



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109106913 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201811142767.2

A61K 35/618 (2015.01)

(22) 申请日 2018.09.28

A61K 35/586 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 35/32 (2015.01)

申请公布号 CN 109106913 A

A61K 35/02 (2015.01)

(43) 申请公布日 2019.01.01

(73) 专利权人 黑龙江中医药大学

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路24号

(72) 发明人 任树军 邢国利 王墉琦 任明辉
谭福柱

(74) 专利代理机构 北京高航知识产权代理有限公司 11530

代理人 赵永强

(51) Int. Cl.

A61K 36/9066 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

A61K 35/62 (2006.01)

(56) 对比文件

任树军等. 补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)影响的研究.《中医药学报》.2013,第41卷(第1期),第24-26页.

任树军. 酒精性骨质疏松症发病机制的研究进展.《中国骨质疏松杂志》.2008,第14卷(第8期),第601-604页.

任树军等. 酒精性骨质疏松症的研究概况.《中医药信息》.2008,第25卷(第4期),第12-15页.

任树军等. 补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠小肠中VDR-mRNA表达影响的研究.《中医药信息》.2013,第30卷(第2期),第46-49页.

审查员 李博

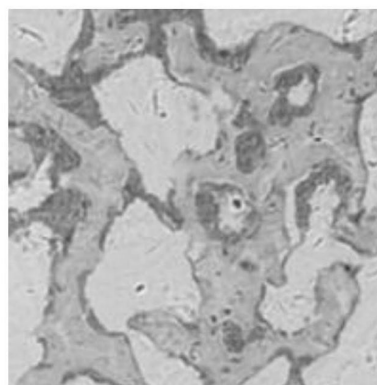
权利要求书4页 说明书20页 附图5页

(54) 发明名称

一种治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于中药领域,发明名称为一种治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物及其制备方法,由以下份数的原料组成:该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪2~8重量份、白术2~8重量份、当归2~8重量份、葛根2~8重量份、丹参2~8重量份、郁金2~8重量份、牛膝2~8重量份、熟地黄1~4重量份、地龙1~4重量份、鹿角胶1~4重量份、龟板1~4重量份、龙骨1~4重量份、牡蛎1~4重量份。本发明生髓健骨药物能够增加骨密度(BMC)提高骨矿含量(BMD);能使骨生物力学性能的各项指标,如最大载荷、极限强度、最大挠度、弹性模量明显改善,提高骨硬度和骨弹性。



1. 一种治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物, 该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成: 黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份, 其特征在于, 该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

(1) 取黄芪、白术、当归、葛根, 粉碎成粗粉, 加8~12倍量80~90%乙醇加热回流提取1~3次, 每次1~3h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R1; 乙醇回流提取后的药渣R2, 保留备用;

(2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并, 加8~12倍量水煎煮提取1~3次, 每次1~3h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R3;

(3) 取地龙、鹿角胶, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1000~1200kPa, 分级频率为35~45Hz, 粉碎时间为25~35min, 得混合超微粉R4;

(4) 取龟板、龙骨、牡蛎, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1400~1600kPa, 分级频率为50~60Hz, 粉碎时间为40~50min, 得混合超微粉R5;

(5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀, 真空干燥, 粉碎, 加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5, 再充分混合均匀, 即得。

2. 如权利要求1所述的生髓健骨药物, 该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成: 黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份, 其特征在于, 该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

(1) 取黄芪、白术、当归、葛根, 粉碎成粗粉, 加10倍量85%乙醇加热回流提取2次, 每次2h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R1; 乙醇回流提取后的药渣R2, 保留备用;

(2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并, 加10倍量水煎煮提取2次, 每次2h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R3;

(3) 取地龙、鹿角胶, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1100kPa, 分级频率为40Hz, 粉碎时间为30min, 得混合超微粉R4;

(4) 取龟板、龙骨、牡蛎, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1500kPa, 分级频率为55Hz, 粉碎时间为45min, 得混合超微粉R5;

(5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀, 真空干燥, 粉碎, 加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5, 再充分混合均匀, 即得。

3. 一种生髓健骨药物的检测方法, 该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成: 黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份, 该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

(1) 取黄芪、白术、当归、葛根, 粉碎成粗粉, 加8~12倍量80~90%乙醇加热回流提取1~3次, 每次1~3h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R1; 乙醇回流提取后的药渣R2, 保留备用;

(2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并, 加8~12倍量水煎煮提取1~3次, 每次1~3h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩, 得到浸膏R3;

(3) 取地龙、鹿角胶, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1000~

1200kPa,分级频率为35~45Hz,粉碎时间为25~35min,得混合超微粉R4;

(4) 取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1400~1600kPa,分级频率为50~60Hz,粉碎时间为40~50min,得混合超微粉R5;

(5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得;

其特征在于,采用RP-HPLC法同时测定生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量,步骤如下:

(1) 色谱条件:色谱柱: C_{18} 柱;流动相:甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液,梯度洗脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇的体积比例从10%线性上升至30%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%;从21min至30min,甲醇的体积比例从30%线性上升至45%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%;从31min至35min,甲醇的体积比例从45%线性上升至50%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%;从36min至45min,甲醇的体积比例从50%线性上升至70%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%;从46min至55min,甲醇的体积比例从70%线性上升至80%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%;流速 $0.5 \sim 1.5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长270~280nm,柱温为25~30℃,进样量5~20 μL ;

(2) 混合对照品溶液的制备:分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含110~120 μg 、10~20 μg 、10~20 μg 、110~120 μg 、10~20 μg 的混合溶液,即得混合对照品溶液;

(3) 供试品溶液的制备:取待测药物,研磨成细粉,精密称取0.5~2.0g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液40mL,在功率210~230W,频率30~40kHz的条件下,超声处理25~35min,冷却,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;

(4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各5~20 μL ,注入高效液相色谱仪,进行测定。

4. 如权利要求3所述的生髓健骨药物的检测方法,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

(1) 取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

(2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

(3) 取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

(4) 取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为

1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

(5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得;

其特征在于,采用RP-HPLC法同时测定生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量,步骤如下:

(1) 色谱条件:色谱柱: C_{18} 柱;流动相:甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液,梯度洗脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇的体积比例从10%线性上升至30%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%;从21min至30min,甲醇的体积比例从30%线性上升至45%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%;从31min至35min,甲醇的体积比例从45%线性上升至50%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%;从36min至45min,甲醇的体积比例从50%线性上升至70%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%;从46min至55min,甲醇的体积比例从70%线性上升至80%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%;流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长274nm,柱温为28℃,进样量10 μL ;

(2) 混合对照品溶液的制备:分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含130 μg 、40 μg 、40 μg 、130 μg 、60 μg 的混合溶液,即得混合对照品溶液;

(3) 供试品溶液的制备:

取待测药物,研磨成细粉,称取1g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液40mL,在功率220W,频率35kHz的条件下,超声处理30min,冷却,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;

(4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各10 μL ,注入高效液相色谱仪,进行测定。

5. 一种生髓健骨药物在制备治疗酒精性骨质疏松症药物中的应用,其特征在于,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

(1) 取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

(2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

(3) 取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

(4) 取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

(5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得;

采用RP-HPLC法同时测定生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量,步骤如下:

(1) 色谱条件:色谱柱: C_{18} 柱;流动相:甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液,梯度洗脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇的体积比例从10%线性上升至30%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%;从21min至30min,甲醇的体积比例从30%线性上升至45%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%;从31min至35min,甲醇的体积比例从45%线性上升至50%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%;从36min至45min,甲醇的体积比例从50%线性上升至70%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%;从46min至55min,甲醇的体积比例从70%线性上升至80%, $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%;流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长274nm,柱温为 28°C ,进样量 $10\mu\text{L}$;

(2) 混合对照品溶液的制备:分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含 $130\mu\text{g}$ 、 $40\mu\text{g}$ 、 $40\mu\text{g}$ 、 $130\mu\text{g}$ 、 $60\mu\text{g}$ 的混合溶液,即得混合对照品溶液;

(3) 供试品溶液的制备:取待测药物,研磨成细粉,称取1g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液40mL,在功率220W,频率35kHz的条件下,超声处理30min,冷却,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;

(4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各 $10\mu\text{L}$,注入高效液相色谱仪,进行测定。

一种治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于中药领域,具体涉及治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物及其制备方法。

背景技术

[0002] 骨质疏松症是由于多种原因导致的骨密度和骨质量下降,骨微结构破坏,造成骨脆性增加,从而容易发生骨折的全身性骨病。骨质疏松症分为原发性和继发性两大类。原发性骨质疏松症又分为绝经后骨质疏松症(I型)、老年性骨质疏松症(II型)和特发性骨质疏松(包括青少年型)三种。绝经后骨质疏松症一般发生在妇女绝经后5~10年内;老年性骨质疏松症一般指老人70岁后发生的骨质疏松;而特发性骨质疏松主要发生在青少年,病因尚不明。继发性骨质疏松症包括:(1)内分泌性骨质疏松症;(2)药物性骨质疏松症;(3)酒精性骨质疏松症;(4)失用性骨质疏松症等。

[0003] 酒精性骨质疏松症是指由于长期过度饮酒引起骨量减少,骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病,属于继发性骨质疏松症,是临床常见的酒精性骨病(酒精性骨质疏松和酒精性股骨头坏死)之一。其患者均有长期的过度饮酒史,骨关节疼痛、驼背、骨密度降低,易骨折、骨折不易愈合,伴有慢性酒精中毒的症状,如肢体远端麻木、疼痛和无力,步态不稳,肢体震颤,烦躁易怒,口渴饮后不解,记忆力减退,反应迟钝等。酒精性骨质疏松症一直尚未得到足够重视,因此对于酒精性骨质疏松症的研究就显得极为必要。

[0004] 黑龙江中医药大学任树军,于雪峰,孙贵才,李洪涛2008年在《中国骨质疏松杂志》杂志上发表论文《酒精性骨质疏松症发病机制的研究进展》(任树军,于雪峰,孙贵才,李洪涛.酒精性骨质疏松症发病机制的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2008(08):601-604.),论文中提出,酒精性骨质疏松症(AOP)是临床常见的酒精性骨病之一,且一直未得到人们的足够重视。文章主要总结AOP发病机制的研究进展,包括饮酒量与骨质疏松的关系,AOP的定义,中医学的主要病因病机和主要病理变化,说明了酒精对骨细胞、钙调节激素[包括1,25-二羟维生素D₃(1,25-(OH)₂-D₃)、甲状旁腺激素(PTH)、降钙素(CT)]、肾上腺皮质类固醇激素、肝脏功能和营养的影响,并指出该病研究现状和存在问题,提示AOP需要进一步深入研究,而从中西医结合的角度研究将是一个新的研究方向和发展趋势。

[0005] 黑龙江中医药大学李洪涛,于雪峰,李登宇,任树军2009年在《中国骨质疏松杂志》杂志上发表论文《糖皮质激素性骨质疏松症发病机理研究进展》(李洪涛,于雪峰,李登宇,任树军.糖皮质激素性骨质疏松症发病机理研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2009,15(02):150-152.),论文中提出,自糖皮质激素发明以来,由于其复杂多样的药理作用决定了其应用的广泛性,但糖皮质激素所致骨质疏松症(GIO)是糖皮质激素(GCs)治疗的严重并发症之一。糖皮质激素通过多种机制干扰骨质的形成和吸收,从而引起骨质疏松和骨折的发病率升高,增加了患者的痛苦,降低了生命质量。文章从多方面对糖皮质激素导致骨质疏松的病理机制进行综述,进一步探讨其发病机理。

[0006] 黑龙江中医药大学任树军,邢国利,姜益常,葛明富,毕旭伟2013年在《中医药学报》杂志上发表论文《补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)影响的研究》(任树军,邢国利,姜益常,葛明富,毕旭伟.补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)影响的研究[J].中医药学报,2013,41(01):24-26.),论文中提出,观察补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松(AOP)大鼠骨密度影响,探讨补肾健脾益气中药防治AOP的作用机理。清洁级成年雄性SD大鼠40只,按随机数字表法分为4组,即模型组、西药对照组、中药干预组、正常对照组,每组各10只,用红星二锅头白酒灌胃法造模(正常对照组给予生理盐水灌胃),同时分别给予生理盐水、碳酸钙阿法D3、健骨灵胶囊、生理盐水灌胃给药。16周后取材,用双能X线骨密度仪检测左股骨上端,应用小动物学软件扫描处理,检测出股骨的骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)。骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)检测显示:模型组与正常组比较明显降低,有显著性差异($P<0.01$)。表明高浓度白酒灌胃大鼠16周后确实存在骨量减少,BMD下降。中药干预组($P<0.01$)、西药对照组($P<0.05$)与模型组相比均有显著升高。中药干预组与西药对照组相比($P<0.05$),说明中药干预组高于西药对照组,有统计学意义。因此AOP大鼠存在明显的骨代谢紊乱,骨形成减少、骨丢失增加,发生骨质疏松。补肾健脾益气法提高AOP大鼠骨密度和骨矿物质含量,抑制骨矿物质的丢失,有效改善实验性AOP大鼠的骨代谢。

[0007] 黑龙江中医药大学任树军,邢国利,葛明富,姜益常,毕旭伟2013年在《中医药信息》杂志上发表论文《补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠小肠中VDR-mRNA表达影响的研究》(任树军,邢国利,葛明富,姜益常,毕旭伟.补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松大鼠小肠中VDR-mRNA表达影响的研究[J].中医药信息,2013,30(02):46-49.),论文中提出,观察补肾健脾益气法对酒精性骨质疏松(AOP)大鼠小肠组织内维生素D受体(VDR)mRNA表达的影响,从基因分子水平探讨AOP发病机制及补肾健脾益气中药防治AOP的作用机理。清洁级成年雄性SD大鼠40只,按随机数字表法分为模型组、西药对照组、中药干预组、正常对照组,每组各10只,用白酒灌胃法造模(正常对照组给予生理盐水灌胃),同时分别给予生理盐水、碳酸钙阿法D3、健骨灵胶囊、生理盐水灌胃给药。16周后取材,进行逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测小肠组织内VDR mRNA的表达。结果:RT-PCR法检测显示:与空白组比较,模型组VDRmRNA表达水平明显下降($P<0.01$);中药干预组及西药对照组用药16周后,与模型组比较,均可明显上调VDRmRNA表达水平($P<0.01$);其中中药干预组上调幅度大于西药对照组($P<0.05$)。最后AOP大鼠存在明显的骨代谢紊乱,骨形成减少、骨丢失增加,发生骨质疏松。补肾健脾益气法对AOP大鼠上调小肠组织内VDR mRNA表达,抑制骨丢失,促进骨形成,有效改善实验性AOP大鼠的骨代谢。

[0008] 黑龙江中医药大学附属第一医院任树军等人于2016年在SCI收录期刊《美国治疗学杂志》(American Journal of Therapeutics)上发表文章《补肾健脾益气法预防酒精性骨质疏松大鼠的实验研究》(Bu-Shen-Jian-Pi-Yi-Qi Therapy Prevents Alcohol-Induced Osteoporosis in Rats),论文中对骨密度(BMD),骨矿物质含量(BMC),骨生物力学性能进行了评估。对血清和尿液进行生化分析。逆转录聚合酶链反应检测维生素D受体(VDR)mRNA水平。与对照组相比,酒精补充组骨代谢指标和生物力学性能显著降低(P 均为0.05)。JGL组BMD、BMC、25(OH)D3、1,25(OH)2D3均高于D3+阿法骨化醇组($P<0.05$)。JGL组U-Ca/Cr和U-P/Cr均高于D3+阿法骨化醇组($P<0.05$)。JGL组VDR mRNA水平与酒精+钙D3+阿法

骨化醇组相比明显升高 ($P < 0.05$)。结果:补肾健脾益气法能抑制实验性酒精性骨质疏松大鼠的骨丢失,促进骨形成,有效改善骨代谢。提高骨密度(BMD)、增加骨矿含量(BMC)、改善股骨生物力学特性、提高VDRmRNA水平、增加 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的反应敏感性和降低S-钙/磷,证实了实验性酒精性骨质疏松的可逆性。

[0009] 黑龙江中医药大学附属第一医院任树军,任明辉,张秀华,王墉琦,谭福柱于2016年在《中医药学报》杂志上发表论文《针刺配合口服仙灵骨葆胶囊治疗膝骨性关节炎合并骨质疏松的回顾性分析》(任树军,任明辉,张秀华,王墉琦,谭福柱.针刺配合口服仙灵骨葆胶囊治疗膝骨性关节炎合并骨质疏松的回顾性分析[J].中医药学报,2016,44(05):120-122.),论文中提出,回顾性分析针刺配合口服仙灵骨葆胶囊疗法治疗膝骨性关节炎合并骨质疏松的临床疗效。将180例膝关节骨性关节炎合并骨质疏松症患者随机分为3组,每组60例,分别采用针刺、口服仙灵骨葆胶囊、针刺配合口服仙灵骨葆胶囊的方法治疗。记录并比较治疗前后三组患者膝关节功能评分,并于治疗后对三组患者的临床疗效进行比较。结果针刺配合口服仙灵骨葆胶囊组的临床疗效优于针刺组、口服仙灵骨葆胶囊组。因此采用针刺配合口服仙灵骨葆胶囊治疗膝骨性关节炎合并骨质疏松,可以明显减轻疼痛,改善膝关节功能,值得临床推广应用。

发明内容

[0010] 本发明的目的是为了解决上述现有技术的不足而提供一种见效快、效果好、且无副作用的一种治疗酒精性骨质疏松的药物及其制备方法及其检测方法。

[0011] 本发明提供了治疗酒精性骨质疏松的药物的药味原料组成。

[0012] 本发明还提供了该药物的制备方法。

[0013] 本发明还提供了该药物中主要活性成分的检测方法;

[0014] 本发明还提供了该药物的制药用途。

[0015] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0016] 一种治疗酒精性骨质疏松症的生髓健骨药物,是由以下重量份的药味原料制成:黄芪2~8重量份、白术2~8重量份、当归2~8重量份、葛根2~8重量份、丹参2~8重量份、郁金2~8重量份、牛膝2~8重量份、熟地黄1~4重量份、地龙1~4重量份、鹿角胶1~4重量份、龟板1~4重量份、龙骨1~4重量份、牡蛎1~4重量份。

[0017] 所述的生髓健骨药物,优选是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份。

[0018] 一种生髓健骨药物的制备方法,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,采用如下方法制备的:

[0019] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加8~12倍量80~90%乙醇加热回流提取1~3次,每次1~3h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0020] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加8~12倍量水煎煮

提取1~3次,每次1~3h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0021] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1000~1200kPa,分级频率为35~45Hz,粉碎时间为25~35min,得混合超微粉R4;

[0022] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1400~1600kPa,分级频率为50~60Hz,粉碎时间为40~50min,得混合超微粉R5;

[0023] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得。

[0024] 所述的生髓健骨药物的制备方法,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,优选是采用如下方法制备的:

[0025] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0026] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0027] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

[0028] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

[0029] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得。

[0030] 一种生髓健骨药物的检测方法,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,该生髓健骨药物是采用如下方法制备的:

[0031] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加8~12倍量80~90%乙醇加热回流提取1~3次,每次1~3h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0032] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加8~12倍量水煎煮提取1~3次,每次1~3h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0033] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1000~1200kPa,分级频率为35~45Hz,粉碎时间为25~35min,得混合超微粉R4;

[0034] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1400~1600kPa,分级频率为50~60Hz,粉碎时间为40~50min,得混合超微粉R5;

[0035] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得;

[0036] 采用RP-HPLC法同时测定本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量,步骤如下:

[0037] (1)色谱条件:色谱柱:C₁₈柱;流动相:甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液,梯度洗

脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇的体积比例从10%线性上升至30%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%;从21min至30min,甲醇的体积比例从30%线性上升至45%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%;从31min至35min,甲醇的体积比例从45%线性上升至50%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%;从36min至45min,甲醇的体积比例从50%线性上升至70%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%;从46min至55min,甲醇的体积比例从70%线性上升至80%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%;流速 $0.5\sim 1.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长270~280nm,柱温为25~30℃,进样量5~20 μL ;

[0038] (2) 混合对照品溶液的制备:分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含110~120 μg 、10~20 μg 、10~20 μg 、110~120 μg 、10~20 μg 的混合溶液,即得混合对照品溶液;

[0039] (3) 供试品溶液的制备:取待测药物,研磨成细粉,精密称取0.5~2.0g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液40mL,在功率210~230W,频率30~40kHz的条件下,超声处理25~35min,冷却,用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;

[0040] (4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各5~20 μL ,注入高效液相色谱仪,进行测定。

[0041] 所述的生髓健骨药物的检测方法,该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成:黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份,该生髓健骨药物是采用如下方法制备的,优选的步骤如下:

[0042] (1) 取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0043] (2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0044] (3) 取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

[0045] (4) 取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

[0046] (5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得;

[0047] 采用RP-HPLC法同时测定本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量,优选步骤如下:

[0048] (1) 色谱条件:色谱柱: C_{18} 柱;流动相:甲醇- $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液,梯度洗脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%, $0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇的体积比例从10%线

性上升至30%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%；从21min至30min，甲醇的体积比例从30%线性上升至45%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%；从31min至35min，甲醇的体积比例从45%线性上升至50%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%；从36min至45min，甲醇的体积比例从50%线性上升至70%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%；从46min至55min，甲醇的体积比例从70%线性上升至80%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%；流速1.0mL·min⁻¹，检测波长274nm，柱温为28℃，进样量10μL；

[0049] (2) 混合对照品溶液的制备：分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量，用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含130μg、40μg、40μg、130μg、60μg的混合溶液，即得混合对照品溶液；

[0050] (3) 供试品溶液的制备：取待测药物，研磨成细粉，称取1g，置于50mL的量瓶中，加体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液40mL，在功率220W，频率35kHz的条件下，超声处理30min，冷却，用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液稀释至刻度，摇匀，用0.22μm的微孔滤膜滤过，取续滤液，即得；

[0051] (4) 测定：精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各10μL，注入高效液相色谱仪，进行测定。

[0052] 一种生髓健骨药物在制备治疗酒精性骨质疏松症药物中的应用，该生髓健骨药物是由以下重量份的药味原料制成：黄芪5重量份、白术4重量份、当归4重量份、葛根4重量份、丹参4重量份、郁金4重量份、牛膝3重量份、熟地黄2重量份、地龙2重量份、鹿角胶2重量份、龟板2重量份、龙骨2重量份、牡蛎2重量份，该生髓健骨药物是采用如下方法制备的：

[0053] (1) 取黄芪、白术、当归、葛根，粉碎成粗粉，加10倍量85%乙醇加热回流提取2次，每次2h，合并提取液，滤过，滤液浓缩，得到浸膏R1；乙醇回流提取后的药渣R2，保留备用；

[0054] (2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并，加10倍量水煎煮提取2次，每次2h，合并提取液，滤过，滤液浓缩，得到浸膏R3；

[0055] (3) 取地龙、鹿角胶，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1100kPa，分级频率为40Hz，粉碎时间为30min，得混合超微粉R4；

[0056] (4) 取龟板、龙骨、牡蛎，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1500kPa，分级频率为55Hz，粉碎时间为45min，得混合超微粉R5；

[0057] (5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀，真空干燥，粉碎，加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5，再充分混合均匀，即得；

[0058] 采用RP-HPLC法同时测定本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量，步骤如下：

[0059] (1) 色谱条件：色谱柱：C₁₈柱；流动相：甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液，梯度洗脱，洗脱顺序：从0min至10min，甲醇的体积比例从0%线性上升至10%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%；从11min至20min，甲醇的体积比例从10%线性上升至30%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%；从21min至30min，甲醇的体积比例从30%线性上升至45%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%；从31min至35min，甲醇的体积比例从45%线性上升至50%，

0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%;从36min至45min,甲醇的体积比例从50%线性上升至70%,0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%;从46min至55min,甲醇的体积比例从70%线性上升至80%,0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%;流速1.0mL·min⁻¹,检测波长274nm,柱温为28℃,进样量10μL;

[0060] (2) 混合对照品溶液的制备:分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含130μg、40μg、40μg、130μg、60μg的混合溶液,即得混合对照品溶液;

[0061] (3) 供试品溶液的制备:取待测药物,研磨成细粉,称取1g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液40mL,在功率220W,频率35kHz的条件下,超声处理30min,冷却,用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用0.22μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;

[0062] (4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各10μL,注入高效液相色谱仪,进行测定。

[0063] 本发明通过以下实验研究验证本发明的有益效果,但是并不限制本发明权利要求的保护范围。采用本发明技术制成的药物,在本发明中称为“本品”或者“生髓健骨药物”。

[0064] 实验一:对酒精性骨质疏松大鼠股骨骨密度(BMD)及骨矿含量(BMC)影响的药物筛选实验研究

[0065] 1材料与方法

[0066] 1.1实验动物

[0067] 黑龙江中医药大学动物实验中心提供清洁级雄性SD大鼠140只,动物合格证号:SCXK(黑)20080103,平均月龄约6月,体质量(220±20g)。按随机数字表法分正常对照组、模型对照组、西药对照组、受试药物S1组、受试药物S2组、受试药物S3组、受试药物S4组,每组各20只,分笼喂养,适应性喂养1周后,称大鼠体质量。

[0068] 1.2实验主要仪器及药物

[0069] 1.2.1实验仪器

[0070] 手术器械:黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

[0071] 电子称:MA110型,上海医用分析仪器厂生产。

[0072] 石蜡包埋机:LEICA EG-1160型,澳大利亚LEICA公司生产。

[0073] 组织切片机:2135型,德国莱卡公司生产。

[0074] 数码显微镜:Moticam3000型,美国Moticam公司生产。

[0075] 微量电子电秤:QDR-MP12120型,上海第二天平仪器厂生产。

[0076] 真彩色计算机图像分析系统:日本OLYMPUS公司生产。

[0077] 游标卡尺:长150mm,精确度0.02mm,北京仪器厂生产。

[0078] 骨密度测量仪:DDX-MD型,双能X线骨密度测量仪(DEXA),美国GE-LUNAR公司生产。

[0079] 1.2.2主要试剂与药物

[0080] 1.2.2.1受试药物S1:处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0081] 制备方法:

[0082] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏SR1;

[0083] (2)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉SR2;

[0084] (3)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉SR3;

[0085] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S1;

[0086] 1.2.2.2受试药物S2:

[0087] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0088] 制备方法:

[0089] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏SR1;

[0090] (2)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉SR2;

[0091] (3)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉SR3;

[0092] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S2;

[0093] 1.2.2.3受试药物S3:

[0094] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0095] 制备方法:

[0096] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0097] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0098] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

[0099] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

[0100] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得受试药物S3;

[0101] 1.2.2.4受试药物S4:

[0102] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0103] 制备方法:

[0104] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄,粉碎成粗粉,加10倍量55%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏SR1;

[0105] (2)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉SR2;

[0106] (3)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉SR3;

[0107] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S4;

[0108] 1.2.2.5碳酸钙片:碳酸钙片:河北三九爱德福药业有限公司出品,批号060823,规格:400mg/片(以钙元素计)。

[0109] 1.2.2.6阿法D3:以色列TEVA药厂生产,昆明贝克诺顿公司分装,批号:061125,批准文号:国药准字J20130162,规格:0.25 μ g/粒;

[0110] 1.2.2.7白酒:红星牌55度二锅头白酒,北京红星有限股份公司生产,生产许可证XK16-0303174,批号:060615,规格:500mL/瓶。

[0111] 1.2.2.8生理盐水:哈尔滨市三联药业有限公司生产,批号:080516B6。

[0112] 1.3实验方法

[0113] 采用大鼠白酒灌胃法,造酒精性骨质疏松症的大鼠模型。健康的清洁级的雄性SD大鼠,按照10mL/(Kg·d)(含纯酒精约4.4g/(Kg·d))的剂量进行灌胃,每日1次,共持续灌胃16周。分别在第8周、第12周和第16周的灌胃后,禁食禁水8h,然后进行标本的采集和生理指标的检测。

[0114] 1.4方法

[0115] 正常对照组:用生理盐水,在每日的上午和下午分别进行灌胃1次。

[0116] 模型对照组:用白酒,在每日的上午灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0117] 西药对照组:用白酒,在每日的上述灌胃1次,在用碳酸钙片(按85mg/10mL/Kg)和阿法D3(按0.05 μ g/10mL/Kg)以生理盐水配成混悬液进行灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0118] 受试药物S1组:用白酒,在每日的上午灌胃1次,在用受试药物S1(给药剂量为5.0g/10mL/Kg,以生理盐水配成混悬液)进行灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0119] 受试药物S2组:用白酒,在每日的上午灌胃1次,在用受试药物S2(给药剂量为5.0g/10mL/Kg,以生理盐水配成混悬液)进行灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0120] 受试药物S3组:用白酒,在每日的上午灌胃1次,在用受试药物S3(给药剂量为5.0g/10mL/Kg,以生理盐水配成混悬液)进行灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0121] 受试药物S4组:用白酒,在每日的上午灌胃1次,在用受试药物S4(给药剂量为5.0g/10mL/Kg,以生理盐水配成混悬液)进行灌胃1次,下午用生理盐水灌胃1次。

[0122] 实验的全过程中,所有的实验用的大鼠均自由进食,饲料为标准营养颗粒,均自由饮水。

[0123] 1.5标本采集和生理指标检测

[0124] 骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)检测

[0125] 在造模并给药后第8周、第12周和第16周时,采取颈椎脱位断髓法将实验的各组的

部分大鼠处死,将大鼠的左侧股骨完整地解剖出,将肌肉和结缔组织都剔除,用大量的生理盐水进行冲洗。再用湿纱布包裹,采用双能X线骨密度仪进行BMD和BMC的检测。将大鼠的左股骨上端置于DXA测定仪的探头下,应用软件扫描处理,检测出股骨的BMD和BMC含量。测定过程由哈尔滨医科大学附属第二医院骨密度室协助完成。

[0126] 1.6统计学分析

[0127] 用SPSS19.0软件,进行t检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

[0128] 2结果

[0129] 2.1各组大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)检测实验结果见表1、见表2、见表3。

[0130] 表1 8周时各组实验大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC) (单位: $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)

组别	n	骨密度(BMD)	骨矿含量(BMC)
正常对照组	20	0.293 ± 0.036	0.152 ± 0.025
模型对照组	20	$0.216 \pm 0.032^{**}$	$0.121 \pm 0.021^{**}$
西药对照组	20	$0.242 \pm 0.039^{\#}$	$0.142 \pm 0.016^{\#}$
受试药物 S1 组	20	0.226 ± 0.034	0.123 ± 0.028
受试药物 S2 组	20	0.228 ± 0.030	0.125 ± 0.018
受试药物 S3 组	20	$0.239 \pm 0.033^{\#}$	$0.146 \pm 0.019^{\#}$
受试药物 S4 组	20	0.225 ± 0.030	0.126 ± 0.021

[0132] 注:与正常对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与模型对照组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

[0133] 表2 12周时各组实验大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC) (单位: $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)

组别	n	骨密度(BMD)	骨矿含量(BMC)
正常对照组	20	0.286 ± 0.022	0.153 ± 0.026
模型对照组	20	$0.225 \pm 0.019^{**}$	$0.112 \pm 0.028^{**}$
西药对照组	20	$0.262 \pm 0.018^{\#}$	$0.132 \pm 0.024^{\#}$
受试药物 S1 组	20	0.231 ± 0.018	0.116 ± 0.016
受试药物 S2 组	20	0.235 ± 0.023	0.118 ± 0.021
受试药物 S3 组	20	$0.263 \pm 0.028^{\#}$	$0.134 \pm 0.026^{\#}$
受试药物 S4 组	20	0.230 ± 0.024	0.119 ± 0.019

[0135] 注:与正常对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与模型对照组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

[0136] 表3 16周时各组实验大鼠骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC) (单位: $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)

组别	n	骨密度(BMD)	骨矿含量(BMC)
正常对照组	20	0.278 ± 0.031	0.161 ± 0.026
模型对照组	20	$0.216 \pm 0.028^{**}$	$0.098 \pm 0.023^{**}$
西药对照组	20	$0.268 \pm 0.032^{\#}$	$0.141 \pm 0.028^{\#}$
受试药物 S1 组	20	0.218 ± 0.026	0.108 ± 0.015
受试药物 S2 组	20	0.220 ± 0.028	0.119 ± 0.021
受试药物 S3 组	20	$0.267 \pm 0.027^{\#}$	$0.143 \pm 0.026^{\#}$
受试药物 S4 组	20	0.222 ± 0.029	0.112 ± 0.024

[0138] 注:与正常对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与模型对照组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

[0139] 各组大鼠左侧股骨骨密度、骨矿含量指标测定结果比较模型对照组与空白组比较,大鼠股骨的骨密度、骨矿含量均显著降低($P<0.01$)。受试药物S3组和西药对照组均有不同程度改善($P<0.05$),而受试药物S1组、受试药物S2组、受试药物S4组的骨密度、骨矿含量

虽然也有不同程度的改善,但与模型组比较,无显著性差异 ($P>0.05$)。受试药物S3组(本发明生髓健骨药物)的骨密度、骨矿含量均与西药对照组相当,无显著性差异 ($P>0.05$)。

[0140] 3结论

[0141] 本研究结果表明,各组大鼠左侧股骨骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)指标测定结果比较,模型对照组与空白组比较,大鼠股骨的骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)均显著降低 ($P<0.01$),说明造模成功。

[0142] 受试药物S3组和西药对照组均有明显改善 ($P<0.01$),受试药物S1组、受试药物S2组、受试药物S4组也有一定的改善,但与模型组比较,无显著性差异 ($P>0.05$)。

[0143] 应用本发明生髓健骨药物(受试药物S3)会使股骨的骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)均有明显改善,提高骨硬度、骨弹性,增加骨密度和骨矿含量,对治疗酒精性骨质疏松症,效果显著。

[0144] 实验二:对酒精性骨质疏松大鼠股骨生物力学影响的药物筛选实验研究

[0145] 1材料与amp;方法

[0146] 1.1实验动物(同实验一)

[0147] 1.2实验主要仪器及药物

[0148] 1.2.1实验仪器

[0149] 手术器械:黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

[0150] 电子称:MA110型,上海医用分析仪器厂生产。

[0151] 石蜡包埋机:LEICA EG-1160型,澳大利亚LEICA公司生产。

[0152] 组织切片机:2135型,德国莱卡公司生产。

[0153] 数码显微镜:Moticam3000型,美国Moticam公司生产。

[0154] 微量电子电秤:QDR-MP12120型,上海第二天平仪器厂生产。

[0155] 真彩色计算机图像分析系统:日本OLYMPUS公司生产。

[0156] 游标卡尺:长150mm,精确度0.02mm,北京仪器厂生产。

[0157] 电子万能试验机:AGS-10KNG型,日本岛津公司生产。

[0158] 1.2.2主要试剂与药物(同实验一)

[0159] 1.3实验方法(同实验一)

[0160] 1.4方法(同实验一)

[0161] 1.5标本采集和生理指标检测

[0162] 1.5.1大鼠股骨结构力学性能

[0163] 在造模并给药后第8周、第12周和第16周时,采取颈椎脱位断髓法将实验的各组的部分大鼠处死,剖出完整的左侧股骨,将结缔组织和残余肌肉剔除,用生理盐水冲洗过后,再用湿纱布包敷,测量股骨中段外径,计算截面面积;采用电子万能试验机,对股骨进行三点弯曲实验。计算大鼠股骨的四项骨生物力学指标,分别为:最大载荷、最大挠度、弹性模量、极限强度。

[0164] 检测方法:将制备好的大鼠股骨标本置于电子万能试验机上,测量两支座间的距离,即跨距,确定加载点。放置稳定后,调整电子万能试验机的十字头的位置,使其于大鼠股骨完全接触的压力值为零,设定电子万能试验机的十字头运动加速度参数、试验机量程参数和原始位移参数,进行实验测定。

[0165] 1.5.2大鼠股骨组织学处理

[0166] 在造模后的第16周末处死各组中的部分大鼠,取股骨做组织学的标本制备。在4%的PFA溶液中,加入0.1M磷酸缓冲液,调整pH值为7.2,将股骨置于其中,室温固定3d;在20%EDTA溶液中,加入0.1M磷酸缓冲液,调整pH值为7.2,将股骨置于其中,浸泡9d,进行脱钙处理,再经乙醇脱水,再用石蜡进行包埋,切片,沿股骨干长轴方向行厚度切成5 μ m厚片,部分进行HE染色。随机取5张股骨切片标本,分别在 $\times 400$ 奥林巴斯FV1000放大激光扫描共聚焦显微镜下观察。

[0167] 1.6统计学分析

[0168] 用SPSS19.0软件,进行t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

[0169] 2结果

[0170] 2.1各组大鼠股骨结构力学性能的比较,见表4、见表5、见表6。

[0171] 表4 8周时各组大鼠股骨结构力学性能的比较($\bar{x} \pm SD$)

组别	n	最大载荷(N)	最大挠度(mm)	弹性模量(GPa)	极限强度(MPa)
正常对照组	20	124.65 $\pm$ 9.65	0.82 $\pm$ 0.07	5.01 $\pm$ 0.75	110.47 $\pm$ 7.83
模型对照组	20	99.65 $\pm$ 7.43**	0.49 $\pm$ 0.08**	3.68 $\pm$ 0.63**	92.58 $\pm$ 8.86**
[0172] 西药对照组	20	121.94 $\pm$ 8.64 [#]	0.69 $\pm$ 0.11 [#]	4.52 $\pm$ 0.84 [#]	107.39 $\pm$ 6.67 [#]
受试药物 S1 组	20	107.48 $\pm$ 5.34	0.56 $\pm$ 0.08	3.97 $\pm$ 0.55	94.58 $\pm$ 8.78
受试药物 S2 组	20	102.48 $\pm$ 8.75	0.55 $\pm$ 0.09	4.02 $\pm$ 0.85	96.48 $\pm$ 7.57
受试药物 S3 组	20	120.75 $\pm$ 9.47 [#]	0.74 $\pm$ 0.12 [#]	4.89 $\pm$ 0.77 [#]	106.65 $\pm$ 6.54 [#]
受试药物 S4 组	20	103.65 $\pm$ 8.67	0.53 $\pm$ 0.08	3.96 $\pm$ 0.58	96.68 $\pm$ 7.76

[0173] 注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

[0174] 表5 12周时各组大鼠股骨结构力学性能的比较($\bar{x} \pm SD$)

组别	n	最大载荷(N)	最大挠度(mm)	弹性模量(GPa)	极限强度(MPa)
正常对照组	20	118.54 $\pm$ 7.87	0.72 $\pm$ 0.08	4.97 $\pm$ 0.65	111.89 $\pm$ 8.74
模型对照组	20	97.86 $\pm$ 8.45**	0.48 $\pm$ 0.09**	3.55 $\pm$ 0.65**	87.68 $\pm$ 8.45**
[0175] 西药对照组	20	114.28 $\pm$ 7.54 [#]	0.59 $\pm$ 0.11 [#]	4.68 $\pm$ 0.72 [#]	104.69 $\pm$ 7.38 [#]
受试药物 S1 组	20	99.18 $\pm$ 6.32	0.49 $\pm$ 0.11	3.82 $\pm$ 0.55	91.26 $\pm$ 7.45
受试药物 S2 组	20	101.85 $\pm$ 7.75	0.48 $\pm$ 0.12	3.88 $\pm$ 0.75	92.56 $\pm$ 6.64
受试药物 S3 组	20	113.96 $\pm$ 6.46 [#]	0.58 $\pm$ 0.13 [#]	4.59 $\pm$ 0.84 [#]	104.56 $\pm$ 6.68 [#]
受试药物 S4 组	20	99.57 $\pm$ 6.77	0.47 $\pm$ 0.09	3.78 $\pm$ 0.74	90.98 $\pm$ 8.98

[0176] 注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

[0177] 表6 16周时各组大鼠股骨结构力学性能的比较($\bar{x} \pm SD$)

组别	n	最大载荷(N)	最大挠度(mm)	弹性模量(GPa)	极限强度(MPa)
正常对照组	20	116.68 $\pm$ 8.68	0.74 $\pm$ 0.08	4.96 $\pm$ 0.75	113.45 $\pm$ 12.56
[0178] 模型对照组	20	93.54 $\pm$ 8.54**	0.45 $\pm$ 0.07**	3.69 $\pm$ 0.54**	92.45 $\pm$ 14.54**
西药对照组	20	109.24 $\pm$ 8.54 [#]	0.67 $\pm$ 0.09 ^{##}	4.48 $\pm$ 0.65 [#]	105.56 $\pm$ 10.54 [#]
受试药物 S1 组	20	97.85 $\pm$ 8.68	0.49 $\pm$ 0.08	3.71 $\pm$ 0.85	95.65 $\pm$ 9.28
受试药物 S2 组	20	98.54 $\pm$ 9.24	0.52 $\pm$ 0.11	3.72 $\pm$ 0.65	96.08 $\pm$ 9.31
[0179] 受试药物 S3 组	20	108.28 $\pm$ 7.18 [#]	0.64 $\pm$ 0.11 [#]	4.68 $\pm$ 0.54 [#]	106.54 $\pm$ 8.28 [#]
受试药物 S4 组	20	98.74 $\pm$ 8.78	0.51 $\pm$ 0.08	3.82 $\pm$ 0.85	94.82 $\pm$ 9.45

[0180] 注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

[0181] 各组大鼠左侧股骨生物力学指标测定结果比较模型对照组与空白组比较,大鼠股骨的最大载荷、极限强度、最大挠度、弹性模量均显著降低($P < 0.01$)。受试药物S3组和西药对照组均有不同程度改善($P < 0.05$),而受试药物S1组、受试药物S2组、受试药物S4组的最大

载荷、极限强度、最大挠度、弹性模量虽然也有不同程度的改善,但与模型组比较,无显著性差异($P>0.05$)。受试药物S3组(本发明生髓健骨药物)的最大载荷、极限强度、弹性模量、最大挠度均与西药对照组相当,无显著性差异($P>0.05$)。

[0182] 2.2各组大鼠股骨组织学检测

[0183] 实验结果见说明书附图1、附图2、附图3、附图4、附图5、附图6。

[0184] 图1显示,正常对照组大鼠股骨的小梁面积、平均骨小梁厚度、骨小梁密度分布均匀、规整。

[0185] 图2显示,模型组大鼠股骨骨小梁面积、平均骨小梁厚度、骨小梁密度显著降低,而髓腔质间隔宽度则明显增加。

[0186] 图3显示,西药对照组大鼠股骨平均骨小梁密度、平均骨小梁厚度和骨小梁面积较模型组均显著上升,同时髓腔质间隔宽度明显下降。

[0187] 图4显示,受试药物S1组大鼠股骨骨小梁面积、平均骨小梁厚度、骨小梁密度略有降低,髓腔质间隔宽度明显增加。

[0188] 图5显示,受试药物S2组大鼠股骨骨小梁面积、平均骨小梁厚度、骨小梁密度略有降低,髓腔质间隔宽度明显增加。

[0189] 图6显示,受试药物S3组大鼠股骨平均骨小梁密度、平均骨小梁厚度和骨小梁面积较模型组均显著上升,同时髓腔质间隔宽度明显下降。

[0190] 图7显示,受试药物S4组大鼠股骨骨小梁面积、平均骨小梁厚度、骨小梁密度略有降低,髓腔质间隔宽度明显增加。

[0191] 3结论

[0192] 本研究结果表明,各组大鼠左侧股骨生物力学指标测定结果比较,模型对照组与空白组比较,大鼠股骨的最大载荷、极限强度、最大挠度、弹性模量均显著降低($P<0.01$),说明造模成功。

[0193] 受试药物S3组和西药对照组均有明显改善($P<0.01$),受试药物S1组、受试药物S2组、受试药物S4组也有一定的改善,但与模型组比较,无显著性差异($P>0.05$)。

[0194] 应用本发明生髓健骨药物(受试药物S3)会使股骨的最大载荷、极限强度、最大挠度、弹性模量均有明显改善,提高骨硬度、骨弹性,增加骨密度和骨矿含量,对治疗酒精性骨质疏松症,效果显著。

[0195] 实验三:RP-HPLC法同时测定本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量

[0196] 黄芪中含有的黄芪甲苷、芒柄花素,白术中含有的苍术苷A、紫丁香苷;当归中含有的藁本内酯,是本发明生髓健骨药物治疗酒精性骨质疏松的重要活性成分。本发明建立RP-HPLC法对其进行含量测定,研究如下:

[0197] 1仪器与试药

[0198] 1.1仪器

[0199] Waters 2695高效液相色谱仪(包括四元泵、二极管阵列检测器、在线脱气机、自动进样器);电子分析天平(上海丙林电子科技有限公司);超声波清洗器(上海易净超声波仪器有限公司)。

[0200] 1.2试药

[0201] 本发明生髓健骨药物,采用如下处方和制备方法制备:

[0202] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g。

[0203] 制备方法:

[0204] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0205] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0206] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

[0207] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

[0208] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得生髓健骨药物。

[0209] 黄芪甲苷对照品(由上海纯优生物科技有限公司提供,批号120511-201601,含量99.3%)、芒柄花素对照品(由大连美仑生物技术有限公司提供,批号111205-201602,含量99.2%)、苍术苷A对照品(由南京春秋生物工程有限公司提供,批号111214-201601,含量99.6%)、藁本内酯对照品(由成都曼思特生物科技有限公司提供,批号120226-201512,含量99.2%)、紫丁香苷对照品(由上海熹垣生物科技有限公司提供,批号101221-201601,含量99.1%)。三氟乙酸为分析纯,甲醇为色谱纯,水为超纯水。

[0210] 2方法与结果

[0211] 2.1溶液制备

[0212] 2.1.1混合对照品溶液的制备

[0213] 分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量,用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含130μg、40μg、40μg、130μg、60μg的混合溶液,即得混合对照品溶液。

[0214] 2.1.2供试品溶液的制备

[0215] 取本发明生髓健骨药物,研磨成细粉,称取1g,置于50mL的量瓶中,加体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液40mL,在功率220W,频率35kHz的条件下,超声处理30min,冷却,用体积比为8:2的甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液稀释至刻度,摇匀,用0.22μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

[0216] 2.1.3阴性样品溶液的制备

[0217] 按本发明提供的制备方法,制备缺黄芪、白术、当归的阴性样品,分别按本发明提供的供试品溶液的制备方法进行操作,制成不同质量浓度的阴性样品溶液。

[0218] 2.2色谱条件及系统适用性试验

[0219] 色谱柱:C₁₈(规格:250mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇-0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液,梯度洗脱,洗脱顺序:从0min至10min,甲醇的体积比例从0%线性上升至10%,0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%;从11min至20min,甲醇

的体积比例从10%线性上升至30%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%；从21min至30min，甲醇的体积比例从30%线性上升至45%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%；从31min至35min，甲醇的体积比例从45%线性上升至50%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%；从36min至45min，甲醇的体积比例从50%线性上升至70%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%；从46min至55min，甲醇的体积比例从70%线性上升至80%，0.25mol·L⁻¹三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%；流速1.0mL·min⁻¹，检测波长274nm，柱温为28℃，进样量10μL。

[0220] 在上述色谱条件下，理论塔板数以黄芪甲苷计不低于3500。混合对照品、样品、阴性样品色谱图见说明书附图8、附图9、附图10、附图11、附图12。结果表明，黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷5个待测成分的色谱峰与相邻峰的分度均大于1.3，其他成分对五个待测的活性成分的检测，没有明显干扰。

[0221] 2.3方法学验证

[0222] 2.3.1线性关系考察

[0223] 精密吸取混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0mL，分别置于10mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取10μL进样，记录色谱图。横坐标为质量浓度X(μg·mL⁻¹)，纵坐标为峰面积Y，制图，得回归方程。结果见表7。将混合对照品溶液逐级稀释，进样测定，以10倍信噪比为定量限，结果黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的定量限分别为0.145μg·mL⁻¹、0.056μg·mL⁻¹、0.052μg·mL⁻¹、0.34μg·mL⁻¹、0.074μg·mL⁻¹。

[0224] 表7 黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷线性关系结果

[0225]	成分	线性方程	R	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
	黄芪甲苷	$Y=1.36 \times 10^4 X - 1.65 \times 10^4$	0.9997	1.13~135
	芒柄花素	$Y=2.16 \times 10^4 X + 4.26 \times 10^2$	0.9998	0.116~10.2
	苍术苷 A	$Y=2.16 \times 10^4 X - 5.48 \times 10^1$	0.9999	0.112~11.8
	藁本内酯	$Y=3.68 \times 10^3 X + 2.82 \times 10^3$	0.9999	1.14~116.6
	紫丁香苷	$Y=4.22 \times 10^3 X - 5.43 \times 10^2$	0.9999	0.17~18.2

[0226] 2.3.2精密度试验

[0227] 精密吸取黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷质量浓度分别为20.0 μg·mL⁻¹、2.0 μg·mL⁻¹、2.0 μg·mL⁻¹、20.0 μg·mL⁻¹、5.0 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液10μL，连续进样6次，测定峰面积，计算RSD分别为1.2%、1.0%、0.6%、0.9%、1.1%；结果表明，仪器精密度良好。

[0228] 2.3.3稳定性试验

[0229] 取同一份供试品溶液，分别于0、1、2、4、8、16h，按本发明提供的色谱条件测定峰面积，黄芪甲苷色谱峰面积的RSD为1.6%、芒柄花素色谱峰面积的RSD为1.7%、苍术苷A色谱峰面积的RSD为1.6%、藁本内酯色谱峰面积的RSD为0.9%、紫丁香苷色谱峰面积的RSD为1.8%；结果表明，供试品溶液在16h内稳定。

[0230] 2.3.4重复性试验取

[0231] 同一批样品6份，按照本发明提供的方法制备供试品溶液，在本发明提供的色谱条

件下分别进样测定。结果样品中的黄芪甲苷平均质量分数为 $505.4\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、RSD为1.3%；芒柄花素平均质量分数为 $52.3\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、RSD为1.6%；苍术苷A平均质量分数为 $62.2\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、RSD为1.6%；藁本内酯平均质量分数为 $58.5\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、RSD为0.8%；紫丁香苷平均质量分数为 $51.3\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、RSD为1.5%；结果表明，方法重复性良好。

[0232] 2.3.5加样回收率试验

[0233] 取6份已测知含量的本发明生髓健骨药物适量，研磨成细粉，精密称取约1.0g，置于50mL的量瓶中，精密加入混合对照品溶液5.0mL，按照本发明提供的方法制备供试溶液，按照本发明提供的色谱条件进行测定，计算回收率。实验结果表明，黄芪甲苷平均回收率为98.6%、RSD为2.3%；芒柄花素平均回收率为99.3%、RSD为2.1%；苍术苷A平均回收率为101.6%、RSD为2.0%；藁本内酯平均回收率为102.8%、RSD为1.8%；紫丁香苷平均回收率为101.9%、RSD为1.9%。

[0234] 2.3.6样品含量测定

[0235] 取不同批号的本发明生髓健骨药物，各2份，本发明提供的方法制备成供试品溶液，在本发明提供的色谱条件下分别进样测定，外标法计算含量。结果见表8。

[0236] 表8 本发明生髓健骨药物中5个成分的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

	批号	黄芪甲苷	芒柄花素	苍术苷 A	藁本内酯	紫丁香苷
[0237]	160507	505.5	53.5	62.3	57.9	52.5
	160530	507.7	52.6	64.3	58.6	51.8
	160608	506.5	53.7	63.2	59.8	52.4
	160622	505.6	55.2	61.9	58.8	55.2
	160703	504.6	53.6	64.6	59.3	54.8
	160723	504.7	51.8	62.8	58.2	52.1

[0238] 3结论

[0239] 本发明建立的方法能同时分离本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量，方法简便、准确、可靠，重复性好，可用于本发明生髓健骨药物的含量测定。

[0240] 实验四：采用高效液相色谱法测定不同制备方法下制备的受试药物中活性成分含量的比较实验

[0241] 1不同制备方法下制备的受试药物

[0242] 1.1受试药物S1：处方：黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g；

[0243] 制备方法：

[0244] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄，粉碎成粗粉，加10倍量85%乙醇加热回流提取2次，每次2h，合并提取液，滤过，滤液浓缩，得到浸膏SR1；

[0245] (2)取地龙、鹿角胶，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1100kPa，分级频率为40Hz，粉碎时间为30min，得混合超微粉SR2；

[0246] (3)取龟板、龙骨、牡蛎，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1500kPa，分级频率为55Hz，粉碎时间为45min，得混合超微粉SR3；

[0247] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混

合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S1;

[0248] 1.2受试药物S2:

[0249] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0250] 制备方法:

[0251] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏SR1;

[0252] (2)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉SR2;

[0253] (3)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉SR3;

[0254] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S2;

[0255] 1.3受试药物S3:

[0256] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0257] 制备方法:

[0258] (1)取黄芪、白术、当归、葛根,粉碎成粗粉,加10倍量85%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R1;乙醇回流提取后的药渣R2,保留备用;

[0259] (2)取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并,加10倍量水煎煮提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏R3;

[0260] (3)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉R4;

[0261] (4)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉R5;

[0262] (5)将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀,真空干燥,粉碎,加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5,再充分混合均匀,即得受试药物S3;

[0263] 1.4受试药物S4:

[0264] 处方:黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g;

[0265] 制备方法:

[0266] (1)取黄芪、白术、当归、葛根、丹参、郁金、牛膝、熟地黄,粉碎成粗粉,加10倍量55%乙醇加热回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,滤液浓缩,得到浸膏SR1;

[0267] (2)取地龙、鹿角胶,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,分级频率为40Hz,粉碎时间为30min,得混合超微粉SR2;

[0268] (3)取龟板、龙骨、牡蛎,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1500kPa,分级频率为55Hz,粉碎时间为45min,得混合超微粉SR3;

[0269] (4)将步骤(1)得到的浸膏SR1、步骤(2)得到的混合超微粉SR2和步骤(3)得到的混

合超微粉SR3,充分混合均匀,即得受试药物S4;

[0270] 2测定

[0271] 采用本发明实验三提供的高效液相色谱法同时测定药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷含量的方法进行测定。

[0272] 3测定结果

[0273] 测定结果见表9。

[0274] 表9 不同制备方法下制备的受试药物中活性成分含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

	批号	黄芪甲苷	芒柄花素	苍术苷 A	藁本内酯	紫丁香苷
	受试药物 S1	235.8	20.3	28.6	31.2	26.5
[0275]	受试药物 S2	249.8	16.4	26.1	29.5	22.7
	受试药物 S3	506.3	54.9	61.8	56.2	53.4
	受试药物 S4	202.4	18.3	22.3	26.4	23.1

[0276] 4结论

[0277] 由上表实验结果可见,采用本发明提供的制备方法制备得到的受试药物S3,其含有的黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量明显高于其他制备方法下制备所得的药物,这也可能是受试药物S3(本发明药物)在治疗酒精性骨质疏松的疗效优于其他药物的原因。

附图说明:

[0278] 图1为正常对照组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0279] 图2为模型组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0280] 图3为西药对照组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0281] 图4为受试药物S1组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0282] 图5为受试药物S2组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0283] 图6为受试药物S3组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0284] 图7为受试药物S4组大鼠股骨组织学检测显微图(400×)

[0285] 图8为混合对照品溶液的HPLC色谱图,其中:1号峰为黄芪甲苷色谱峰;2号峰为芒柄花素色谱峰;3号峰为苍术苷A色谱峰;4号峰为藁本内酯色谱峰;5号峰为紫丁香苷色谱峰。

[0286] 图9为缺黄芪的阴性样品溶液的HPLC色谱图,其中:3号峰为苍术苷A色谱峰;4号峰为藁本内酯色谱峰;5号峰为紫丁香苷色谱峰。

[0287] 图10为缺白术的阴性样品溶液的HPLC色谱图,其中:1号峰为黄芪甲苷色谱峰;2号峰为芒柄花素色谱峰;4号峰为藁本内酯色谱峰。

[0288] 图11为缺当归的阴性样品溶液的HPLC色谱图,其中:1号峰为黄芪甲苷色谱峰;2号峰为芒柄花素色谱峰;3号峰为苍术苷A色谱峰;5号峰为紫丁香苷色谱峰。

[0289] 图12为供试品溶液的HPLC色谱图,其中:1号峰为黄芪甲苷色谱峰;2号峰为芒柄花素色谱峰;3号峰为苍术苷A色谱峰;4号峰为藁本内酯色谱峰;5号峰为紫丁香苷色谱峰。

具体实施方式：

[0290] 如下的实施例用于对本发明技术方案的进一步说明，但不限制于本发明权利要求的保护范围。

[0291] 实施例1：

[0292] 处方：黄芪500g、白术400g、当归400g、葛根400g、丹参400g、郁金400g、牛膝300g、熟地黄200g、地龙200g、鹿角胶200g、龟板200g、龙骨200g、牡蛎200g，该生髓健骨胶囊(原名健骨灵胶囊)是采用如下方法制备的：

[0293] 制备方法：

[0294] (1) 取黄芪、白术、当归、葛根，粉碎成粗粉，加10倍量85%乙醇加热回流提取2次，每次2h，合并提取液，滤过，滤液浓缩，得到浸膏R1；乙醇回流提取后的药渣R2，保留备用；

[0295] (2) 取丹参、郁金、牛膝、熟地黄与步骤(1)得到的药渣R2合并，加10倍量水煎煮提取2次，每次2h，合并提取液，滤过，滤液浓缩，得到浸膏R3；

[0296] (3) 取地龙、鹿角胶，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1100kPa，分级频率为40Hz，粉碎时间为30min，得混合超微粉R4；

[0297] (4) 取龟板、龙骨、牡蛎，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1500kPa，分级频率为55Hz，粉碎时间为45min，得混合超微粉R5；

[0298] (5) 将步骤(1)得到的浸膏R1与步骤(2)得到的浸膏R3混合均匀，真空干燥，粉碎，加入步骤(3)得到的混合超微粉R4和步骤(4)得到的混合超微粉R5，再充分混合均匀，即得生髓健骨药物；

[0299] 采用RP-HPLC法同时测定本发明生髓健骨药物中黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的含量，步骤如下：

[0300] (1) 色谱条件：色谱柱： C_{18} 柱；流动相：甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液，梯度洗脱，洗脱顺序：从0min至10min，甲醇的体积比例从0%线性上升至10%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从100%线性下降至90%；从11min至20min，甲醇的体积比例从10%线性上升至30%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从90%线性下降至70%；从21min至30min，甲醇的体积比例从30%线性上升至45%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从70%线性下降至55%；从31min至35min，甲醇的体积比例从45%线性上升至50%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从55%线性下降至50%；从36min至45min，甲醇的体积比例从50%线性上升至70%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从50%线性下降至30%；从46min至55min，甲醇的体积比例从70%线性上升至80%， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液的体积比例从30%线性下降至20%；流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，检测波长274nm，柱温为28℃，进样量10 μL ；

[0301] (2) 混合对照品溶液的制备：分别精密称定黄芪甲苷、芒柄花素、苍术苷A、藁本内酯、紫丁香苷的对照品适量，用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液并定量稀释成每1mL分别含130 μg 、40 μg 、40 μg 、130 μg 、60 μg 的混合溶液，即得混合对照品溶液；

[0302] (3) 供试品溶液的制备：取待测药物，研磨成细粉，称取1g，置于50mL的量瓶中，加体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液40mL，在功率220W，频率35kHz的条件下，超声处理30min，冷却，用体积比为8:2的甲醇- $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水溶液稀释至刻度，摇匀，用0.22 μm 的微孔滤膜滤过，取续滤液，即得；

[0303] (4) 测定:精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液的制备各10 μ L,注入高效液相色谱仪,进行测定。

[0304] (5) 测定结果:每克药物含黄芪甲苷为503.3mg,每克药物含芒柄花素为52.4mg,每克药物含苍术苷A为62.1mg,每克药物含藁本内酯为55.8mg,每克药物含紫丁香苷为52.4mg。

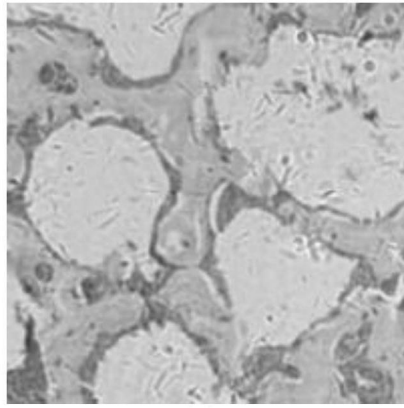


图1

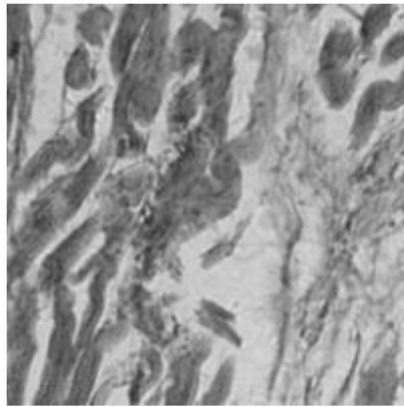


图2

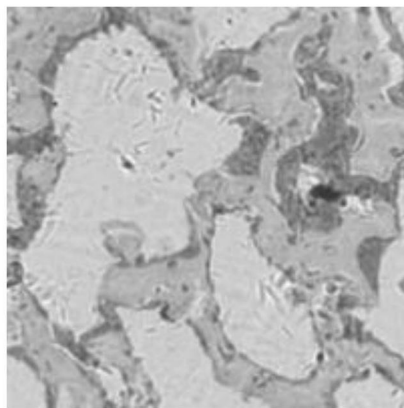


图3

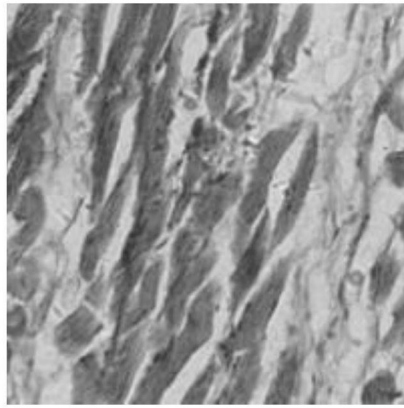


图4

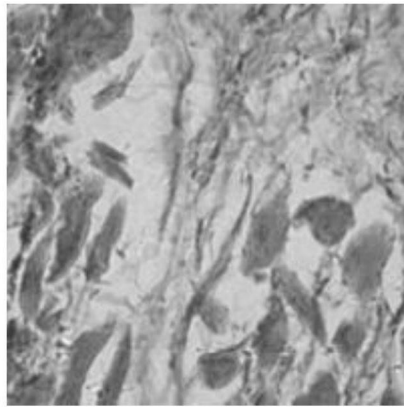


图5

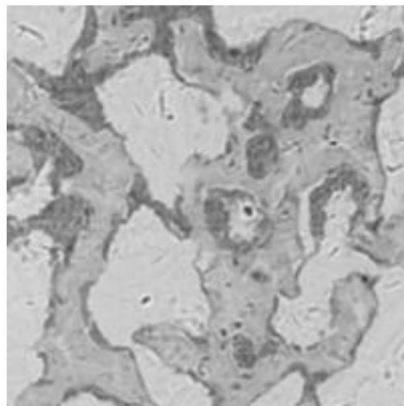


图6

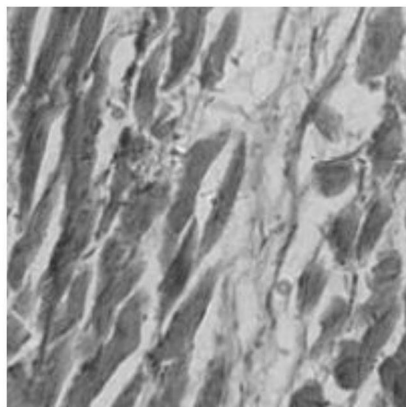


图7

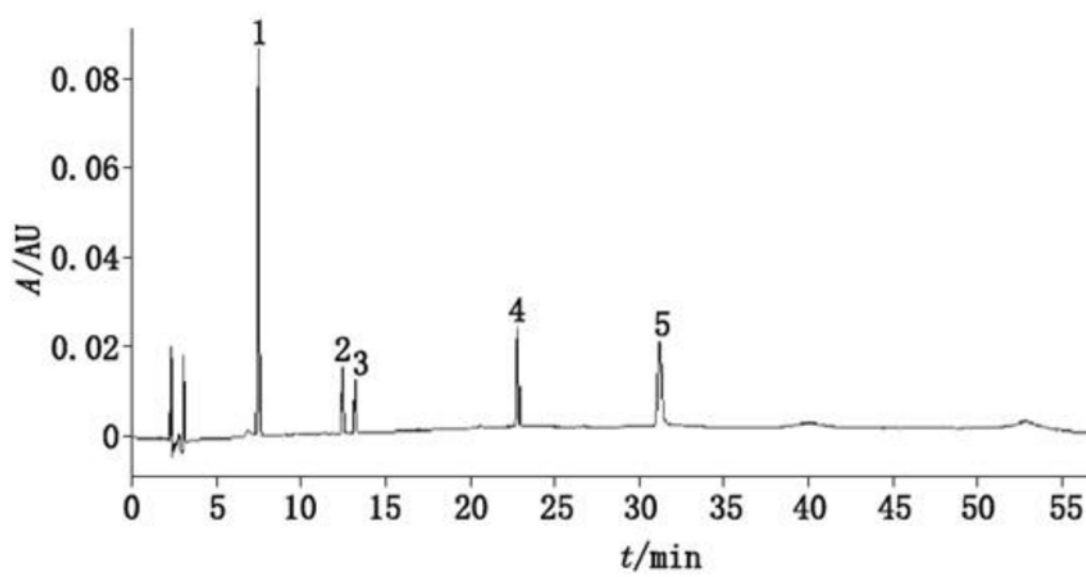


图8

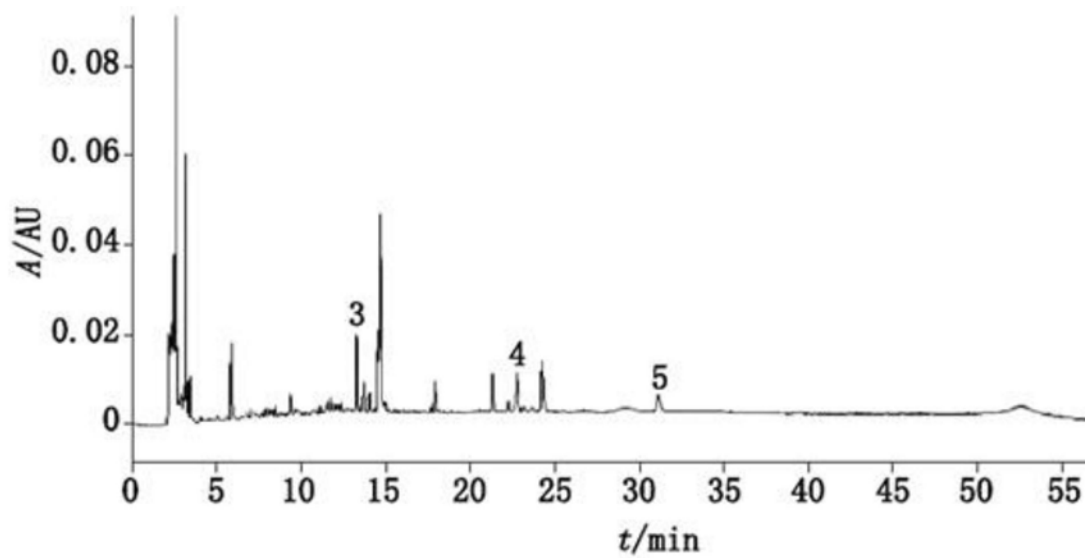


图9

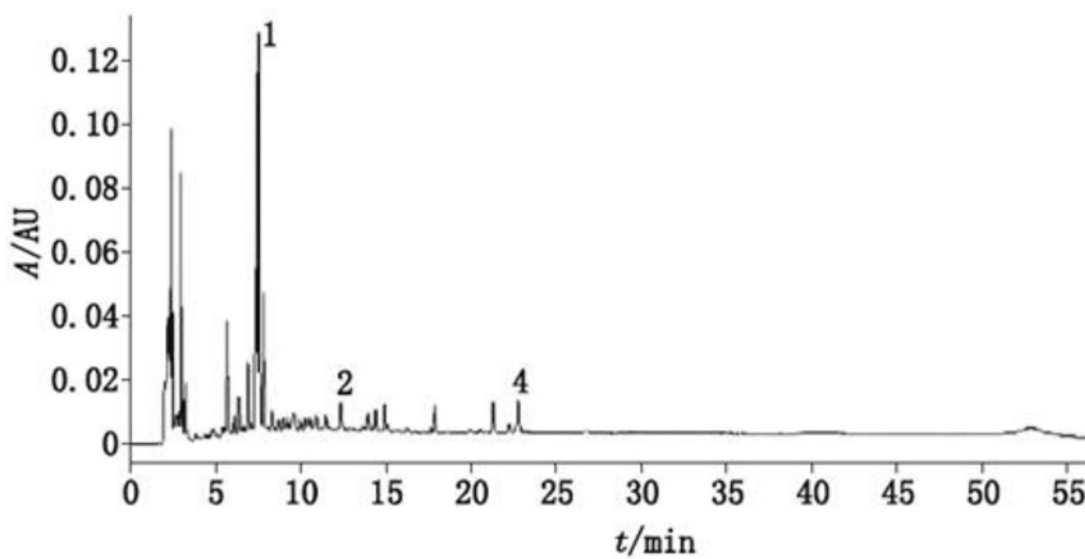


图10

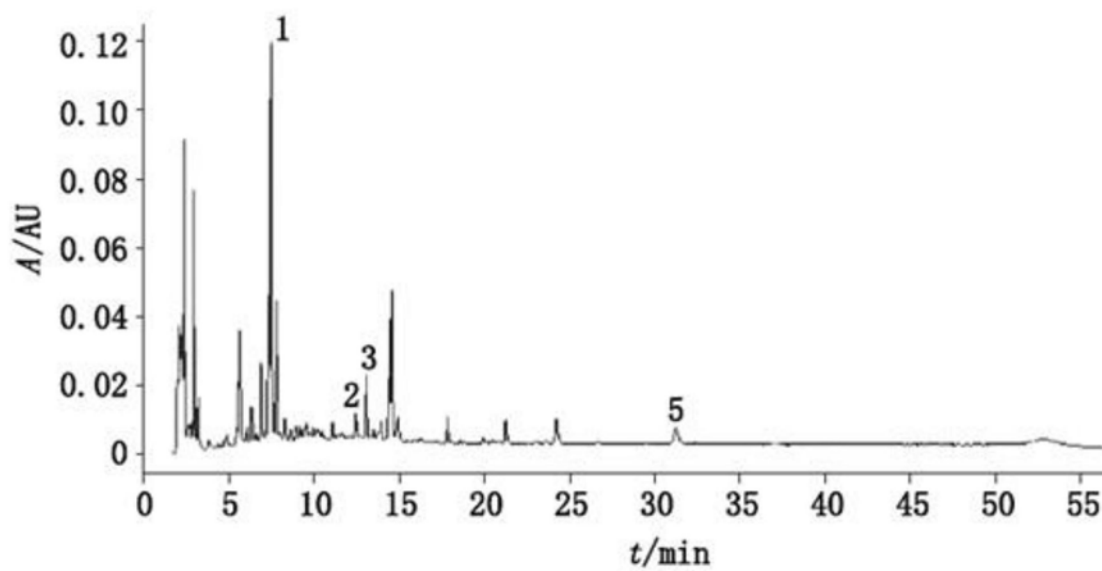


图11

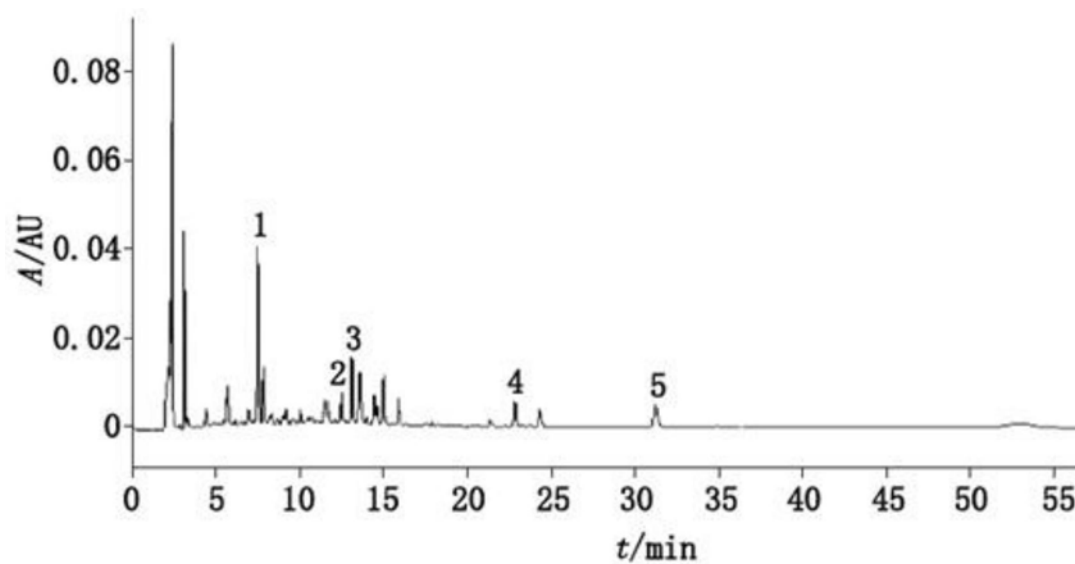


图12