	95.62
K1	1018.42	206.86	186.41		218.05			
K2	338.9	193.99	233.64		207.84			
K3	388.27	237.84	218.64		212.80			
Sj	17.38	338.69	388.27		17.38			

注：干膏收率评分 = (干膏收率 / 最大干膏收率) × 30

60% 乙醇浸出物评分 = (浸出物收率 / 最大浸出物收率) × 30

有效成分评分 = (提取量 / 最大提取量) × 40

综合评分 = 干膏收率评分 + 60% 乙醇浸出物评分 + 有效成分评分。

[0054] 表 6 煎煮方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	因素影响
加水量 A	1018.42	2	509.21	58.60	显著
煎煮时间 B	338.69	2	169.35	19.49	显著
煎煮次数 C	388.27	2	194.14	22.34	显著
误差	17.38	2	8.69		

注：F_{0.05}(2, 2)=19.00; F_{0.01}(2, 2)=99.00

分析结果可知，各因素作用主次为 A > C > B；A、B、C 因素均有显著性差异，A 因素中 A₃ > A₂ > A₁，所以选择 A₃；B 因素中 B₃ > B₁ > B₂，所以选择 B₃；C 因素中 C₂ > C₃ > C₁，所以选择 C₂。因此最佳工艺为 A₃B₃C₂。即加 10 倍量水，每次煎煮 3 小时，煎煮两次。

[0055] 4.3 最佳煎煮工艺验证：由于优选的最佳工艺未包括在正交设计表的 9 次试验中，故对其进行验证。取正交试验同一批药材，按最佳工艺进行实验，共验证 3 批，验证结果见表 7。

[0056] 表 7 煎煮最佳工艺验证结果

序 号	干浸膏收率 (%)	60%乙醇浸出物 (%)	总黄酮提取量 (mg)
1	12.35	5.01	400.21
2	13.58	4.88	400.13
3	12.96	5.04	400.50
平均值	12.963	4.976	400.613

验证结果表明，该工艺浸膏收率、60% 乙醇浸出物含量和总黄酮提取量都较稳定，可作

为提取的最佳工艺。

[0057] 4.4 浓缩工艺考察 生产车间常用的浓缩方法有常压浓缩和减压浓缩。减压浓缩具有耗时少、浓缩温度低的特点,因此对热敏成分破坏较小,随着制药设备制造技术的不断提高,现在的中药生产车间已多采用减压浓缩为主。为了与生产实际紧密结合,本品的浓缩方式采用减压浓缩法。

[0058] 取 2 倍处方量药材,按最佳煎煮工艺提取,煎煮液减压浓缩(-0.06 ~ -0.08Mpa, 80℃)至稠浸膏,测得此时浸膏相对密度约为 1.25 (60℃),取浸膏适量,同上法测定其中总黄酮含量,试验结果见表 8。

[0059] 表 8 浓缩浸膏中总黄酮含量测定结果

试验号	1	2	3	平均值
总黄酮含量 (mg/g)	26.87	25.91	26.43	26.40

试验结果表明:采用减压方式对本品提取液进行浓缩,处方中总黄酮含量稳定,说明方法可行。

[0060] 4.5 干燥工艺:我们分别采用常压和减压干燥两种方式对干燥工艺进行了考察:将浓缩工艺考察中的稠浸膏混匀,分成 3 份,分别按常压、减压、温度行干燥,以所得浸膏粉中有效成分的含量、色泽、干燥时间为考察对象,以此对干燥方式进行优选。

[0061] 表 9 不同干燥方式考察表

干燥方式	干燥条件	总黄酮含量 (mg/g)	色泽	干燥时间 (h)
常压	80℃	23.21	黑褐色	52
减压	60℃	24.67	褐色	28
减压	70℃	25.34	褐色	18

上表试验结果表明,干燥方式和干燥条件对总黄酮含量无明显影响,但常压干燥浸膏色泽较深、所需时间长,相比之下,采用减压 70℃为干燥工艺参数较合适。

[0062] 4.6 制剂浸膏特性研究

(1) 浸膏粉的性质:本品浸膏粉为经减压干燥后制备得的黑褐色粉末,为了掌握浸膏粉的性质,便于制剂研究,我们测定了浸膏粉的吸湿百分率和流动性。

[0063] (2) 吸湿百分率测定:取适量干浸膏,粉碎,过 80 目筛,置 P205 干燥器内干燥 48 小时,同时将底部盛有 NaCl 过饱和溶液的玻璃干燥器放入 25℃的恒温箱中 24 小时,其内部相对湿度(RH)为 75%。在已干燥恒重的称量瓶中加入适量浸膏粉,厚度约 2mm,精密称重后置于上述玻璃干燥器中,打开称量瓶盖;定时称量,计算吸湿百分率:

表 10 浸膏粉吸湿百分率测定结果表

时间	6h	12h	24h	48h	60h
吸湿百分率 (%)	7.13	13.45	17.80	19.31	22.31

(3) 休止角测定:采用固定漏斗法测定浸膏粉(80 目)休止角:将 3 只漏斗串联并固定于水平放置的坐标纸上适宜的高度(3cm),小心将浸膏粉沿漏斗壁倒入最上面的漏斗中,直到坐标纸上形成的浸膏粉锥体尖端接触到最下面漏斗口为止,测出圆锥底部直径,计算出

休止角 α :

表 11 浸膏粉休止角测定结果

试验号	1	2	3	平均值
休止角	46.34°	46.56°	46.78°	46.56°

浸膏粉吸湿百分率和休止角测定结果表明,浸膏粉抗潮能力差,流动性不好,不适于直接制粒,应加入适量辅料进行调整。

[0064] 4.7 辅料筛选

4.7.1 辅料种类筛选:辅料的种类直接决定颗粒的吸湿性和流动性。常用来改善颗粒吸湿性和流动性的辅料有乳糖、淀粉和糊精等。按表 12 分别取上述 3 种辅料加入浸膏粉中,混匀,用 75% 乙醇制软材,过 10 目制成颗粒,65℃干燥 15min,过 10 目筛整粒后,再于 65℃干燥。按前述方法测定颗粒的吸湿百分率和休止角。

[0065] 表 12 不同辅料与浸膏粉配伍表

浸膏粉量 (g)	10	10	10
乳糖 (g)	10	--	--
淀粉 (g)	--	10	--
糊精 (g)	--	--	10

表 13 不同辅料制得颗粒的指标检查

实验号	制粒难易度	外观	溶解性
1	较难制粒,颗粒中有一定的细粉	颗粒溶化变形且粘连在一起	全部溶解
2	易制粒,颗粒中有一定的细粉	软硬适中	全部溶解
3	易制粒,且颗粒均匀	颗粒微潮	全部溶解

表 14 不同辅料配比制得颗粒的吸湿百分率

实验号	吸湿百分率(%)				
	6h	12h	24h	48h	60h
1	3.28	4.05	7.63	8.45	9.47
2	3.18	4.53	5.86	6.17	7.78
3	3.17	4.45	6.01	7.28	8.28

由表可知,不同辅料与干膏粉以不同比例混合后,3 组样品吸湿率顺序为 $1 > 3 > 2$ 。其中 1 号处方(单用乳糖)的吸湿率最低(60h),但 3 号处方(单用糊精)制粒较容易但味较苦,而单用可溶性淀粉易制粒,溶化性好。综合考虑下选择 2 号处方。

[0066] 4.7.2 辅料用量筛选:辅料的用量应在满足制剂要求的前提下,尽量降低用量为原则。按表 15 取淀粉加入浸膏粉中,按前述方法制粒后测定颗粒的吸湿百分率和休止角。

[0067] 表 15 辅料用量配伍表

浸膏粉量 (g)	20	20	20
淀粉用量 1	15	—	—
淀粉用量 2	—	20	—
淀粉用量 3	—	—	25

表 16 不同辅料用量颗粒的吸湿百分率

辅料名称	吸湿百分率(%)				
	6h	12h	24h	48h	60h
淀粉用量 1	3.75	4.74	5.37	7.56	9.39
淀粉用量 2	3.46	4.69	4.38	6.59	7.68
淀粉用量 3	3.38	3.27	4.18	6.01	7.24

表 17 不同淀粉用量颗粒的休止角

辅料	30	45	60
休止角	35.15°	36.21°	35.13°

上述试验结果表明,加入辅料量越多,颗粒的抗吸湿能力和流动性越好,其中每 20g 浸膏加入辅料 20g 与加入 25g 效果相当,为了节约生产成本,我们选择每 20g 浸膏粉加入辅料 20g 为辅料用量参数。

[0068] 4.8 制剂成型工艺研究

(1)制剂处方中各味药量:原处方比例为茅莓 1.5、车前草 1.8、鱼腥草 1.5、肾茶 1.2、枸杞子 1.5、益智仁 1.5、玉米须 3.0,按此比例计算本品制剂处方中各药材量为:茅莓 262.5g、车前草 315g、鱼腥草 262.5g、肾茶 210g、枸杞子 262.5g、益智仁 262.5g、玉米须 525g。即制剂处方含生药总量为 2100g。

[0069] (2) 每包颗粒含生药总量:每包颗粒含生药总量 = 生药总量 ÷ 制剂单位。即:每粒含生药总量 = 2100g ÷ 1000 = 2.1g

(3) 制剂过程中加入辅料量

①每处方干浸膏收量:制剂处方含生药总量为 2100g,若根据干膏收率约为 10% 计算,则每处方干浸膏收量为:每处方干浸膏收量 = 处方含生药总量 × 干膏收率。即:每处方干浸膏收量 = 2100g × 10% = 210g

②辅料用量确定:由前试验可知,本品制剂过程中干浸膏和加入淀粉的比例为 20 : 20,由此计算得淀粉用量为:每处方淀粉用量 = 每处方干膏收量 × 20 ÷ 20。即:淀粉用量 = 2100g × 10 ÷ 20 = 210g

每处方制得内容物量为干浸膏收量与淀粉用量之和,由①、②可知,本品制得内容物 420g。考虑到药材采收季节和产地不同,以及生产工艺的影响,干浸膏收量会略有波动,我们将辅料用量描述为:加入辅料适量,使内容物制得量为 450g。

[0070] (4) 成品装量确定:成品装量 = 内容物制得量 ÷ 制成量;即:成品装量 = 450g ÷ 1000 粒 = 0.45g/粒

4.9 中试研究 取 20 倍处方量药材,按所制订得工艺路线进行中试生产,对生产工艺指标进行全面考核,对药材和成品进行质量评定,结果见表 18。

[0071] 表 18 中试试验结果

批 号	2009001	2009002	2009003
煎煮药材投料总量 (kg)	42	42	42
煎煮情况	每次加 10 倍水煎煮 2 次 (3h, 3h)	每次加 10 倍水煎煮 2 次 (3h, 3h)	每次加 10 倍水煎煮 2 次 (3h, 3h)
浓缩工艺参数	相对密度: 1.30	相对密度: 1.30	相对密度: 1.30
加入淀粉粉量 (kg)	5	5	5
干燥温度 (℃)	70℃	70℃	70℃
干浸膏量 (kg)	9.65	9.34	9.78
粉碎、过筛 (目)	60	60	60
药粉量 (kg)	9.04	8.87	9.14
理论产量 (0.4g/粒)	20000	20000	20000
实际产量 (0.4g/粒)	19280	18960	19360
成品率 (%)	96.4	94.8	96.8

中试试验研究结果表明,本发明产品各项技术参数稳定,说明工艺可行,适合批量生产。

[0072] 四、制剂主要药效学试验

1、实验材料

1.1 实验动物:昆明种小鼠,清洁级,体重 18-22g,大鼠,体重 180-220g,由重庆中药研究院实验动物中心提供;家兔,清洁级。

[0073] 1.2 药品与试剂:受试药:本发明制剂半成品(药粉),为贵阳春科药业研发有限公司提供,规格:各 10kg,临床用法与用量:一日 3 次,1.35g/次,临用时用蒸馏水配成混悬液备用;阳性对照药:中药雷公藤多甙片,黄石飞云制药有限公司,规格 10mg/片,每日每千克体重 1~1.5mg,分 3 次饭后服;化药醋酸泼尼松片,天津药业焦作有限公司,国药准字 H41020636,规格 0.5mg/片,一日 10-60mg。氢氯噻嗪,芜湖市博英制药有限公司,国药准字 H34023353,规格 25mg/片。二甲苯为重庆化学试剂厂产品,批号:20060104。肾炎康复片,天津同仁堂集团股份有限公司,国药准字 Z10940034,规格每片重 0.48g。口服,一次 5 片,一日 3 次。

[0074] 2、方法与结果

2.1 对牛血清白蛋白致家兔慢性肾炎的防治作用

2.1.1 试验方法 取家兔 70 只,试验前于恒温观察室 24-27℃ 予饲养 4 周,取血测定血清肌酐、尿素氮、白蛋白,取尿测定 24 小时尿蛋白定量。随机分为正常对照组、模型对照组、雷公藤多甙组(0.006g/kg)、醋酸泼尼松组(0.004g/kg)、本发明制剂低剂量组 0.3g/kg、中剂量组 0.6g/kg、高剂量组 1.2g/kg 剂量组,共 7 组,每组 10 只。除正常对照组外,每日耳静脉注射 C-BSA. 10mg/只,共 5 周,第 6 周剂量加倍,从免疫二周后开始口服给药,连续 6 周。

[0075] 2.1.2 试验结果

(1)24 小时尿蛋白定量:免疫前所有家兔尿蛋白定性为(-),个别(±)水平,24 小时尿蛋白定量各组之间无明显差异,免疫二周后,尿蛋白定性逐渐增强,各组均不同程度地处于(+)。(++) 水平,正常对照组始终为(-),个别为(±)水平。试验结束时,24 小时尿

蛋白定量显示,本发明制剂高、中、低剂量组与模型对照组比较,均有明显降低尿蛋白的作用,并随剂量增加,作用增强,阳性药醋酸泼尼松组和雷公藤多甙组亦有类似作用。见表 19。

[0076] (2) 生化学检查:未免疫前,各组生化学检查,各项指标各组间未见有明显差异。试验结束后,各生化指标见表 20。肌酐:给药 6 周后,模型组肌酐值明显高于正常组,本发明制剂高剂量组、醋酸泼尼松组、雷公藤多甙组,与模型组比较具有明显的降低作用。尿素氮:给药 6 周后,模型组尿素氮明显高于正常组,本发明制剂高、中、低剂量组及醋酸泼尼松组、雷公藤多甙组与模型组比较,具有明显的抑制尿素氮升高的作用。

[0077] 以上试验结果表明,本发明制剂高、中剂量组对用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)造成家兔慢性肾小球肾炎模型具有明显的防治作用,并随剂量增加,作用增强。阳性药醋酸泼尼松、雷公藤多甙有类似作用。

[0078] 表 19 对家兔所致慢性肾炎尿蛋白的影响 ($X \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	尿蛋白总量(mg/24h)	
			给药前	给药后
正常对照组		10	16.6 ± 6.2	16.8 ± 7.5
模型对照组		10	16.7 ± 5.3	182.4 ± 74.6
本发明低剂量组	0.3	10	15.8 ± 5.2	82.3 ± 53.6*
本发明中剂量组	0.6	10	16.7 ± 6.5	68.7 ± 71.2**
本发明高剂量组	1.2	10	16.4 ± 6.2	55.6 ± 53.8***
雷公藤多甙组	0.006	10	16.5 ± 7.2	56.2 ± 45.1***
醋酸泼尼松组	0.004	10	14.6 ± 6.3	45.3 ± 34.7***

*P<0.05 **P<0.01 (与模型组比较)

表 20 对家兔 (C. BSA) 所致慢性肾炎的影响 ($X \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 (mmol/L)
正常对照组		10	153.8 ± 19.7	13.65 ± 8.74
模型对照组		10	232.6 ± 34.5	44.36 ± 14.67
本发明低剂量组	0.3	10	196.8 ± 24.8	24.76 ± 28.43*
本发明中剂量组	0.6	10	169.2 ± 22.8	18.47 ± 14.82**
本发明高剂量组	1.2	10	151.6 ± 15.1***	13.34 ± 7.87***
雷公藤多甙组	0.006	10	154.1 ± 32.9***	12.48 ± 6.56***
醋酸泼尼松组	0.004	10	149.7 ± 43.2***	10.42 ± 5.42***

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 (与模型组比较)

2.2 对大鼠肾炎的影响试验

2.2.1 选取 Wistar 种大鼠,雌雄兼用,体重 180-220g,除正常对照组外,其余均腹腔注射同种免疫复合物(同种免疫复合物的制备,取 Wistar 种大鼠,击昏后打开腹腔,自肾动脉插入针头,用生理盐水反复冲洗至肾色转白后,摘下肾脏,取肾皮质 5 克研成匀浆,与弗氏完全佐剂混匀成 10ml,加生理盐水 20ml 混合制成),两周 1 次,每次 2ml/只,约 3-6 次,直

至出现蛋白尿,表明肾炎模型形成。参照大鼠 24 小时尿蛋白定量,分为模型对照组、阳性药对照醋酸泼尼松组(0.006g/kg)、雷公藤多甙组(0.009g/kg);本发明制剂低剂量组(0.4g/kg)、中剂量组(0.8g/kg)、高剂量组(1.6g/kg);连同正常对照组共 7 组,每组 10 只,开始灌胃给药,每天一次,连续四周,给药容积均为 1ml/100g 体重,模型对照组给予等容量 0.5% CMC(羧甲基纤维素钠)。

[0079] 2.2.2 试验结果:

(1)24 小时尿蛋白定量:表 21 结果表明,造型前各剂量组大鼠 24 小时尿蛋白定量无明显差异。造型后各剂量组 24 小时尿蛋白定量均明显升高(与正常对照组比较),表明造型成功,并且尿蛋白持续升高 4 周以上。经本发明制剂灌胃给药四周治疗后,24 小时尿蛋白定量的作用与模型对照组比较,本发明制剂高、中、低剂量组均有明显降低 24 小时尿蛋白定量的作用,并随剂量增加,作用增强。阳性对照药醋酸泼尼松和雷公藤多甙亦有类似作用。

[0080] (2)生化学检查:表 21 和表 22 结果表明,造型后大鼠血清尿素氮比造型前明显升高,肌酐无明显影响。本发明制剂治疗后对尿素氮和肌酐未有明显影响(与模型对照组比较)。以上结果表明,本发明制剂对大鼠 Heymann 肾炎模型有明显的治疗作用,并随剂量增加,作用增强,但对血清肌酐、尿素氮无明显影响。阳性对照药雷公藤多甙、醋酸泼尼松亦有类似作用。

[0081] 表 21 对大鼠肾炎尿蛋白总量的影响 ($X \pm SD$)

组别	剂量 (g/kg)	24 小时尿蛋白总量(mg)				
		制模前	制模后	治疗后		
				2 周	3 周	4 周
正常对照组		4.78 ± 1.63	4.36 ± 1.72	4.24 ± 1.43	4.27 ± 1.86	3.18 ± 1.65
模型对照组		4.34 ± 1.42	18.65 ± 5.26	17.64 ± 6.32	15.83 ± 5.54	14.27 ± 5.73
本发明低剂量组	0.4	4.26 ± 1.65	18.73 ± 6.24	16.54 ± 6.43	12.98 ± 5.19	10.26 ± 4.38*
本发明中剂量组	0.8	4.83 ± 1.33	18.37 ± 4.82	12.44 ± 3.52*	10.15 ± 2.87*	8.54 ± 3.34**
本发明高剂量组	1.6	4.92 ± 1.54	19.27 ± 3.35	9.65 ± 2.86**	7.83 ± 2.16**	6.46 ± 2.64***
雷公藤多甙组	0.009	4.56 ± 1.25	18.66 ± 4.64	11.33 ± 2.78*	9.87 ± 3.25**	8.65 ± 2.14**
醋酸泼尼松组	0.006	4.47 ± 1.36	18.83 ± 5.16	10.26 ± 5.43*	9.86 ± 6.65**	7.87 ± 4.52***

表 22 对大鼠肾炎血清肌酐的影响 ($X \pm SD$)

组别	剂量 (g/kg)	肌酐(mg/dl)		
		制模前	制模后	治疗后
正常对照组		1.28 ± 0.26	1.36 ± 0.43	1.13 ± 0.17
模型对照组		1.12 ± 0.28	1.73 ± 0.28	1.47 ± 0.42
本发明低剂量组	0.4	1.16 ± 0.34	1.36 ± 0.34	1.28 ± 0.32
本发明中剂量组	0.8	1.22 ± 0.46	1.39 ± 0.41	1.32 ± 0.26
本发明高剂量组	1.6	1.28 ± 0.31	1.42 ± 0.56	1.21 ± 0.32
雷公藤多甙组	0.009	1.16 ± 0.26	1.36 ± 0.34	1.27 ± 0.43
醋酸泼尼松组	0.006	1.18 ± 0.32	1.48 ± 0.29	1.12 ± 0.38

表 23 对大鼠肾炎尿素氮的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	尿素氮(mg/dl)		
		制模前	制模后	治疗后
正常对照组		15.63 ± 3.26	15.52 ± 4.26	13.68 ± 2.74
模型对照组		15.35 ± 3.83	26.73 ± 8.22 ^{△△}	24.15 ± 4.28
本发明低剂量组	0.4	15.74 ± 2.52	26.94 ± 6.13 ^{△△}	21.38 ± 3.46
本发明中剂量组	0.8	15.46 ± 4.19	26.81 ± 5.39 ^{△△}	19.84 ± 4.47
本发明高剂量组	1.6	15.67 ± 3.44	26.19 ± 6.01 ^{△△}	19.49 ± 3.25
雷公藤多甙组	0.009	15.28 ± 5.12	25.98 ± 4.86 ^{△△}	19.87 ± 4.37
醋酸泼尼松组	0.006	15.82 ± 4.36	26.34 ± 5.36 ^{△△}	19.73 ± 6.24

△△P<0.01, △△△P<0.001(制模后与制模前比较); *p<0.05, **p<0.01,

***p<0.001(给药组与模型对照组比较)

2.3 对利尿的影响试验

2.3.1 对水负荷大鼠利尿的影响 选用经过预选的合格 Wistar 种大鼠 (2 小时内的排尿量超过所给水负荷的 40%), 雌雄兼用, 体重 180-220g, 随机分为 6 组, 每组 10 只。给药组分别灌胃给予本发明制剂低剂量组 (0.4g/kg)、中剂量组 (0.8g/kg)、高剂量组 (1.6g/kg), 连续 3 天, 阳性对照药灌胃给予 (0.008g/kg) 氢氯噻嗪一次 (于试验前), 肾炎康复片组 (2.0g/kg), 给药容积均为 1ml/100g 体重, 正常对照组灌胃给予等容量 0.5% CMC。试验前禁食不禁水 15 小时后, 按 2ml/100g 体重的体积给大鼠腹腔注射生理盐水, 并轻压下腹使膀胱排空, 然后灌胃给予以上药物, 放于大鼠代谢笼中, 收集不同时间的尿液, 结果见表 24。

[0082] 表 24 对水负荷大鼠利尿的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	不同时间尿量(ml)		
		1 小时	2 小时	4 小时
正常对照组		0.46 ± 0.34	0.65 ± 0.28	0.47 ± 0.33
本发明低剂量组	0.4	0.63 ± 0.53	0.78 ± 0.43	0.92 ± 0.58
本发明中剂量组	0.8	0.72 ± 0.47	0.89 ± 0.28	1.23 ± 0.42**
本发明高剂量组	1.6	0.82 ± 0.34	1.02 ± 0.45*	1.38 ± 0.65**
肾炎康复片组	2.0	0.79 ± 0.28	1.14 ± 0.64*	1.31 ± 0.42**
氢氯噻嗪组	0.008	0.83 ± 0.36	1.26 ± 0.71**	1.44 ± 0.56**

*: p<0.05 ** :p<0.01 (与正常对照组比较)

表 24 结果表明, 与正常对照组比较, 本发明制剂高、中剂量组均明显增加水负荷大鼠的尿量。阳性药肾炎康复片、氢氯噻嗪亦有类似作用。

[0083] 2.3.2 对氯化汞致肾功能衰竭大鼠尿量、肌酐及尿素氮的影响 选用合格 Wistar 种大鼠, 雌雄兼用, 体重 180 ~ 220g, 随机分为正常对照组、模型对照组、阳性药对照组氢氯噻嗪 0.008g/kg、本发明制剂低剂量组 (0.4g/kg)、中剂量组 (0.8g/kg)、高剂量组 (1.6g/kg), 共 7 组, 每组 10 只, 开始灌胃给药, 给药容积均为 1ml/100g 体重, 模型对照组给

予等容量 0.5% CMC, 每天一次, 连续 2 周, 然后, 除正常对照组外, 分别肌肉注射 12mg/kg 的氯化汞进行造型 (阳性药对照组开始给药, 本发明中药组合物继续给药), 致大鼠肾功能衰竭, 本发明中药组合物继续给药, 用代谢笼收集造型后大鼠 24 小时的尿量, 第 3 天眼眶取血测定肌酐、尿素氮, 比较其差异, 观察本发明中药组合物的作用, 结果见表 25 结果表明, 和正常对照组比较, 模型对照组的 24 小时尿量明显减少, 血清肌酐、尿素氮明显升高, 表明已形成大鼠肾功能衰竭; 和模型对照组比较, 本发明制剂高剂量组能明显增加大鼠造型后 24 小时尿量, 各剂量组对血清肌酐、尿素氮均无明显影响。

[0084] 表 25 对氯化汞致肾功能衰竭大鼠尿量、肌酐及尿素氮的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 (g/kg)	24 小时尿量 (ml)	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 (mmol/kg)
正常对照组		4.26 ± 1.28	55.6 ± 7.4	7.2 ± 2.8
模型对照组		1.96 ± 1.47	388.7 ± 54.6	63.4 ± 4.8
本发明低剂量组	0.4	2.27 ± 1.56	382.4 ± 48.3	54.2 ± 6.3
本发明中剂量组	0.8	2.58 ± 1.85	365.8 ± 52.4	55.8 ± 5.9
本发明高剂量组	1.6	$3.78 \pm 1.21^*$	349.5 ± 55.3	53.7 ± 3.6
肾炎康复片组	2.0	$3.46 \pm 1.74^*$	368.3 ± 51.7	54.4 ± 4.8
氢氯噻嗪组	0.008	$3.26 \pm 1.46^*$	393.2 ± 61.9	56.3 ± 8.2

*: $p < 0.05$ (与模型对照组比较)

以上实验结果表明, 本发明中药组合物明显增加水负荷大鼠的尿量、明显增加氯化汞致肾功能衰竭大鼠 24 小时的尿量, 表明本发明中药组合物具有明显的利尿渗湿作用, 并随剂量增加, 作用增强。

[0085] 2.4 抗炎实验

2.4.1 对巴豆油致小鼠耳肿胀的影响: 选取雄性小鼠, 体重 $24 \pm 2\text{g}$, 随机分组, 每组 10 只, 试验分为对照组, 肾炎康复片组 (3.0g/kg), 醋酸泼尼松组 (0.01g/kg), 本发明制剂低剂量组 (0.6g/kg)、中剂量组 (1.2g/kg)、高剂量组 (2.4g/kg), 共 5 组, 每天灌胃给药一次, 连续 10 天, 给药容量为 0.2ml/10g 体重, 对照组给予等容量 0.5% CMC, 末次给药后半小时, 将巴豆油致炎剂 0.05ml 滴于右耳, 150 分钟后将小鼠处死, 沿耳廓剪下两耳, 用直径 8.5mm 打孔器分别在左右耳相同部位打下圆耳片, 称重, 用左右耳重量之差, 作为肿胀度, 比较其差异, 观察本发明中药组合物的作用, 结果见表 26。结果表明: 和对照组比较, 本发明制剂灌胃给药 10 天, 对巴油致小鼠耳肿胀, 具有明显的抑制作用, 表明本发明制剂具有明显的抗巴豆油致小鼠耳肿作用。

[0086] 表 26 对巴豆油致小鼠耳肿的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	肿胀度 (mg)	抑制率 (%)
模型对照组		10	13.8 ± 3.5	
本发明低剂量组	0.6	10	8.6 ± 2.7*	37.7
本发明中剂量组	1.2	10	5.2 ± 2.8***	62.3
本发明高剂量组	2.4	10	4.3 ± 3.2***	68.8
肾炎康复片组	3.0	10	5.6 ± 2.4***	59.4
醋酸泼尼松组	0.01	10	4.7 ± 2.4***	65.9

*: $P < 0.05$, **: < 0.01 (与对照组比较)

2.4.2 对鸡蛋清致大鼠足跖肿胀的影响:选用 Wistar 种大鼠,体重 180-220g,随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半。给药组分别灌胃给予本发明制剂低剂量组(0.4g/kg)、中剂量组(0.8g/kg)、高剂量组(1.6g/kg),连续 7 天,阳性对照药灌胃给予阿司匹林(0.2g/kg)和肾炎康复片组(2.0g/kg),连续 3 天,给药容积均为 1ml/100g 体重,模型对照组给予等容量 0.5% CMC。末次给药后 1 小时,分别在大鼠左后肢足跖皮下注射 10% 鸡蛋清生理盐水 0.06ml/只进行致炎,用容积法测定大鼠左后肢足跖致炎前后的体积,计算肿胀度(足跖致炎后体积减去致炎前体积),比较其差异,观察本发明中药组合物的作用,结果见表 27。结果表明,连续灌胃给药 7 天,与对照组比较,本发明制剂高、中、低剂量组均能明显减少大鼠足跖肿胀度,并随剂量增加,作用增强,阳性药阿司匹林亦有类似作用。表明本发明制剂具有明显的抗鸡蛋清致大鼠足跖肿胀作用。

[0087] 表 27 对鸡蛋清致大鼠足跖肿胀的影响 ($X \pm SD$, n)

组 别	剂 量 (g/kg)	致炎前	致炎后不同时间的肿胀度(ml)	
			2 小时	4 小时
对照组		1.22 ± 0.23	1.65 ± 0.28	1.44 ± 0.18
本发明低剂量组	0.4	1.36 ± 0.27	0.58 ± 0.14*	0.42 ± 0.11*
本发明中剂量组	0.8	1.32 ± 0.24	0.29 ± 0.17***	0.33 ± 0.10**
本发明高剂量组	1.6	1.28 ± 0.25	0.24 ± 0.16***	0.21 ± 0.15***
肾炎康复片组	2.0	1.25 ± 0.22	0.25 ± 0.19***	0.3 ± 0.17***
阿司匹林组	0.2	1.35 ± 0.28	0.28 ± 0.11***	0.25 ± 0.13***

* $P < 0.05$ 、 ** $P < 0.01$ 、 *** $P < 0.001$ (与对照组比较)

以上实验结果表明,本发明制剂对巴豆油致小鼠耳肿胀、对鸡蛋清致大鼠足跖肿胀均具有明显的抑制作用,表明本发明制剂具有明显的抗炎作用,并随剂量增加,作用增强。

[0088] 3、结论

3.1 本发明制剂高、中剂量组对用阳离子化牛血清白蛋白造成家兔慢性肾小球肾炎模型具有明显的抑制作用,提示本发明制剂对肾炎有一定防治作用。

[0089] 3.2 本发明制剂高、中、低剂量组均有明显降低 24 小时尿蛋白定量的作用,并随剂量增加,作用增强。提示本发明制剂对肾炎有明显的治疗作用。

[0090] 3.3 本发明制剂高、中剂量组均明显增加水负荷大鼠的尿量,提示本发明制剂具有

明显的利尿渗湿作用。

[0091] 3.4 本发明制剂高、中、低剂量均能抑制巴豆油致小鼠耳肿胀和鸡蛋清致大鼠足跖肿胀,提示本发明制剂具有明显的抗炎作用。

[0092] 3.5 通过以上主要药效学试验,提示本发明制剂对肾炎有很好的防治作用,为临床用药提供参考依据。

[0093] 五、制剂毒性实验研究

1、急性毒性试验:该制剂为胶囊剂,根据预试验情况,分组给药后高剂量组动物未见死亡,无法找出最大致死剂量,故无法进行动物半数致死量测定。改为动物口服给药的最大给药量测定。

[0094] 本发明制剂给药量为成品药 4.05g/日(相当于生药 18.9g),相当于(60 公斤)每公斤体重 0.0675g/kg(折合生药量 0.315g/kg)。

[0095] 本试验选取用成品给药。试验中小鼠按最大灌胃容量(40ml/kg 体重)给予最大浓度 40%给药,因受药物浓度及灌胃体积所限给药剂量已无法再增加,故给药剂量已达最大给药剂量,结果受试动物 24 小时内给药剂量累积为 12.15g/kg(折合生药量为 56.7g/kg)。

[0096] 经计算最大给药量已达成人每日用量(折合生药量 0.315g/kg)的 200 倍。给药后连续观察 14 天,所有受试小鼠均未见有异常表现,无一死亡。

[0097] 根据统计学 Wright 化法则,可以推测出口服给药的日最大给药量必大于 12.15g/kg(折合生药:折合生药量为 56.7g/kg)。

[0098] 表 28 本发明药物最大给药量实验小鼠体重的比较

分 组	动物数(只)	给药前(g)	给药后 1 周(g)	给药后 2 周(g)
本发明制剂 (12.15g/kg.d)	20	20.2±1.4	21.6±1.2	22.8±1.6

2、长期毒性试验 SD 大鼠连续灌胃给予本发明制剂 2.0g/kg、10.0g/kg、20.0g/kg,6 个月,观测给药期间和停药恢复期 2 周的毒性。每天观察给药后大鼠的饮食、活动、体重、摄食量。于给药 6 个月和停药 2 周(恢复期)定期测定动物的血液学、血清生化学,并进行剖检和组织病理学检查。结果表明,本发明制剂 1.15g/kg、5.75g/kg、11.5g/kg 灌胃给药 3 个月对大鼠无明显的毒性。

[0099] (1) 动物:SD 大鼠,级别:清洁级。动物数:SD 大鼠 80 只。体重:给药前 1 周的体重范围 220±20g。健康状况:给药前 1 周,观察大鼠一般状况,未见异常。饲养条件:清洁级动物房,温度 22±3℃,每笼饲养 5 只大鼠。饲料:钴⁶⁰放射灭菌大鼠用颗粒饲料。喂食:每日自由摄食。饮用水:自来水经灭菌后,动物从饮水瓶中自由摄取。

[0100] (2) 分组和给药:分组:按体重 80 只大鼠分为 4 组,分别为对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组 20 只。分组方法:按体重均衡分组。给药期:每周 6 天,连续给药 6 个月。给药方式:灌胃给药,20ml/kg,每天一次(早上 8 点)。恢复期:停止给药后,每天观测一次,连续 2 周。

[0101] (3) 剂量:剂量组别:低剂量组 2.0g/kg(相当于临床用量 5 倍),中剂量组 10.0g/kg(相当于临床用量的 25 倍),高剂量组 20.0g/kg(相当于临床用量的 50 倍),空白对照组

给予同体积蒸馏水。设计依据：本发明制剂小鼠灌胃未测出小鼠 LD_{50} ，采用最大容积给药。

[0102] (4) 设计依据：本发明制剂小鼠灌胃未测出小鼠 LD_{50} ，采用最大容积给药。本发明制剂对大鼠作用的有效剂量为 0.4g/kg。根据研发者提供的临床人拟给药量每人每天为 4.05g，按公斤体重计算为 0.0675g/kg·d。本发明制剂 6 个月长期毒性给药剂量计算：根据体表面积折算，大鼠剂量为 2.0g/kg、10.0g/kg、20.0g/kg，分别为临床给药量的 5、25、50 倍。(5) 观察内容

一般状态的观察：从购入动物日起到停药恢复期结束，通常每天观察一次，但给药期间每天观察 2-3 次。给药前、后全部实验动物。

[0103] 体重测定：给药前、给药开始直至停药恢复期结束，每周测定体重 1 次。另外，在解剖前先测定动物的体重。给药前和给药后全部动物。

[0104] 摄食量测定：给药前 1 周、给药开始，直至停药恢复期结束，每周 1 次测定摄食量（24 小时食物消耗量）。每周二上午 9 时将每笼（5 只大鼠）的饲料取出，并放入 500 克饲料。周三上午 9 时将每笼（5 只大鼠）剩余饲料取出，称量并计算每天平均每只大鼠摄食量（g/rat/d）。给药前和给药后全部动物。

[0105] 采血和标本制备：给药后 6 个月和恢复期结束的每次剖检前摘单眼球法采血，进行凝血时间、血液学、血清生化等标本制备和检查。

[0106] 血液学检查：进行 11 项指标，白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、网织红细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、凝血时间，血细胞检查。

[0107] 血清生化检查：采用全血经离心所得血清，进行 11 项生化指标（AST, ALT, ALP, GLU, BUN, TCHO, TBIL, CRE, TP, ALB, A/G）的测定。

[0108] 尸检试验：全部实验组动物（包括实验期间死亡动物）进行剖检。尸检试验在给药 3 个月和停药 2 周时进行，采用切断颈动脉放血处死大鼠。

[0109] 解剖肉眼检查和称脏器重量：解剖时肉眼仔细观察各脏器和组织的异常变化。称重的器官：心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、肾上腺、胸腺、甲状腺（含甲状旁腺），并计算脏器重量系数（脏器重 / 体重 × 100%）。

[0110] 组织和器官的固定：固定的组织器官如下：脑、心、肝、脾、肺、肾、胰腺、肾上腺、甲状腺、胸腺、淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、食道、胃、十二指肠、空肠、回肠和结肠及病变部位等。

[0111] 组织病理学检查：脏器和组织经福尔马林固定 12 小时后，换新福尔马林继续固定 48 小时，胃组织修块为沿胃小弯纵行分别修 4~6 块约 2cm 长的组织，包括贲门、胃小弯、胃大弯、幽门、十二指肠及前胃。组织经常规脱水，石蜡包埋，切 5 μ m 薄片，HE 染色，光镜检查。

[0112] (6) 试验结果

①一般状况：对照组：在 6 个月的实验过程中，对照组 20 只大鼠进食与活动状况正常，未发现异常现象。低剂量组（2.0g/kg）：在整个试验过程中，20 只大鼠进食与活动状况正常，未发现呼吸、呕吐、流涎、腹泻等异常现象。中剂量组（10.0g/kg）：仅 4 号大鼠 6 周时发现鼻红色分泌物，三天后自行恢复正常，其余大鼠无异常。高剂量组（20.0g/kg）：1 号大鼠于给药后第 2 周发现腹泻，二天后自行恢复正常，其它均未出现异常。

[0113] ②体重：在整个试验过程中，各给药组大鼠的体重增长均正常。与对照组比较，未

见明显差异,未发现与药物相关的体重变化。

[0114] ③摄食量:在整个试验过程中,大鼠的摄食量与对照组比较,未见明显差异,未发现与药物相关的摄食量变化。

[0115] ④对血液学的影响

给药6个月血液学检查:给药6个月血液学11项指标(白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、网织红细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和凝血时间)检查结果。

[0116] 白细胞总数:本发明高剂量组白细胞总数为 $5.26 \times 10^9/L$,比对照组 $5.72 \times 10^9/L$ 有所减少,但无显著差异。

[0117] PLT:本发明高剂量组的血小板数为 $987.69 \times 10^9/L$,比对照组 $1142.17 \times 10^9/L$ 明显减少($P < 0.05$);中剂量、低剂量组与对照组比较无明显统计学意义。

[0118] 其它血液学指标,给药组与对照组比较未见明显统计学差异。

[0119] 停药恢复期血液学检查:停止给药后2周,血液学上述11项指标检查结果。给药组与对照组比较未见统计学意义的差异。

[0120] ⑤对血清生化的影响

给药6个月血清生化变化:给药3个月(12周)检查血清生化11项指标(AST,ALT,ALP, GLU, BUN, TCHO, TBIL, CRE, TP, ALB, A/G)。

[0121] Na^+ :本发明高剂量(20.0g/kg)组的血清 Na^+ 为 $186.47mmol/L$ 、中剂量(10.0g/kg)组的 Na^+ 为 $181.34mmol/L$,明显高于对照组 $141.72mmol/L$ ($P < 0.05$),低剂量组与对照组比较无明显统计学差异。

[0122] TBLL:本发明高剂量组(20.0g/kg)的总胆红素为 $2.86 \mu mol/L$,明显低于对照组($5.84 \mu mol/L$, $P < 0.05$);中、低剂量组与对照组比较无明显差异。

[0123] GLU:本发明低剂量组(2.0g/kg)的血糖为 $8.26mmol/L$,明显高于对照组 $6.23mmol/L$ ($P < 0.05$),但中、高剂量组未见明显变化。

[0124] 其它项血清生化指标,给药组与对照组比较未见明显差异。

[0125] 停药恢复期血清生化检查:停止给药后2周,检查血清生化11项指标(AST, ALT, ALP, GLU, BUN, TCHO, TBIL, CRE, TP, ALB, A/G)。

[0126] TBLL:本发明高剂量组 TBLL 为 6.35 ± 0.56 、中剂量组为 5.68 ± 0.83 ,均明显高于比对照组的 3.89 ± 0.74 ($P < 0.05$)。

[0127] TG:本发明高剂量组 TG 含量为 $1.12mmol/L$ 、中剂量组为 $1.14mmol/L$,均略高于对照组($0.98mmol/L$),但无显著差异($P > 0.05$)。

[0128] 其它血清生化指标,给药组与对照组比较未见明显差异。

[0129] ⑥系统尸解:解剖时肉眼检查各个阶段(6个月、恢复期)的所有动物的组织、器官的异常情况。

[0130] 给药6个月系统尸解:对照组:12只大鼠被毛光滑,头部器官、会阴部均未见异常,心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸、附睾、前列腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、气管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、胸腔及腹腔均未发现肉眼可见的病变。空白对照组:12只大鼠中1只动物见肝囊肿,其余未见异常。高剂量组(20.0g/kg):12只大鼠中仅1只脾大外,其余各脏器和组织未见异常。中剂量组(10.0g/kg):12只

大鼠中 2 只脾大外,其余各脏器和组织未见异常。低剂量组(2.0g/kg):12 只大鼠中 1 只动物双肾囊肿外,其余各脏器和组织未见异常。

[0131] 恢复期系统尸解:对照组:8 只大鼠被毛光滑,头部器官、会阴部均未见异常,心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸、附睾、前列腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、气管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、胸腔及腹腔均未发现肉眼可见的病变。高剂量组(20.0g/kg):8 只大鼠被毛光滑,头部器官、会阴部均未见异常,心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸、附睾、前列腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、气管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、胸腔及腹腔均未发现肉眼可见的病变。中剂量组(10.0g/kg):8 只大鼠中 1 例见胸腺较小。8 只大鼠被毛光滑,头部器官、会阴部均未见异常,心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸、附睾、前列腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、气管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、胸腔及腹腔均未见到肉眼病变。低剂量组(2.0g/kg):8 只大鼠被毛光滑,头部器官、会阴部均未见异常,心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸、附睾、前列腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、胸骨、脊髓、视神经、脑垂体、气管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、胸腔及腹腔均未见到肉眼病变。

[0132] ⑦对脏器重量的影响 给药 6 个月脏器重量变化:脾脏:本发明中剂量组(10.0g/kg)平均脾脏重量为 1.26 ± 0.43 (g),比对照组 0.58 ± 0.24 (g) 明显增加($P < 0.05$);高剂量组、低剂量组与对照组比较无明显差异。胸腺:本发明中剂量组(10.0g/kg 组)平均胸腺重量为 0.24g,比对照组(0.38g)明显减少($P < 0.05$)。给药各组的其它脏器(心脏、肺、脑、肝脏、肾脏、肾上腺、甲状腺、睾丸、附睾、前列腺)重量与对照组无明显差异。停药恢复期脏器重量的检测:本发明制剂给药各组停药 2 周,大鼠脏器重量与对照组无明显差异。

[0133] (7) 本发明制剂用药 6 个月对 SD 大鼠的毒性作用

①对摄食量和体重增长的影响:大鼠分别灌胃本发明制剂 2.0g/kg、10.0g/kg、20.0g/kg 连续 6 个月,其体重增长率和摄食量与空白对照组比较均未见明显差异,说明本发明制剂在 2.0g ~ 10.0g/kg 范围内对摄食和体重增长无明显影响。

[0134] ②对血液学的影响:在给药 6 个月(24 周)的血液学 11 项指标(白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、网织红细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和凝血时间)检查结果和分析如下:

白细胞总数:本发明高剂量组的白细胞总数为 5.656×10^9 /L,比对照组 6.36×10^9 /L 有所减少,但无显著差异($P > 0.05$)。

[0135] PLT:本发明高剂量组的血小板数为 813.65×10^9 /L,比对照组 1132.26×10^9 /L 明显减少($P < 0.05$);而本发明中剂量、低剂量组与对照组比较无明显差异。恢复期高剂量组血小板数为 708.68×10^9 /L,比对照组 968.44×10^9 /L 仍明显减少($P < 0.05$)。

[0136] ③对血清学的影响:GLU:给药 24 周,本发明低剂量组的血糖为 8.27mmol/L,比对照组 6.45mmol/L 明显升高;而本发明高剂量组、中剂量组与空白对照均无明显差异,推测低剂量组血糖的升高可能与个别动物食量过大有关,且在停药恢复期未见升高,故推测非药物所致。

[0137] ④对脏器重量的影响:给药 24 周,本发明中剂量组脾脏的重量 1.43g,比对照组 0.72g 明显增加;胸腺脏器的重量为 0.22g,比对照组 0.28g 明显减少,但高剂量组脾和胸腺没有发现明显变化。恢复期各给药组与空白对照组比较,各脏器指数均未见统计学差异。

提示,本发明中剂量组脾和胸腺重量的变化与药物的毒性关系不大。

[0138] ⑤对组织病理学的影响:用药6个月,高、中剂量组可见:A、少数动物发生肝组织少许脂肪变性和水样变性,肝组织间质内见慢性炎细胞浸润。B、少数动物发生气管、支气管粘膜及肺泡轻度慢性炎症改变。C、个别动物淋巴结、肠粘膜及膀胱有炎症变化。这些改变与对照组相似,均属二级动物常见病变,与药物的毒性关系不大。恢复期末见特殊改变。

[0139] (5)结论:大鼠灌胃给予本发明制剂2.0g/kg、10.0g/kg及20.0g/kg,(分别相当于临床用量的5、25、50倍),连续6个月的毒性研究结果表明,本发明制剂对主要器官和组织未见明显毒性。

附图说明

[0140] 图1是本发明的工艺流程图。

下面结合具体实施方式对本发明作进一步的说明。

具体实施方式

[0141] 实施例1:取茅莓15g、车前草18g、鱼腥草15g、肾茶12g四味药材,按常规方法加水煎成汤剂服用。用法用量:每日1剂,分3次服。

[0142] 实施例2:取茅莓15g、车前草18g、鱼腥草15g、肾茶12g、枸杞子15g、益智仁15g、玉米须30g七味药材,按常规方法加水煎成汤剂服用。用法用量:每日1剂,分3次服。

[0143] 实施例3:取茅莓525g、车前草630g、鱼腥草525g、肾茶420g四味药材,加水煎煮2次,每次加处方总量的10倍水,每次煎煮3小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.35(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成1000粒,即得本发明胶囊剂。规格:每粒装0.45g。用法用量:口服,一次3粒,一日3次。

[0144] 实施例4:取茅莓1050g、车前草1260g、鱼腥草1050g、肾茶840g四味药材,加水煎煮3次,每次加水8倍,每次煎煮1小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.30(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,干燥,制成2000粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装0.45g。用法用量:口服,一次3粒,一日3次。

[0145] 实施例5:取茅莓210g、车前草735g、鱼腥草630g、肾茶525g四味药材,加水煎煮1次,每次加水10倍,每次煎煮3小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.35(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成1000粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装0.45g。用法用量:口服,一次3粒,一日3次。

[0146] 实施例6:取茅莓840g、车前草525g、鱼腥草420g、肾茶315g四味药材,加水煎煮2次,每次加水10倍,每次煎煮3小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.30(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成1000粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装0.45g。用法用量:口服,一次3粒,一日3次。

[0147] 实施例7:取茅莓630g、车前草630g、鱼腥草525g、肾茶315g四味药材,加水煎煮3次,每次加水8倍,每次煎煮1小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.25(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成1000粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装0.45g。用法用量:口服,一次3粒,一日3次。

[0148] 实施例8:取茅莓10.5kg、车前草12.6kg、鱼腥草10.5kg、肾茶8.4kg四味药材,加水煎煮2次,每次加水10倍,每次煎煮3小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为1.30

(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 20000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0149] 实施例 9:取茅莓 5250g、车前草 6300g、鱼腥草 5250g、肾茶 4200g 四味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.35 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,加入适量润滑剂,混匀,压片,包薄膜衣,制成 10000 片,即得本发明片剂,规格:每片重 0.5g。用法用量:口服,一次 3 片,一日 3 次。

[0150] 实施例 10:取茅莓 262.5g、车前草 315g、鱼腥草 262.5g、肾茶 210g 四味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.35 (60℃)的浸膏,加入无糖型辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 500g,即得本发明颗粒剂,规格:每袋装 3g。用法用量:口服,一次 3g,一日 3 次。

[0151] 实施例 11:取茅莓 157.5g、车前草 189g、鱼腥草 157.5g、肾茶 126g 四味药材,加水煎煮 1 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,静置过夜,取上清液减压浓缩至约 800ml,加入无糖型辅料适量,混匀,加入加水制成 1000ml,即得本发明口服液,规格:每瓶装 10ml。用法用量:口服,一次 1 瓶,一日 3 次。

[0152] 实施例 12:取茅莓 5250g、车前草 6300g、鱼腥草 5250g、肾茶 4200g 四味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为 1.30(60℃)的浸膏,干燥,粉碎成细粉,加入辅料适量,研匀,压制成 10000 粒,得本发明软胶囊,规格:每粒装 0.5g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0153] 实施例 13:取果茅莓 262.5g、车前草 315g、鱼腥草 262.5g、肾茶 210g、枸杞子 262.5g、益智仁 262.5g、玉米须 525g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.30 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 1000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0154] 实施例 14:取果茅莓 105g、车前草 336g、鱼腥草 294g、肾茶 231g、枸杞子 294g、益智仁 294g、玉米须 546g 七味药材,加水煎煮 3 次,每次加水 8 倍,每次煎煮 1 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.30 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,干燥,制成 1000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0155] 实施例 15:取果茅莓 420g、车前草 294g、鱼腥草 231g、肾茶 189g、枸杞子 231g、益智仁 231g、玉米须 504g 七味药材,加水煎煮 1 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.35 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 1000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0156] 实施例 16:取果茅莓 294g、车前草 315g、鱼腥草 252g、肾茶 210g、枸杞子 252g、益智仁 252g、玉米须 525g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.30 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 1000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0157] 实施例 17:取果茅莓 462g、车前草 630g、鱼腥草 546g、肾茶 420g、枸杞子 546g、益智仁 546g、玉米须 1050g 七味药材,加水煎煮 3 次,每次加水 8 倍,每次煎煮 1 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.25 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 2000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0158] 实施例 18:取果茅莓 2625g、车前草 3150g、鱼腥草 2625g、肾茶 2100g、枸杞子 2625g、益智仁 2625g、玉米须 5250g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.30(60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 10000 粒,即得本发明胶囊剂,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0159] 实施例 19:取果茅莓 2625g、车前草 3150g、鱼腥草 2625g、肾茶 2100g、枸杞子 2625g、益智仁 2625g、玉米须 5250g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.35 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,制粒,干燥,加入适量润滑剂,混匀,压片,包薄膜衣,制成 10000 片,即得本发明片剂,规格:每片重 0.5g。用法用量:口服,一次 3 片,一日 3 次。

[0160] 实施例 20:取果茅莓 1312.5g、车前草 1575g、鱼腥草 1312.5g、肾茶 1050g、枸杞子 1312.5g、益智仁 1312.5g、玉米须 2675g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.35 (60℃)的浸膏,加入无糖型辅料适量,混匀,制粒,干燥,制成 5000g,即得本发明颗粒剂,规格:每袋装 3g。用法用量:口服,一次 3g,一日 3 次。

[0161] 实施例 21:取果茅莓 787.5g、车前草 945g、鱼腥草 787.5g、肾茶 630g、枸杞子 787.5g、益智仁 787.5g、玉米须 1575g 七味药材,加水煎煮 1 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,静置过夜,取上清液减压浓缩至约 800ml,加入无糖型辅料适量,混匀,加入加水制成 10000ml,即得本发明口服液,规格:每瓶装 10ml。用法用量:口服,一次 1 瓶,一日 3 次。

[0162] 实施例 22:取果茅莓 2625g、车前草 3150g、鱼腥草 2625g、肾茶 2100g、枸杞子 2625g、益智仁 2625g、玉米须 5250g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,滤液减压浓缩至相对密度为 1.30 (60℃)的浸膏,干燥,粉碎成细粉,加入辅料适量,研匀,压制成 10000 粒,即得本发明软胶囊,规格:每粒装 0.5g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0163] 实施例 23:取果茅莓 262.5g、车前草 315g、鱼腥草 262.5g、肾茶 210g、枸杞子 262.5g、益智仁 262.5g、玉米须 525g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.25 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,加适量水拌匀至握之成团,压之能散为度,切割制丸。起模,盖面,包衣,制成 1000 丸,即得本发明丸剂,规格:每丸重 0.2g。用法用量:口服,一次 6 丸,一日 3 次。

[0164] 实施例 24:取果茅莓 1575g、车前草 1890g、鱼腥草 1575g、肾茶 1260g、枸杞子 1575g、益智仁 1575g、玉米须 3150g 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 8 倍,每次煎煮 2 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.20 (60℃)的浸膏,冷却,加 95% 乙醇 2 倍量静置 48 小时,滤过,滤液回收乙醇至无醇味,加入辅料适量,0.2% 苯甲酸钠及 1ml 香精,用开水补足,制成 20000ml,即得本发明口服液,规格:每瓶装 10ml。用法用量:口服,一次 1 瓶,一日 3 次。

[0165] 实施例 25:取果茅莓 5.25kg、车前草 6.3kg、鱼腥草 5.25kg、肾茶 4.2kg、枸杞子 5.25kg、益智仁 5.25kg、玉米须 10.5kg 七味药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,每次煎煮 3 小时,滤过,合并滤液,减压浓缩至相对密度为 1.30 (60℃)的浸膏,加入辅料适量,混匀,

制粒,干燥,制成 20000 粒,即得本发明胶囊,规格:每粒装 0.45g。用法用量:口服,一次 3 粒,一日 3 次。

[0166] 本发明的实施方式不限于上述实施例,在不脱离本发明宗旨的前提下做出的各种变化均属于本发明的保护范围之内。

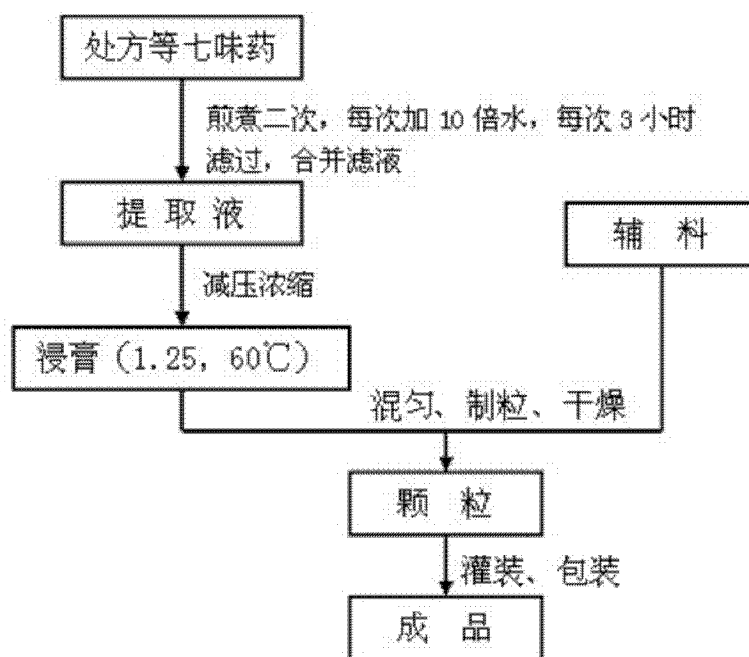


图 1