

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2003年12月24日(24.12.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/105829 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 31/352, 35/78, A61P 19/10

(21) 国际申请号: PCT/CN03/00466

(22) 国际申请日: 2003年6月16日(16.06.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02112108.7 2002年6月18日(18.06.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海医药工业研究院(SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) [CN/CN]; 中国上海市北京西路1320号, Shanghai 200040 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 刘全海(LIU, Quan hai) [CN/CN]; 王明民(WANG, Ming min) [CN/CN]; 罗思齐(LUO, Si qi) [CN/CN]; 戴敬芝(DAI, Jing zhi) [CN/CN]; 蒋毅(JIANG, Yi) [CN/CN]; 中国上海市北京西路1320号, Shanghai 200040 (CN)。

(74) 代理人: 上海新天专利代理有限公司(SHANGHAI XIN TIAN PATENT AGENT CO., LTD.); 中国上海市复兴中路526号503室, Shanghai 200020 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

• 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A FORMULATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE FOR PREVENTING AND TREATING OSTEOPOROSIS

(54) 发明名称: 一种用于抗骨质疏松的中药制剂

(57) Abstract: The present invention belongs to the art of pharmaceutical formulation of traditional Chinese medicine. In particular, the present invention relates to a formulation consisted of effective ingredients extracted from Epimedium and pharmaceutical vehicles. Animal experiments confirmed that the present formulation can prevent and treat osteoporosis, increase the density of femur and contents of calcium and phosphorus in bone, and improve the index of femur. The present invention also provides the process for preparing the present formulation.

(57) 摘要

本发明属中药制剂技术领域, 具体涉及一种用于抗骨质疏松的中药的有效组分及其制剂, 本发明的中药制剂是由中药淫羊藿提取的有效成份与药用辅料组成的, 本发明的制剂经实验动物证实对骨质疏松症有预防及治疗作用, 能提高股骨骨密度及骨钙、骨磷的含量, 改善股骨指数。本发明提供了制备方法。

一种用于抗骨质疏松的中药制剂

技术领域

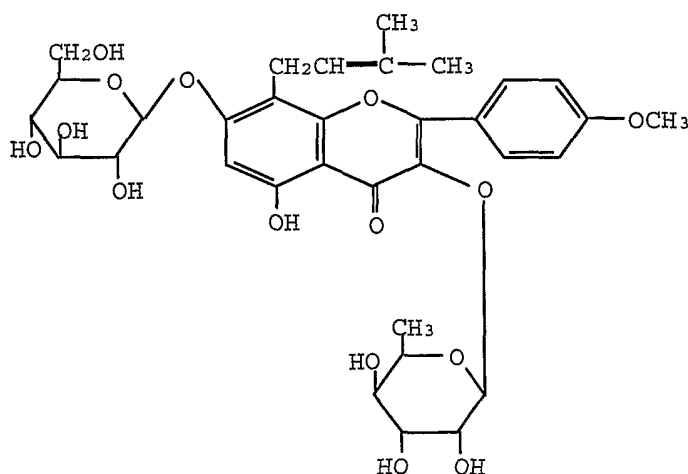
本发明属中药制剂技术领域。具体涉及一种用于抗骨质疏松的中药的有效组分及其制剂。

背景技术

淫羊藿总黄酮粉是从中药淫羊藿中提取德有效部位。中药淫羊藿有以下几个品种：小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum*(Sieb. et Zucc)Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim.、巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying、或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai。中药淫羊藿的药用部位为干燥地上部分，并除去粗梗及杂质。

朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)，又名东北淫羊藿(《全国中草药汇编》)。其药用部位化学成分以黄酮居多，已有的化学成分研究表明：它含有淫羊藿苷及淫羊藿苷 A，淫羊藿定 A、B、C，淫羊藿定 A、B1、槲皮素、脱水淫羊藿素-3-鼠李糖苷，朝鲜淫羊藿苷(epimedokoreanoside)I、II。

淫羊藿苷，为黄酮甙类成分，分子中 C3、C7 位上的羟基与糖结合形成甙，其化学结构如下：



从以上结构可知淫羊藿苷应具有黄酮类化合物特征的紫外吸收，紫外扫描证实淫羊藿苷在 270nm 左右具有较强的吸收，故以高效液相进行含量测定时，选择 270nm 为测定波长。

目前未见用中药淫羊藿制备的抗骨质疏松药剂。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是研制一种用于抗骨质疏松的中药制剂。

本发明提供了一种含中药淫羊藿的用于抗骨质疏松的中药制剂仙灵骨康片，该制剂是由淫羊藿提取的有效成份与药用辅料组成的。

(一) 本发明的用于抗骨质疏松的中药制剂药效学研究如下：

中药淫羊藿提取的有效组分(下文简称为 9412)的药效学研究：

1. 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症的影响—预防作用

实验目的：观察 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用。

1.1. 材料

1.1.1. 供试品

名称：9412

提供单位：上海医药工业研究院

批号：20001017

剂型：浸膏

用量：1ml/100g 大鼠

给药途径：po

剂量：4、12、36mg/kg，po×28

1.1.2. 阳性对照药

羟乙基膦酸钠：

上海医药工业研究院化学事业部提供，批号 991010，口服 50mg/kg，po×28。

1.1.3. 其它

维甲酸：

上海第六制药厂生产，黄色结晶粉末，口服，作为造成大鼠骨质疏松症模型用，口服剂量 1ml/100g 大鼠，用 0.5%CMC 配成混悬液，70mg/kg 剂量，po×14。

骨密度测定仪：

DPX-L 型双能 X 线骨密度仪，美国 LunAR 公司生产，上海中医药大学附属曙光医院提供。

试剂盒：钙试剂盒，卫生部上海生物制品研究所。

磷试剂盒，上海捷门生物技术公司。

马福炉：上海浦东跃欣科学仪器厂。

722S 分光光度计：上海科学精密仪器有限公司。

1.2. 动物：

来源、种属、品系、合格证：

大鼠，SD 系，中科院上海实验动物中心提供。

合格证：中科动管会第 005 号。

体重：110~130g

性别：雌雄均有

每组动物数：10 只

实验室温度：24~26℃，相对湿度：60~70%。

1.3. 试验方法：

1.3.1. 建立维甲酸诱导大鼠骨质疏松症模型

大鼠随机分为 6 组，正常对照组、模型对照组、9412 低、中、高剂量组、阳性对照组，除正常对照组外，各组大鼠均口服维甲酸 70mg/kg，服用量 1ml/100g 大鼠，每天 1 次，连续 14 天，同时每天各组大鼠依次口服以下样品，正常对照组、维甲酸模型组为相应溶剂 10ml/kg、9412 低剂量组 4mg/kg、中剂量组 12mg/kg、高剂量组 36mg/kg、阳性药羟乙基膦酸钠 50mg/kg，服用量均为 1ml/100g 大鼠，每天 1 次，连续 28 天，其间每周称体重 1 次，以体重调整给药用量。

1.3.2. 观察指标

给药结束，断头处死动物，取血分离血清，按试剂盒方法测 S-Ca、S-P 含量，取大鼠双侧股骨，剥净肉及其它组织，其中一侧股骨在双能 X 线骨密度仪上作大鼠股骨扫描，测出骨密度 (g/cm^2)，称骨重 (W)，测骨长 (L)，骨直径 (D)，计算骨表观线密度 (W/L)、表观面密度 (W/L·D)，然后 110℃ 烘干一小时，再置于马福炉内 200、400、600、800℃ 各灰化 2 小时，灰化结束冷却后，称灰重 (Wash·g)，用 6NHCl 提取后测骨灰 Ca、骨灰 P 含量，以 100g 骨灰含 Ca 或 P 的克数表示。

另一侧股骨头用 3% HNO_3 脱钙后作石蜡切片，HE 染色，显微镜下测骨小梁宽度。

以上结果均以给药组与模型组比较，模型组与正常对照组比较。

1.4. 结果：

1.4.1. 体重：

实验当天及第 1 周内各组动物体重无明显差异 ($P>0.05$)，给药后 2、4 周维甲酸模型组体重比正常对照组体重减轻 ($P<0.01$ 、 $P<0.05$)，但用药后各组动物体重均明显增加，其中低剂量组 (4mg/kg) 有体重增加但无统计意义，而 9412 中、高剂量组 (12mg/kg、36mg/kg) 及羟乙基膦酸钠组大鼠第 2、4 周的体重均比模型组增加 ($P<0.05$)，各剂量组相互比较无明显差异。

表 1 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用的体重变化

$\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	时 间			
			0	1	2	4
正常对照组	相应溶剂	8	117.5±10.3	131.2±8.6	166.7±20.4	220.7±17.7
模型对照组	70mg/kg 相应溶剂	10	117.2±4.4	125.5±5.7	133.8±14.5 ^{△△}	178.7±19.5 [△]
9412	4	10	119.8±6.4	129.8±6.6	139.4±7.2	200.4±32.7
	12	10	118.6±3.6	128.1±4.0	155.5±6.2*	216.0±24.0*
	36	11	121.5±5.1	131.4±5.2	153.2±16.1*	216.1±19.5*
羟乙基 膦酸钠	50	11	118.2±7.6	127.5±8.6	146.7±13.7*	210.0±11.6*

[△] P<0.05, ^{△△} P<0.01 与正常对照组比较

* P<0.05, **P<0.01 与模型对照组比较

1.4.2. 大鼠股骨骨密度及 SCa、SP 的变化

表 2 结果显示模型组大鼠股骨骨密度比正常对照组低 (P<0.01), 血清 Ca 含量也较模型组低 (P<0.05), 血清磷含量变化不大, 但用药组大鼠股骨密度都比模型组增加 (P<0.05、P<0.01), 血清钙及磷的含量均较模型组升高, 但 9412 中、高剂量组无明显差异。阳性药羟乙基膦酸钠的大鼠股骨骨密度及血清钙血清磷含量也比模型组有明显的差异 (P<0.05、P<0.01)。

表 2 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用时的股骨骨密度、

SCa、Sp 的变化

$\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨密度 g/cm ²	SCa mmol/L	Spi mmol/L
正常对照组	相应溶剂	8	0.219±0.006	2.09±0.15	2.48±0.22
模型对照组	相应溶剂	10	0.194±0.013 ^{△△}	1.78±0.11 [△]	2.42±0.15
9412	4	10	0.213±0.011*	1.90±0.07*	2.40±0.13
	12	10	0.217±0.009**	2.01±0.10**	2.65±0.21*
	36	10	0.217±0.015*	2.01±0.14**	2.61±0.18*
羟乙基膦酸钠	50	11	0.213±0.012*	2.00±0.06**	3.91±0.43**

[△] P<0.05, ^{△△} P<0.01 与正常对照组比较

* P<0.05, **P<0.01 与模型对照组比较

1.4.3. 9412 对维甲酸诱导大鼠骨质疏松症预防作用骨指数的影响

与对照组比较, 模型组的 W、L、d、W/L、W/Ld 均明显下降, 相对于模型组 9412 中、高剂量组及羟乙基膦酸钠组的 W、W/Ld 均明显提高。

表 3. 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用骨指数的影响

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨重 W (g)	股骨长度 L (cm)	股骨直径 d (cm)	$\bar{x} \pm SD$	
						股骨表面密度 W/L (g/cm)	股骨表面密度 W/L.d (g/cm ²)
正常对照组	相应溶剂	8	0.431±0.04	3.225±0.193	0.338±0.023	0.129±0.006	0.381±0.018
9412	相应溶剂	10	0.302±0.016 ^{△△}	2.716±0.134 ^{△△}	0.318±0.03	0.111±0.007 ^{△△}	0.349±0.024 [△]
	4	10	0.338±0.035*	3.056±0.068	0.308±0.019	0.111±0.011	0.359±0.043
	12	10	0.359±0.03*	3.107±0.093	0.311±0.016	0.115±0.007	0.380±0.026*
	36	10	0.370±0.047**	3.092±0.121	0.306±0.009	0.119±0.011	0.384±0.017*
羟乙基膦酸钠	50	11	0.367±0.05**	3.090±0.18	0.295±0.017	0.118±0.011	0.400±0.032**

[△]P<0.05, ^{△△}P<0.01 与正常对照组比较

*P<0.05, **P<0.01 与模型对照组比较

1.4.4. 对股骨灰分、骨 Ca 及骨 P 的影响

与对照组比较, 模型组的骨灰重及灰分中骨 Ca 及骨 P 含量均降低, 但用药后 9412 中、高剂量组及羟乙基膦酸钠组骨灰重、骨 Ca、骨 P 含量均相对增加。

表 4 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用时的股骨灰分、骨 Ca 及骨 Pi 含量的影响 $\bar{x} \pm SD$

组别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨灰重 Wash (g)	股骨骨灰 Ca Ca g/100g 骨灰	股骨骨灰 P Pi g/100g 骨灰
正常对照组	相应溶剂	8	0.253±0.01	32.62±0.80	18.84±0.43
模型对照组	相应溶剂	10	0.228±0.01 ^{△△}	30.43±0.24 ^{△△}	17.42±0.17 ^{△△}
9412	4	10	0.236±0.006	30.92±0.24**	17.77±0.24*
	12	10	0.239±0.007*	31.08±0.24**	17.94±0.29**
	36	10	0.239±0.005*	31.46±0.24**	17.98±0.29**
羟乙基膦酸钠	50	11	0.251±0.005**	30.81±0.18**	18.01±0.19

[△]P<0.05, ^{△△}P<0.01 与正常对照组比较

*P<0.05, **P<0.01 与模型对照组比较

2. 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症的影响—治疗作用

实验目的: 观察 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症的治疗作用。

2.1. 材料

2.1.1. 供试品:

名称: 9412

提供单位: 上海医药工业研究院

批号: 20001017

剂型: 浸膏

用量: 1ml/100g 大鼠

给药途径: po

剂量: 4、12、36mg/kg, po×14

2.1.2. 阳性对照药:

羟乙基膦酸钠: 上海医药工业研究院化学事业部提供, 批号 991010, 口服 50mg/kg, po×14。

2.1.3 其它:

维甲酸: 上海第六制药厂生产, 黄色结晶粉末, 口服, 作为造成大鼠骨质疏松症模型用, 服用量 1ml/100g 大鼠, 用 0.5%CMC 配成混悬液, 70mg/kg 剂量, po×14。

骨密度测定仪: DPX-L 型双能 X 线骨密度仪, 美国 LunAR 公司生产, 上海中医药大学附属曙光医院提供。

试剂盒: 钙试剂盒, 卫生部上海生物制品研究所。

磷试剂盒, 上海捷门生物技术公司。

马福炉：上海浦东跃欣科学仪器厂。

722S 分光光度计：上海科学精密仪器有限公司。

2.2. 动物：

来源、种属、品系、合格证：

大鼠，SD 系，中科院上海实验动物中心提供。

合格证：中科动管会第 005 号。

体重：110~130g

性别：雌雄均有

每组动物数：10 只

实验室温度：24~26℃，相对湿度：60~70%。

2.3. 试验方法：

2.3.1. 建立维甲酸诱导大鼠骨质疏松症模型

大鼠随机分为 6 组，正常对照组、模型对照组、9412 低、中、高剂量组、阳性药对照组，除正常对照组外，各组大鼠均口服维甲酸 70mg/kg，服用量 1ml/100g 大鼠，每天 1 次，连续 14 天，结束后各用药组按各剂量组给药口服每天 1 次，连续 28 天，正常对照组及模型组给予相应溶剂，服用量均为 1ml/100g 体重，其间根据体重调整给药量。

2.3.2. 观察指标：

给药结束，断头处死动物，取血分离血清，按试剂盒方法测 S-Ca、S-P 含量，取大鼠双侧股骨，剥净肉及其它组织，其中一侧股骨在双能 X 线骨密度仪上作大鼠股骨扫描，测出骨密度 (g/cm^2)，称股骨重 (W)，测骨长 (L)，骨直径 (D)，计算骨表观线密度 (W/L)、表观面密度 ($W/L \cdot d$)，然后 110℃ 烘干一小时，再置于马福炉内 200、400、600、800℃ 各灰化 2 小时，灰化结束冷却后，称灰重 (Wash..g)，用 6N HCl 提取后测骨灰 Ca、骨灰 P 含量，以 100g 骨灰含 Ca 或 P 的克数表示。

另一侧股骨头用 3% HNO_3 脱钙后作石蜡切片，HE 染色，显微镜下测骨小梁宽度。

以上结果均以给药组与模型组比较，模型组与正常对照组比较。

2.4. 结果：

2.4.1. 体重：

表 5 显示给予维甲酸后，各组动物体重比正常对照组体重均明显下降，但给 9412 后，给药组体重开始恢复，维甲酸模型组也开始恢复。

2.4.2. 大鼠股骨骨密度及 S-Ca、SP 的变化

表 5 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症治疗作用的体重变化

 $\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	时 间 周 (g)				
			0	1	2	3	6
正常对照组	相应溶剂	8	117.9±9.3	136.2±9.4	155.4±7.8	165.0±17.7	256.2±11.9
模型对照组	70mg/kg 相应溶剂	10	117.2±4.2	126.7±5.7	138.2±4.2	149.9±6.8	202.1±5.9
9412	4	10	117.3±7.4	129.8±7.9	137.9±9.9	155.9±9.9	214.9±10.7
	12	10	118.5±3.6	128.9±4.4	139.4±3.2	167.3±3.9	247.4±11.7
	36	11	118.0±4.6	131.6±6.2	143.3±7.1	167.4±4.6	250.81±7.2
羟乙基膦酸钠	50	11	116.6±6.6	125.4±5.7	140.9±8.2	163.6±8.3	246.5±9.4

表 6 结果显示模型组大鼠股骨骨密度比正常对照组低 ($P<0.01$), SCa 含量也较模型组 ($P<0.01$), 而 SP 无明显变化, 用药后 9412 各剂量组的大鼠股骨密度与模型组比较, 有明显的提高股骨密度及 SCa 的作用, 以 9412 12mg/kg 组作用最明显, 羟乙基膦酸钠也有提高大鼠股骨密度及 SCa 的作用, 但各组的 SP 含量模型组、用药组均与正常对照组无明显差异。

表 6 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症治疗作用时股骨骨密度及 SCa、SP 的变化

 $\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨密度 g/cm^2	SCa mmol/L	Spi mmol/L
正常对照组	相应溶剂	8	0.236±0.01	2.47±0.14	2.05±0.14
模型对照组	相应溶剂	14	0.215±0.005 ^{△△}	2.14±0.09 ^{△△}	2.04±0.08
9412	4	16	0.225±0.009*	2.22±0.14	2.01±0.18
	12	16	0.228±0.007**	2.33±0.24*	2.05±0.21
	36	15	0.225±0.011*	2.33±0.12**	2.19±0.20
羟乙基膦酸钠	50	15	0.233±0.008**	2.33±0.11**	2.13±0.20

^{△△} $P<0.01$ 与正常对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与模型对照组比较

2.4.3. 9412 对维甲酸诱导大鼠骨质疏松症治疗作用骨指数的影响

与对照组比较, 模型组的骨质疏松症的 W、L、d、W/L、W/Ld 均有明显下降, 相对于模型组 9412 的高剂量组及羟乙基膦酸钠组 W/Ld 明显提高 ($P<0.01$)。

表 7. 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症治疗作用骨指数的影响

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨重 W (g)	股骨长度 L (cm)	股骨直径 d (cm)	$\bar{x} \pm SD$	
						股骨表面密度 W/L (g/cm)	股骨表面密度 W/L.d (g/cm ²)
正常对照组	相应溶剂	9	0.445±0.055	3.359±0.22	0.364±0.05	0.131±0.008	0.378±0.018
9412	相应溶剂	10	0.392±0.028 ^{△△}	3.280±0.12	0.353±0.022	0.119±0.006 ^{△△}	0.337±0.006
	4	10	0.415±0.03	3.213±0.11	0.366±0.019	0.129±0.015	0.351±0.015
	12	10	0.424±0.036	3.193±0.11	0.347±0.022	0.131±0.007	0.377±0.01**
	36	10	0.414±0.022	3.136±0.085	0.348±0.014	0.131±0.011	0.378±0.003**
羟乙基磷酸钠	50	11	0.422±0.034	3.110±0.10	0.356±0.025	0.135±0.007	0.378±0.015**

^{△△} P<0.01 与正常对照组比较

** P<0.01 与模型对照组比较

2.4.4. 对股骨灰分、骨 Ca 及骨 P 的影响

与对照组相比, 模型组的骨灰重及灰分中骨 Ca、骨 P 含量均降低, 但用药后 9412 中、高剂量组及羟乙基膦酸钠组骨灰重、骨 Ca、骨 P 含量均相对增加。

表 8 9412 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用时的股骨灰分、骨 Ca 及骨 Pi 含量的影响 $\bar{x} \pm SD$

组别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨灰重 Wash (g)	股骨骨灰 Ca Ca g/100g 骨灰	股骨骨灰 P Pi g/100g 骨灰
正常对照组	相应溶剂	8	0.261±0.006	32.79±0.42	18.99±0.22
模型对照组	相应溶剂	10	0.218±0.006	30.54±0.24 ^{△△}	17.29±0.23 ^{△△}
9412	4	10	0.232±0.003	30.88±0.33	17.43±0.21
	12	10	0.239±0.003**	30.98±0.19*	17.79±0.14**
	36	10	0.240±0.003**	30.94±0.40	17.77±0.10**
羟乙基膦酸钠	50	10	0.243±0.004**	31.45±0.38**	17.98±0.17**

^{△△} P<0.01 与正常对照组比较

* P<0.05, ** P<0.01 与模型对照组比较

3. 9412 对去势大鼠抗骨质疏松症的治疗作用

实验目的: 观察 9412 对去势大鼠骨质疏松症的疗效。

3.1. 材料

3.1.1. 供试品:

名称: 9412

提供单位: 上海医药工业研究院

批号: 20001017

剂型: 浸膏

用量: 1ml/100g 大鼠

给药途径: po

剂量: 4、12、36mg/kg, po×90

3.1.2. 阳性对照药:

羟乙基膦酸钠:

上海医药工业研究院化学事业部提供, 批号 991010, 口服 50mg/kg, po×90。

3.1.3. 其它:

骨密度测定仪:

DPX-L 型双能 X 线骨密度仪, 美国 LunAR 公司生产, 上海中医药大学附属曙光医院提供。

试剂盒: 钙试剂盒, 卫生部上海生物制品研究所。

磷试剂盒, 上海捷门生物技术公司。

马福炉: 上海浦东跃欣科学仪器厂。

722S 分光光度计：上海科学精密仪器有限公司。

3.2. 动物：

来源、种属、品系、合格证：

大鼠，SD 系，中科院上海实验动物中心提供。

合格证：中科动管会第 005 号。

体重：雌性 110~130g，雄性 130~150g

每组动物数：10 只

实验室温度：24~26℃，相对湿度：60~70%。

3.3. 试验方法：

3.3.1. 建立去势大鼠骨质疏松症模型

雌雄大鼠以 3%戊巴比妥钠麻醉，常规消毒，在无菌条件下摘除双侧睾丸或卵巢，随即缝合切口，假手术组仅作腹部手术消毒切开后缝合（不切除睾丸及卵巢），将大鼠随机分组，每组 10~12 只，手术一周后分组，按各用药组给药，每日 1 次，连续 90 天，模型组给予相应溶剂，服用量均为 1ml/100g 体重，其间根据体重调整给药量。

3.3.2. 观察指标：

给药结束，断头处死动物，取血分离血清，按试剂盒方法测 S-Ca、S-P 含量，取大鼠双侧股骨，剥净肉及其它组织，其中一侧股骨在双能 X 线骨密度仪上作股骨扫描，测出骨密度 (g/cm^2)，称股骨重 (W)，测骨长 (L)，骨直径 (d)，计算骨表观线密度 (W/L)、表观面密度 ($W/L \cdot d$)，然后 110℃烘干一小时，再置于马福炉内 200、400、600、800℃各灰化 2 小时，灰化结束冷却称灰重 (Wash)，用 6N HNO_3 提取后，测骨灰 Ca、骨灰 P 含量，以 100g 骨灰含 Ca^{2+} 或 Pi 的克数表示。

另一侧股骨头用 3% HNO_3 脱钙后作石蜡切片，HE 染色，显微镜下测骨小梁宽度。

以上结果均以给药组与模型组比较，模型组与正常对照组比较。

3.4. 结果：

3.4.1. 体重：

各组动物之间无明显差异。

表 9 9412 对去势大鼠体重变化 (天)

组 别	δ				σ				$\bar{x} \pm SD$ (g)	
	0	30	60	90	0	30	60	90		
正常对照组	163.1±9.9	286.6±8.1	350.0±20.6	382.3±28.8	169.1±4.2	265.0±22.2	304.5±14.6	315.8±7.2		
模型对照组	161.0±8.7	292.6±13.8	355.3±17.2	351.7±22.5	167.1±10.1	262.0±22.0	306.5±33.8	304.4±24.6		
9412	4	164.0±9.2	292.3±15.6	323.7±31.1	168.2±8.6	248.3±27.5	273.8±34.3	302.4±21.2		
	12	165.4±6.4	301.2±15.7	314.2±29.8	169.3±6.3	264.5±19.3	274.7±33.4	304.9±41.2		
	36	162.7±6.1	289.2±18.9	319.4±28.5	170.2±5.7	269.3±16.3	281.0±21.5	294.0±34.5		
羟乙基磷酸钠	161.2±11.9	294.1±18.7	323.6±23.4	318.6±23.4	167.8±6.2	249.6±28.7	268.6±30.9	282.3±37.5		

3.4.2. 大鼠股骨骨密度及 SCa、SP 的变化

表 9 结果显示模型组大鼠股骨骨密度比正常对照组低($P<0.01$), 9412 中、高剂量组及羟乙基膦酸钠都比模型组有显著的升高 ($P<0.05$), 模型组的血清 Ca、血清 P 均比正常对照组低, 用药后血清 Ca 比模型组提高, 但无统计意义, 血清 P 变化不大, 羟乙基膦酸钠血清 Ca 比模型组升高 ($P<0.05$), 血清 Pi 变化不大。

表 10 9412 对去势大鼠股骨骨密度、骨小梁的影响

$\bar{x} \pm SD$				
组别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨密度 g/cm ²	骨小梁宽度 (μ)
对照组	相应溶剂	8	0.251 $\pm$ 0.011	109.5 $\pm$ 7.9
模型对照组	相应溶剂	10	0.230 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta$	80.1 $\pm$ 6.5 $\Delta\Delta$
9412	4	11	0.236 $\pm$ 0.007	84.0 $\pm$ 6.6
	12	10	0.241 $\pm$ 0.008*	91.6 $\pm$ 5.9**
	36	12	0.237 $\pm$ 0.004*	91.8 $\pm$ 4.5*
羟乙基膦酸钠	50	10	0.242 $\pm$ 0.012*	93.2 $\pm$ 6.3**

$\Delta\Delta P<0.01$ 与正常对照组比较

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与模型对照组比较

3.4.3. 9412 对去势大鼠骨指数的影响

与对照组比较, 模型组的 W、L、d、W/L、W/Ld 均有明显的下降, 相对于模型组 9412 的各组剂量均能增加大鼠股骨重量($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 以中剂量组最明显, 中剂量组及羟乙基膦酸钠组 W/L、W/Ld 均比模型组有明显差异。

表 11. 9412 对去势大鼠血清钙、血清磷的变化

$\bar{x} \pm SD$				
组别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	SCa mmol/L	Sp mmol/L
对照组	相应溶剂	8	2.39 $\pm$ 0.09	2.05 $\pm$ 0.14
模型对照组	相应溶剂	10	2.03 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	1.64 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$
9412	4	11	2.09 $\pm$ 0.14	1.74 $\pm$ 0.008
	12	10	2.14 $\pm$ 0.19	1.89 $\pm$ 0.26
	36	12	2.16 $\pm$ 0.14	1.84 $\pm$ 0.26
羟乙基膦酸钠	50	10	2.20 $\pm$ 0.09*	1.86 $\pm$ 0.17

$\Delta\Delta P<0.01$ 与正常对照组比较

表 12. 9412 对去势大鼠骨指数的影响

$\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨重 W (g)	股骨长度 L (cm)	股骨直径 d (cm)	股骨表面密度 W/L (g/cm)	股骨表面密度 W/L.d (g/cm ²)
正常对照组	相应溶剂	8	0.8931±0.08	3.551±0.21	0.396±0.04	0.252±0.02	0.608±0.03
模型对照组	相应溶剂	10	0.8057±0.06 ^{△△}	3.663±0.11	0.418±0.02	0.219±0.01 ^{△△}	0.552±0.03 ^{△△}
9412	4	10	0.8364±0.06	3.702±0.08	0.405±0.01	0.225±0.01	0.558±0.04
	12	10	0.9118±0.06*	3.684±0.13	0.437±0.04	0.247±0.01*	0.569±0.04*
	36	10	0.8717±0.07**	3.735±0.11	0.424±0.02	0.233±0.01	0.550±0.01
羟基磷酸钠	50	11	0.8609±0.08**	3.613±0.01	0.420±0.03	0.237±0.02*	0.567±0.03*

^{△△}P<0.01 与正常对照组比较

*P<0.05, ** P<0.01 与模型对照组比较

3.4.4. 对股骨骨灰分、骨 Ca 及骨 P 的影响

与对照组相比, 模型组的骨灰重及骨灰分中 Ca、骨 Pi 含量均降低, 但用药后, 股骨骨灰重、骨 Ca、P 含量比模型组有不同程度的提高 ($P<0.05$)。

表 13 9412 对去势大鼠股骨骨灰、骨矿 Ca、P 含量的影响

 $\bar{x} \pm SD$

组 别	剂量 mg/kg	动物数 (只)	股骨骨灰重 Wash (g)	股骨骨灰 Ca Ca g/100g 骨灰	股骨骨灰 Pi Pi g/100g 骨灰
正常对照组	相应溶剂	8	0.373±0.04	35.91±3.0	19.85±1.7
模型对照组	相应溶剂	10	0.360±0.02	32.97±1.1 [△]	18.39±1.0
9412	4	10	0.360±0.04	34.34±2.6	19.42±1.5
	12	10	0.356±0.03	35.36±2.6*	20.37±1.5**
	36	10	0.361±0.02	34.97±2.1*	19.23±1.0
羟乙基膦酸钠	50	10	0.363±0.03	35.58±2.4*	19.48±1.4

[△] $P<0.05$ 与正常对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与模型对照组比较

4. 9412 对大鼠成骨细胞原代培养的影响

实验目的: 观察 9412 对大鼠成骨细胞原代细胞生长的影响。

4.1. 材料:

4.1.1. 供试品:

名称: 9412

提供单位: 上海医药工业研究院

批号: 20001017

剂型: 浸膏, 试验对以 PBS 溶解后无菌过滤

4.1.2. 其它试剂:

培养基: DMEM, Difco 产品

小牛血清: 杭州四季青生物工程材料有限公司

胶原酶: 上海医药工业研究院生物化学事业部

胰酶: Difco 产品

培养基: DMEM+10%小牛血清

消化液: PBS+EDTA (4mM) +0.1%胶原酶+0.05%胰酶组成

³H-TdR: 上海原子核研究所 1mCi/ml

PBS: PH 7.2, 0.5M

4.2. 动物:

来源、种属、品系、合格证:

大鼠, SD 系 (新生 24 小时大鼠) 中科院上海实验动物中心提供

合格证: 中科动管会第 005 号

4.3. 方法:

无菌条件下取出生 24 小时内的 SD 新生鼠 10 只的颅骨，去除骨膜及周围软组织，用剪刀剪成小块，用消化液 37℃ 消化 20 分钟，消化过程中不断振摇，消化结束离心，倾去上清液，收集消化后的残余组织及细胞放于细胞培养瓶中，加 DMEM（含 10% 小牛血清）37℃，5%CO₂ 中培养 10 天后，弃去上清液，贴壁细胞以胰酶消化成单个细胞，离心，收集，计数并调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml，在 96 孔细胞培养板上，每孔加入 100μl 细胞，不同稀释浓度的 9412 待试样品 100μl（样品浓度为 1、0.1、0.01、0.001μg/ml），对照管以培养基代替，复设三复管，培养 48 小时后加入 0.5μci/孔 ³H-TdR 继续培养 8 小时，再用 0.5% 胰酶消化后用多头细胞仪收集细胞，液闪仪上测定 CPM 值，结果以样品与空白对照管比较。

4.4. 结果：

结果见表，1μg/ml 浓度的样品组对新生鼠颅骨细胞的掺入率较对照组低，其余各组均有不同程度的促进成骨细胞的生长，其中以 0.01μg/ml 9412 样品掺入数最高。

表 14 9412 对新生大鼠成骨细胞原代细胞生长的影响

组 成	药物浓度 μg/ml	CPM 值 $\bar{x} \pm SD$
9412	0.001	1179 ± 196
	0.01	2562 ± 234**
	0.1	1114 ± 62
	1	96.3 ± 3.3
对照组		1116 ± 249

** P < 0.01 与对照组比较

5. 结论：

9412 系中药淫羊藿中提取的活性组分，主要为黄酮，一系列试验表明具有 60% 黄酮含量的 9412 具有抗骨质疏松症的作用。

① 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用试验中，9412 不论低、中、高剂量组均能提高大鼠股骨骨密度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，增加股骨及骨灰重量，股骨骨灰钙及磷的含量。

② 对维甲酸致大鼠骨质疏松症治疗作用试验中，9412 低、中、高剂量组能提高大鼠股骨骨密度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，并以中剂量组较为明显 ($P < 0.01$)，中、高剂量组能增加股骨骨灰重及骨钙骨磷的含量，低剂量作用不明显。

③ 9412 对去势大鼠造成骨质疏松症后，有中、高剂量组能提高大鼠股骨骨密度 ($P < 0.05$)，低剂量组不明显。血清钙、磷含量影响，

但能不同程度的提高大鼠股骨重量及骨灰中钙、磷含量并以中剂量组较好。

④ 对去势大鼠能增加大鼠股骨头骨小梁的宽度和长度，也说明 9412 对去势大鼠的骨质疏松有一定的治疗作用。

⑤ 9412 对新生鼠成骨细胞有一定的促进生长的作用，以 0.01 μ g/ml 的促进作用最明显。

(二) 本发明的用于抗骨质疏松的中药制剂(仙灵骨康片)的急性毒性试验:

1. 试验目的:

观察 9412 对昆明种小鼠口服给药后, 动物产生的毒性反应。

2. 受试样品:

名称: 9412 浸膏

提供单位: 上海医药工业研究院

批号: 20001017

含量: 每 1g 浸膏相当于 g 生药

药液配制: 0.5%CMC+吐温 80 助溶配成混悬液

3. 动物来源、种属、品系、合格证:

小鼠, 昆明种, 上海医药工业研究院动物房供应。

合格证: 沪动合证字第 107 号。

体重: 20 $\pm$ 1g

性别: 雌雄各半

动物数: 每组 20 只, 雌雄各半

实验室温度: 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 相对湿度: 65 $\pm$ 10%。

饲以标准全价营养颗粒饲料, 自由摄食饮水。

4. 试验方法

剂量:

预试中 9412 20%溶液, 每鼠口服 0.5ml, 动物未见死亡, 现增加为一日二次口服给药。

药液浓度:

配成 20%浓度, 每 1ml 含 0.2g 浸膏, 每鼠口服 0.5ml/20g 体重, 一日二次。

给药途径: 口服

方法:

小鼠口服 20% 9412 混悬剂, 每鼠 0.5ml, 一日二次, 观察给药后即时反应, 记录二周内小鼠体重变化, 观察期结束处死动物, 肉眼观察动物的组织病理变化。

5. 结果

动物二周内体重变化见表。

动物给药后无任何不良症状，活动饮食如常。观察期结束，尸检动物，也未见有肉眼可见的病理组织异常。

6. 结论

小鼠口服 9412 最大耐受量为 10g/kg 以上。

表 15 小鼠口服 9412 最大耐受量试验的体重变化

$\bar{x} \pm SD$

样 品	性别	剂量 g/kg	动物数 (只)	体 重 变 化							(g)	
				0 天	2 天	4 天	7 天	9 天	11 天	14 天		
9412	♂	10	10	19.6±0.45	21.1±0.75	22.5±0.75	23.4±0.55	25.3±0.40	27.2±0.58	28.9±0.67		
	♀	10	10	18.5±0.33	20.1±0.65	21.7±0.65	22.8±0.69	25.0±0.64	26.5±0.61	27.3±0.85		
对照组	♂		10	19.3±0.63	20.7±1.22	21.7±1.91	22.7±2.40	25.2±2.60	26.8±2.70	28.4±2.80		
	♀		10	18.1±0.10	19.8±0.93	21.0±1.20	22.5±1.40	24.1±1.70	25.9±2.10	26.3±2.10		

(三) 仙灵骨康片对大鼠的长期毒性试验如下:

本实验采用 SD 大鼠, 每组 30 只, 雌雄各半, 分为 36、120、480mg/kg/d 三个给药组和对照组, 连续口服灌胃仙灵骨康片六个月, 停药观察期为 2 周。

SD 大鼠口服仙灵骨康片六个月长期毒性试验结果表明, 对一般症状, 如体重增长、摄食量与对照组相比无明显影响。其他如动物的活力、精神状态、粪便等未见与药物有关的明显毒性反应。

给药三个月时发现雄性大鼠三个剂量组的 WBC 与对照组相比稍低, 给药六个月时发现雄性大鼠高剂量组的 WBC 与 RBC 与对照组相比稍低, 雌性大鼠低、高剂量组的 RBC 与对照组相比稍低。停药二周时发现雄性大鼠中剂量组的 RBC 与对照组相比稍低。

给药三个月时发现雄性大鼠中剂量组的 BUN 较对照组高, 雌性大鼠低、中剂量组的 ALP 与对照组相比稍高。给药六个月时发现雌性大鼠中剂量组的 BUN 较对照组稍高。停药二周时发现雌性大鼠高剂量组的 BUN 较对照组高。以上这些指标的变化均在正常范围内。

病理组织学等检查均未见与给药有关的明显毒性反应, 部分指标的变化均在正常范围内。

SD 大鼠连续经口灌胃给予仙灵骨康片六个月, 其无毒性剂量为 480mg/kg/d (相当于药效剂量的 40 倍)。

(四) 仙灵骨康片对 Beagle 狗的长期毒性试验如下:

Beagle 狗仙灵骨康片九个月长期毒性试验结果表明, 对一般症状 (动物的活动、体重、精神状态、粪便等)、血液学、血清生化、尿常规、系统尸检、组织学检查及脏器系数等检查均未见与药物有关的明显毒性反应。

给药九个月后停药 2 周也未见与药物有关的明显毒性反应。

Beagle 狗连续口服仙灵骨康片 9 个月, 其无毒性剂量为 480mg/kg/d (相当于药效剂量的 40 倍)。

经上述研究结果如下:

1. 对维甲酸 70mg/kg.d, 连续 14 天造成大鼠骨质疏松症, 并同时三级给予淫羊藿总黄酮 4 mg/kg、12 mg/kg 和 36 mg/kg, 羧乙基磷酸钠 50 mg/kg 作阳性对照组, 并在维甲酸停药后再继续给药 14 天(共给药 28 天)。以动物体重、骨密度、骨重、骨长、骨直径, 计算骨表观线密度、表观面密度、骨灰重、骨钙、骨磷, 以及骨切片测骨小梁宽, 血清钙、磷的含量等指标作为判定的根据, 结果发现用药组各指标均有明显改善, 尤以中、高剂量组明显, 其疗效至少不低于 50 mg/kg 羧乙基磷酸钠组。

2. 对维甲酸所致大鼠骨质疏松症的影响——治疗作用的研究

维甲酸 70 mg/kg.d, 连续 14 天, 造成大鼠骨质疏松, 在停药后, 分三级给予淫羊藿总黄酮 4 mg/kg、12 mg/kg 和 36 mg/kg, 羧乙基磷酸钠 50 mg/kg 作阳性对照, 连续给药 28 天。

3. 对去势大鼠抗骨质疏松作用

大鼠去势术后一周给药, 分组情况同上, 连续给药 90 天, 测定指标同上。

结果显示, 中、高剂量组均有明显的抗骨质疏松症疗效。

一般药理研究:

一般药理研究表明 10、30、100 mg/kg, 口服对狗的血压、呼吸及心电图均未产生明显影响。50、150、500 mg/kg 口服对小鼠神经和行为未见明显变化。

急性毒性研究:

小鼠 $LD_{50} > 10g/kg$ 。

长期毒性研究:

大鼠长期毒性试验: 三个剂量组 36、120 和 480 mg/kg, 连续给药 6 个月, 停药二周, 结果未见明显毒性。

Beagle mg/kg 狗长期毒性试验: 三个剂量组 36、120 和 480 mg/kg, 连续给药 9 个月, 停药二周, 结果未见明显毒性。

故大鼠和狗的长期毒性试验表明 480 mg/kg 是其无毒性剂量。

本发明的另一目的是提供了上述用于抗骨质疏松的中药制剂(仙灵骨康片)的制备工艺。

该工艺包括下列步骤:

(1) 制备淫羊藿干浸膏

取淫羊藿药材, 以水煎煮提取二次, 每次用水量均为药材的 20 倍量, 第一次煎煮 2 小时, 第二次煎煮 1.5 小时, 过滤, 合并滤液并冷却至室温, 上大孔吸附树脂(每公斤药材用已处理好的水状态下的树脂 1 升), 上样结束后, 先以去离子水洗脱, 换以 15%乙醇洗脱, 再换以 30%乙醇洗脱, 而后以 40%乙醇洗脱, 最后以 50%乙醇进行洗脱, 此时起监测洗脱液的乙醇浓度, 当醇浓度达 45%时起, 开始收集洗脱液至结束, 将该部分洗脱液减压浓缩至干, 即得。

原料质量标准草案

处方: 淫羊藿

制法:

将淫羊藿叶子, 每次加 20 倍量水提取二次, 第一次煎煮 2 小时, 第二次煎煮 1.5 小时, 过滤, 合并滤液并冷却至室温, 上大孔吸附树脂, 以不同浓度的乙醇洗脱, 收集相应流份的洗脱液, 减压浓缩至干

得浸膏粉。

性状：本品为棕褐色粉末。

鉴别：取浸膏粉 0.01g，加甲醇至 10ml，超声提取 20 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 2ml 溶解，作为供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品，加甲醇溶解，配制成每 ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（中国药典 2000 版一部附录 VIB）试验，吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上，以醋酸乙酯-正丁醇-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外灯(254nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同的暗红色斑点；喷以三氯化铝试液后，再置紫外灯(365nm)下检视，显相同的橙红色荧光斑点。

检查：应符合质量标准的各项规定。

总黄酮含量测定：

照分光光度法（中国药典 2000 版一部附录 VA）测定。

对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量，以 60%甲醇制成每 1ml 含淫羊藿苷 10 μ g 的溶液，即得。

供试品溶液的制备：

精密称取浸膏粉约 16mg，置于 10ml 容量瓶中，加约 9ml 50%甲醇超声提取 20 分钟后，加 50%甲醇至刻度，摇匀，精密吸取 0.5ml，定容于 50ml 的容量瓶中，摇匀，即得。

测定法：

分别取对照品溶液和供试品溶液，以 50%甲醇为空白，在 270nm 波长处照分光光度法测定，即得。

本品以淫羊藿苷为对照品计算总黄酮的含量不得少于 60%。

淫羊藿苷含量测定：

照高效液相色谱法（中国药典 2000 版一部附录 VID）测定。

色谱条件：

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；流动相为乙腈：水(30: 70)；流速为 1.0ml/min；柱温为 30℃检测波长为 270nm。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 1500。

对照品溶液的制备：

精密称取淫羊藿苷对照品适量，以 50%甲醇制成每 1ml 含淫羊藿苷 0.1mg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备：

精密称取浸膏粉约 7.5mg，置于 50ml 容量瓶中，加约 45ml 50%甲醇超声提取 20 分钟后，加 50%甲醇至刻度，摇匀，用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过，取续滤液，即得。

测定法：

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

本品以淫羊藿苷为对照品计算淫羊藿苷的含量不得少于 20%。

功能与主治: 补肾阳强筋骨用于抗骨质疏松。

贮藏: 密闭, 置阴凉干燥处保存。

(2) 制备制剂

处方:

制剂处方:

浸膏粉	100g
淀粉	40g
乳糖	30g
微晶纤维素	30g
7%淀粉浆	适量
硬脂酸镁	1%
薄膜包衣处方	
胃溶型薄膜包衣预混剂	12g
50%乙醇	适量

以上剂量按工艺制成 1000 片。

制备方法:

按处方比例称取浸膏粉、淀粉、乳糖、微晶纤维素, 分别过 80 目筛, 混匀, 再过 40 目筛三次。将上述混合粉用 7%淀粉浆制软材, 过 24 目筛粒, 50℃干燥 2 小时。干燥颗粒过 30 目筛整粒, 加入处方量硬脂酸镁, 混匀, 压片, 包衣, 晾片, 即得。

本品系由淫羊藿提取物制成的片剂。

性状: 本品包衣片为棕红色片剂, 素片为棕褐色片剂。

鉴别:

取本品 5 片, 研细, 称取 0.02g, 加甲醇至 10ml, 超声提取 20 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2ml 溶解, 作为供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品, 加甲醇溶解, 配制成每 ml 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 版一部附录 VIB)试验, 吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以醋酸乙酯-正丁醇-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的暗红色斑点; 喷以三氯化铝试液后, 再置紫外灯(365nm)下检视, 显相同的橙红色荧光斑点。

检查:

应符合中国药典 2000 版一部片剂（附录 I D）项下的各项规定。

总黄酮含量测定：

照分光光度法（中国药典 2000 版一部附录 VA）测定。

对照品溶液的制备：见原料。

供试品溶液的制备：

取本品 10 片，研细混匀后，精密称取样品约 32mg，置于 10ml 容量瓶中，加约 9ml 50% 甲醇超声提取 20 分钟后，加 50% 甲醇至刻度，摇匀，精密吸取 0.5ml，定容于 50ml 的容量瓶中，摇匀，即得。

测定法：见原料。

本品每片含淫羊藿苷为对照品计算总黄酮的量，不得少于 60mg。

淫羊藿苷含量测定：

照高效液相色谱法（中国药典 2000 版一部附录 VID）测定。

色谱条件：见原料。

对照品溶液的制备：见原料。

供试品溶液的制备：

取本品 10 片，研细混匀后，精密称取样品约 15mg，置于 50ml 容量瓶中，加约 45ml 50% 甲醇超声提取 20 分钟后，加 50% 甲醇至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.45 μ m）滤过，取续滤液，即得。

测定法：见原料。

本品每片含淫羊藿苷为对照品计算淫羊藿苷的含量不得少于 20mg。

功能与主治：补肾阳强筋骨，用于抗骨质疏松。

用法与用量：口服，每日 3 次，每次 1 片

规格：100mg/片

贮藏：密闭，置阴凉干燥处保存。

具体实施方式

实施例 1

取淫羊藿净药材 100kg，以水煎煮提取 2 次，每次用水量约为药材的 20 倍量。第一次煎煮 2 小时，第二次煎煮 1.5 小时，过滤。合并滤液并冷却至室温。上大孔树脂，上样结束后先以去离子水洗脱，换以 15% 乙醇洗脱，再换以 30% 乙醇洗脱，再后以 40% 乙醇洗脱，最后以 50% 乙醇洗脱，此时起监测洗脱液的乙醇浓度，当醇浓度达 45% 时起，开始收集洗脱液至结束，将该部分洗脱液减压浓缩至干。

检测得浸膏量 1.21kg，总黄酮含量 71.8%，淫羊藿苷含量 25.8%。

实施例 2

取淫羊藿净药材 100kg, 经上述工艺处理后, 获浸膏量 1.28kg, 总黄酮量 73.6%, 淫羊藿苷含量 27.5%。

实施例 3

取淫羊藿净药材 100kg, 经上述工艺处理后获浸膏量 1.19kg, 总黄酮含量 69.2%, 淫羊藿苷含量 24.4%。

工业实用性

9412 系中药淫羊藿中提取的活性组分, 主要为黄酮, 一系列试验表明具有 60%黄酮含量的 9412 具有抗骨质疏松症的作用。

① 对维甲酸致大鼠骨质疏松症预防作用试验中, 9412 不论低、中、高剂量组均能提高大鼠股骨骨密度 ($P<0.05$, $P<0.01$), 增加股骨及骨灰重量, 股骨骨灰钙及磷的含量。

② 对维甲酸致大鼠骨质疏松症治疗作用试验中, 9412 低、中、高剂量组能提高大鼠股骨骨密度 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并以中剂量组较为明显 ($P<0.01$), 中、高剂量组能增加股骨骨灰重及骨钙骨磷的含量, 低剂量作用不明显。

③ 9412 对去势大鼠造成骨质疏松症后, 有中、高剂量组能提高大鼠股骨骨密度 ($P<0.05$), 低剂量组不明显。血清钙、磷含量影响, 但能不同程度的提高大鼠股骨重量及骨灰中钙、磷含量并以中剂量组较好。

④ 对去势大鼠能增加大鼠股骨头骨小梁的宽度和长度, 也说明 9412 对去势大鼠的骨质疏松有一定的治疗作用。

⑤ 9412 对新生鼠成骨细胞有一定的促进生长的作用, 以 $0.01\mu\text{g/ml}$ 的促进作用最明显。

本发明的制剂经实验动物证实对骨质疏松症有预防及治疗作用, 能提高股骨骨密度及骨钙、骨磷的含量, 改善股骨指数。本发明提供了制备方法。

权 利 要 求

1. 一种用于抗骨质疏松的中药制剂，其特征在于该制剂是由淫羊藿提取的有效成份与药用辅料组成的。

2. 一种如权利要求 1 所述的用于抗骨质疏松的中药制剂的制备工艺，其特征在于该工艺包括下列步骤：

(1) 制备淫羊藿干浸膏

取淫羊藿药材，以水煎煮提取二次，每次用水量均为药材的 20 倍量，第一次煎煮 2 小时，第二次煎煮 1.5 小时，过滤，合并滤液并冷却至室温，上大孔吸附树脂，每公斤药材用已处理好的水状态下的树脂 1 升，上样结束后，先以去离子水洗脱，换以 15%乙醇洗脱，再换以 30%乙醇洗脱，而后以 40%乙醇洗脱，最后以 50%乙醇进行洗脱，此时起监测洗脱液的乙醇浓度，当醇浓度达 45%时起，开始收集洗脱液至结束，将该部分洗脱液减压浓缩至干，即得；

原料质量标准草案

处方：淫羊藿

制法：

将淫羊藿叶子，每次加 20 倍量水提取二次，第一次煎煮 2 小时，第二次煎煮 1.5 小时，过滤，合并滤液并冷却至室温，上大孔吸附树脂，以不同浓度的乙醇洗脱，收集相应流份的洗脱液，减压浓缩至干得浸膏粉；

性状：本品为棕褐色粉末；

鉴别：取浸膏粉 0.01g，加甲醇至 10ml，超声提取 20 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 2ml 溶解，作为供试品溶液，另取淫羊藿苷对照品，加甲醇溶解，配制成每 ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液，照薄层色谱法试验，中国药典 2000 版一部附录 VIB。吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μ l，分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上，以 10:1:1:1 的醋酸乙酯-正丁醇-甲酸-水为展开剂，展开，取出，晾干，置 254nm 紫外灯下检视，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同的暗红色斑点；喷以三氯化铝试液后，再置 365nm 紫外灯下检视，显相同的橙红色荧光斑点；

检查：应符合质量标准的各项规定；

总黄酮含量测定：

照分光光度法测定，中国药典 2000 版一部附录 VA；

对照品溶液的制备：

精密称取淫羊藿苷对照品适量，以 50%甲醇制成每 1ml 含淫羊藿苷 10 g 的溶液，即得；

供试品溶液的制备:

精密称取浸膏粉约 16mg, 置于 10ml 容量瓶中, 加约 9ml 50% 甲醇超声提取 20 分钟后, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.5ml, 定容于 50ml 的容量瓶中, 摇匀, 即得;

测定法:

分别取对照品溶液和供试品溶液, 以 50% 甲醇为空白, 在 270nm 波长处照分光光度法测定, 即得;

本品以淫羊藿苷为对照品计算总黄酮的含量不得少于 60%;

淫羊藿苷含量测定:

照高效液相色谱法测定, 中国药典 2000 版一部附录 VID;

色谱条件:

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相为乙腈: 水, 30: 70; 流速为 1.0ml/min; 柱温为 30℃ 检测波长为 270nm, 理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 1500;

对照品溶液的制备:

精密称取淫羊藿苷对照品适量, 以 50% 甲醇制成每 1ml 含淫羊藿苷 0.1mg 的溶液, 即得;

供试品溶液的制备:

精密称取浸膏粉约 7.5mg, 置于 50ml 容量瓶中, 加约 45ml 50% 甲醇超声提取 20 分钟后, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得;

测定法:

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得;

本品以淫羊藿苷为对照品计算淫羊藿苷的含量不得少于 20%;

功能与主治: 用于抗骨质疏松;

贮藏: 密闭, 置阴凉干燥处保存;

(2) 制备制剂

处方:

制剂处方:

浸膏粉	100g
淀粉	40g
乳糖	30g
微晶纤维素	30g
7% 淀粉浆	适量
硬脂酸镁	1%

薄膜包衣处方:

胃溶型薄膜包衣预混剂	12g
50%乙醇	适量

以上剂量按工艺制成 1000 片;

制备方法:

按处方比例称取浸膏粉、淀粉、乳糖、微晶纤维素, 分别过 80 目筛, 混匀, 再过 40 目筛三次, 将上述混合粉用 7%淀粉浆制软材, 过 24 目筛粒, 50℃干燥 2 小时, 干燥颗粒过 30 目筛整粒, 加入处方量硬脂酸镁, 混匀, 压片, 包衣, 晾片, 即得;

本品系由淫羊藿提取物制成的片剂;

性状: 本品包衣片为棕红色片剂, 素片为棕褐色片剂;

鉴别:

取本品 5 片, 研细, 称取 0.02g, 加甲醇至 10ml, 超声提取 20 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2ml 溶解, 作为供试品溶液, 另取淫羊藿苷对照品, 加甲醇溶解, 配制成每 ml 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液, 照薄层色谱法试验, 中国药典 2000 版一部附录 VIB, 吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以 10:1:1:1 的醋酸乙酯-正丁醇-甲酸-水为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置 254nm 紫外灯下检视, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的暗红色斑点; 喷以三氯化铝试液后, 再置 365nm 紫外灯下检视, 显相同的橙红色荧光斑点;

检查:

应符合中国药典 2000 版一部片剂, 附录 ID, 项下的各项规定;

总黄酮含量测定:

照分光光度法测定, 中国药典 2000 版一部附录 VIB;

对照品溶液的制备: 见原料;

供试品溶液的制备:

取本品 10 片, 研细混匀后, 精密称取样品约 32mg, 置于 10ml 容量瓶中, 加约 9ml 50%甲醇超声提取 20 分钟后, 加 50%甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.5ml, 定容于 50ml 的容量瓶中, 摇匀, 即得;

测定法: 见原料;

本品每片含以淫羊藿苷为对照品计算总黄酮的量, 不得少于 60mg;

淫羊藿苷含量测定:

照高效液相色谱法测定, 中国药典 2000 版一部附录 VID;

色谱条件: 见原料;

对照品溶液的制备：见原料；

供试品溶液的制备：

取本品 10 片，研细混匀后，精密称取样品约 15mg，置于 50ml 容量瓶中，加约 45ml 50%甲醇超声提取 20 分钟后，加 50%甲醇至刻度，摇匀，用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得；

测定法：见原料；

本品每片含以淫羊藿苷为对照品计算淫羊藿苷的含量不得少于 20mg；

功能与主治：用于抗骨质疏松；

用法与用量：口服，每日 3 次，每次 1 片；

规格：100mg/片；

贮藏：密闭，置阴凉干燥处保存。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 03/00466

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ A61K 31/352, 35/78, A61P 19/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Pharmaceutical Abstract of China

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, China Patent Research System; epimedium, osteoporosis

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A1, 0101996, (Univ. Western Australia, et al.) 11. Jan. 2001 (11. 01. 01), whole document	1-2
1	J. of China Pharm. Univ., 31(3), 2000, Ji Hui, et al., "Effect of HEF on Osteoporosis Induced by Retinoic Acid in Male Rats", p. 222-225	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"F" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11. July 2003 (11. 07. 03)	Date of mailing of the international search report 24 JUL 2003 (24. 07. 03)
Name and mailing address of the ISA/CN Xinzheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Wei Jian Telephone No. 86-10-62093748

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 03/00466

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN, A, 1065399, (TCM Inst. of Liao Ning Prov.) 21. Oct. 1992 (21. 10. 92), whole document	1-2
A	CN, A, 1096953, (Zhou Yong) 4. Jan. 1995 (04. 01. 95), whole document	1-2
A	CN, A, 1112010, (Medicinal Developing Centre of Guang Dong Academy of Medicine) 22. Nov. 1995 (22. 11. 95), whole document	1-2
A	CN, A, 1200279, (Guizhou Green Industry Co., Ltd.) 2. Dec. 1998 (02. 12. 98), whole document	1-2
A	CN, A, 1253012, (Qing Duoshun) 17. May 2000 (17. 05. 00), whole document	1-2
A	CN, A, 1328841, (Fo Shan Hosp. of TCM) 2. Jan. 2002 (02. 01. 02), whole document	1-2
A	CN, A, 1344558, (Jiang Su Inst. of TCM) 17. Apr. 2002 (17. 04. 02), whole document	1-2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN 03/00466

Patent Documents Cited in Search Report	Date Published	Patent Family Members	Date Published
WO 01/01996A1	11. Jan. 2001	AU 200055113	22. Jan. 2001
CN 1065399A	21. Oct. 1992	None	
CN 1096953A	4. Jan. 1995	None	
CN 1112010A	22. Nov. 1995	None	
CN 1200279A	2. Dec. 1998	None	
CN 1253012A	17. May 2000	None	
CN 1328841A	2. Jan. 2002	None	
CN 1344558A	17. Apr. 2002	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 03/00466

A. 主题的分类

IPC⁷ A61K 31/352, 35/78, A61P 19/10

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国药学文摘

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, CPRS; osteoporosis, epimedium, 淫羊藿, 骨质疏松

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
X	WO, A1, 01/01996, (Univ. Western Australia 等) 11.01 月 2001 (11.01.01), 全文	1-2
X	中国药科大学学报 31 卷 3 期, 2000 年, 季晖等, “淫羊藿总黄酮对维 A 酸诱导大鼠骨质疏松症的防治作用”, 222-225 页	1-2
A	CN, A, 1065399, (辽宁省中医研究院) 21. 10 月 1992 (21. 10. 92), 全文	1-2
A	CN, A, 1096953, (周勇) 04. 01 月 1995 (04. 01. 95), 全文	1-2
A	CN, A, 1112010, (吴铁) 22. 11 月 1995 (22. 11. 95), 全文	1-2
A	CN, A, 1200279, (贵州绿色实业有限公司) 02. 12 月 1998 (02. 12. 98), 全文	1-2
A	CN, A, 1253012, (卿多舜) 17. 05. 2000 (17. 05. 00), 全文	1-2
A	CN, A, 1328841, (佛山市中医院) 02. 01 月 2002 (02. 01. 02), 全文	1-2
A	CN, A, 1344558, (江苏省中医药研究院) 17. 04 月 2002 (17. 04. 02), 全文	1-2

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

引用文件的专用类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
“X” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术文件	“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性
“Y” 在国际申请的当天或之后公布的在先的申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性
“Z” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件	“&” 同族专利成员的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	

国际检索实际完成的日期

11. 07 月 2003 (11. 07. 03)

国际检索报告邮寄日期

24. 7月 2003 (24. 07. 03)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

魏健

电话号码: 86-10-62093748

国际检索报告

关于同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN 03/00466

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO 01/01996A1	11. 01 月 2001	AU 200055113	22. 01 月 2001
CN 1065399A	21. 10 月 1992	无	
CN 1096953A	04. 01 月 1995	无	
CN 1112010A	22. 11 月 1995	无	
CN 1200279A	02. 12 月 1998	无	
CN 1253012A	17. 05 月 2000	无	
CN 1328841A	02. 01 月 2002	无	
CN 1344558A	17. 04 月 2002	无	