



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101773490 B

(45) 授权公告日 2013.02.20

(21) 申请号 201010103723.6

A61K 135/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.01.25

(56) 对比文件

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院
地址 518057 广东省深圳市南山区深圳虚拟
大学园 A216 室
专利权人 暨南大学

CN 101415332 A, 2009.04.22, 说明书摘要.
CN 1634905 A, 2005.07.06, 权利要求 1-7.
CN 101002814 A, 2007.07.25, 说明书摘要.

(72) 发明人 黄文秀 姚新生 肖辉辉 戴毅

杨序娟等. 接骨木中的酚酸类化合物及其对
大鼠类成骨细胞 UMR106 增殖及分化的影响.《中
草药》. 2005, 第 36 卷 (第 11 期), 第 1604-1607
页.

(74) 专利代理机构 深圳市万商天勤知识产权事
务所 (普通合伙) 44279

欧阳富等. 接骨木中木脂素类化学成分研
究.《中国中药杂志》. 2009, 第 34 卷 (第 10 期),
第 1225-1227 页.

代理人 王志明

欧阳富等. 接骨木中木脂素类化学成分研
究.《中国中药杂志》. 2009, 第 34 卷 (第 10 期),
第 1225-1227 页.

(51) Int. Cl.

审查员 康旭亮

A61K 31/343(2006.01)

A61K 31/192(2006.01)

A61K 31/09(2006.01)

A61K 31/085(2006.01)

A61K 36/35(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

A23L 1/29(2006.01)

A23L 1/30(2006.01)

权利要求书 8 页 说明书 21 页 附图 5 页

(54) 发明名称

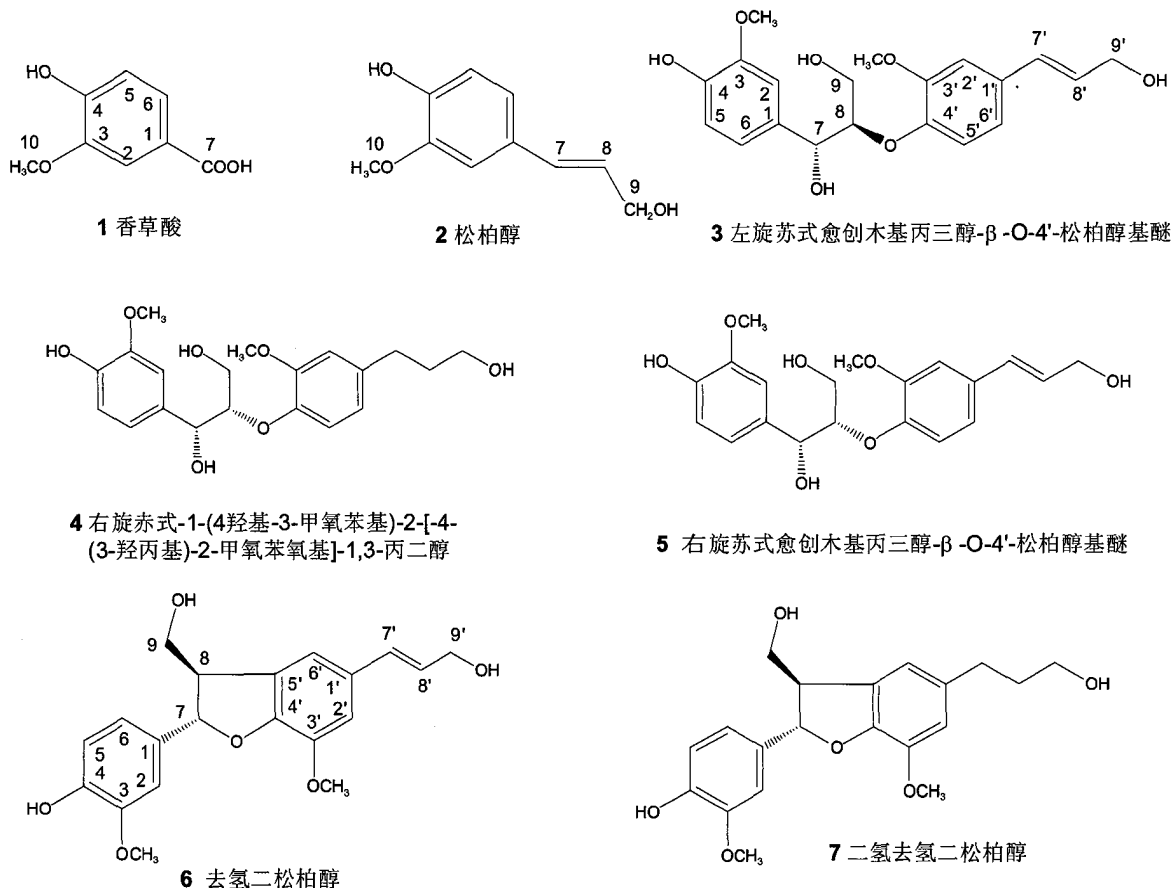
具有降低绝经期妇女骨相关疾病发病风险的
接骨木活性部位及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种具有改善绝经后骨量丢失作用的接骨木活性部位,其化学成分明确,主要含有 7 个化合物:香草酸、松柏醇、左旋赤式愈创木基丙三醇-β-0-4'-松柏醇基醚、右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-0-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇。该活性部位能够显著改善去卵巢小鼠的骨质流失,提高股骨及胫骨骨密度,增加骨容积,且不增加子宫重量,是一种安全有效地缓解和改善绝经期妇女骨相关疾病各种症状的成分。本发明的有益效果是提供了一种接骨木活性部位,可用于制备具有防治绝经后骨相关疾病作用的药物、食品或食品添加剂。

CN 101773490 B

1. 一种接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物、食品与食品添加剂中的用途,其特征是:该活性部位的成分主要有7个化合物:香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇,所述7个化合物的化学结构式分别是:



所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现:

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后,用10倍量的60%乙醇,加热回流提取3次,每次2小时,收集提取液,将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物;

(2) 以适量水溶解接骨木总提取物,进行大孔树脂开放柱层析,用50%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂,得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

2. 根据权利要求1所述的接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物、食品与食品添加剂中的用途,其特征是:按重量百分比该活性部位由以下化学成分组成:

香草酸(1)	0.5%-5%
松柏醇(2)	0.5%-10%
左旋赤式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚(3)	1.0%-15%
右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇(4)	1.0%-15%
右旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚(5)	1.0%-15%
去氢二松柏醇(6)	2.0%-20%
二氢-去氢二松柏醇(7)	2.0%-20%
其它组分	余量

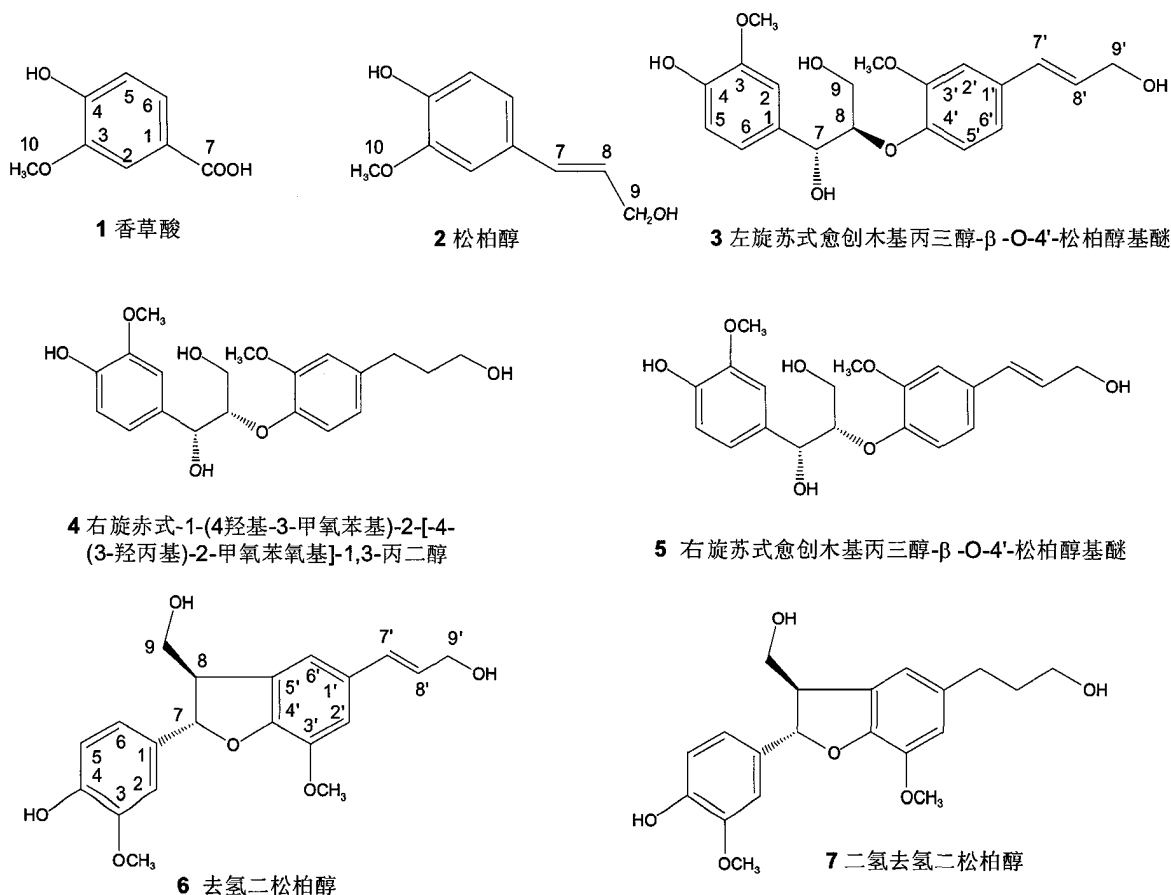
所述其它组分主要是提取过程中得到的其他苯丙素、木脂素、酚酸及糖苷类物质。

3. 根据权利要求 1 所述的接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物、食品与食品添加剂中的用途,其特征是:所述接骨木活性部位的 HPLC 指纹图谱包含 10 个主要色谱峰,其中 7 个色谱峰的化学结构已经被准确指认,以峰 9 去氢二松柏醇的保留时间为 1 计算得到的各色谱峰的相对保留时间,分别为香草酸的保留时间为 0.40 ± 0.02 、松柏醇的保留时间为 0.55 ± 0.02 、左旋赤式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚的保留时间为 0.67 ± 0.02 、右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇的保留时间为 0.69 ± 0.02 、右旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚的保留时间为 0.71 ± 0.02 、去氢二松柏醇的保留时间为 1.00、二氢-去氢二松柏醇的保留时间为 1.02 ± 0.02 。

4. 根据权利要求 1 所述的接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物、食品与食品添加剂中的用途,其特征是:所述接骨木活性部位的 HPLC 指纹图谱是采用反相高效液相色谱法建立的,所述反相高效液相色谱法的条件是:以十八烷基硅氧键和硅胶为固定相;以含有 0.1% 醋酸的甲醇-水溶液作为流动相,梯度洗脱;流速为 0.8 mL/min ;检测波长为 280 nm ;色谱柱温度为 35°C ,以去氢二松柏醇计算理论塔板数,不低于 2000。

5. 根据权利要求 1 所述的接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物、食品与食品添加剂中的用途,其特征是:所述药物是药学上可接受的剂型,所述剂型包括但不限于片剂、胶囊剂、口服液。

6. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的药物及适当的药物辅料的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物中的应用,其特征是:该活性部位的成分主要有 7 个化合物:香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇,所述 7 个化合物的化学结构式分别是:

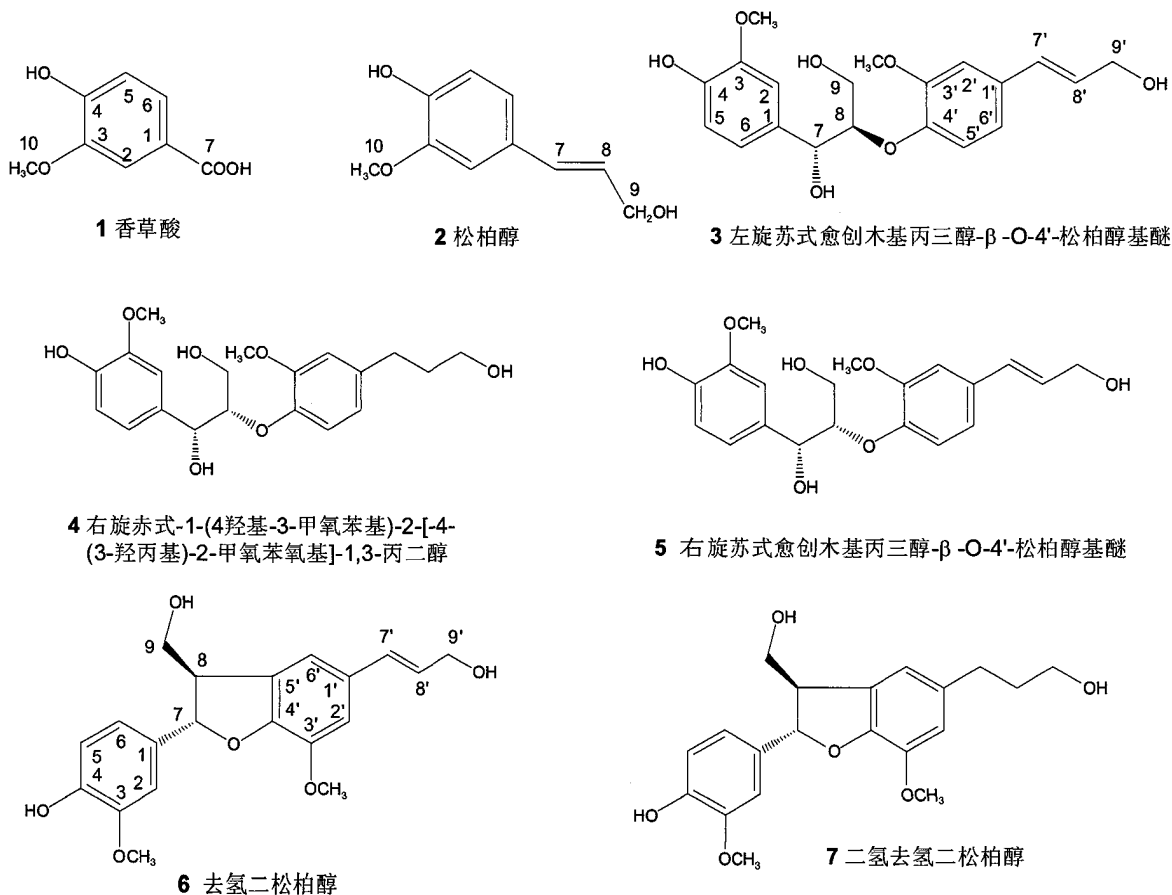


所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后，用 10 倍量的 60% 乙醇，加热回流提取 3 次，每次 2 小时，收集提取液，将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物；

(2) 以适量水溶解接骨木总提取物，进行大孔树脂开放柱层析，用 50% 乙醇洗脱，收集洗脱液，减压回收溶剂，得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

7. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的传统中药及适当的药物辅料的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物中的应用，其特征是：该活性部位的成分主要有 7 个化合物：香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇，二氢去氢二松柏醇，所述 7 个化合物的化学结构式分别是：

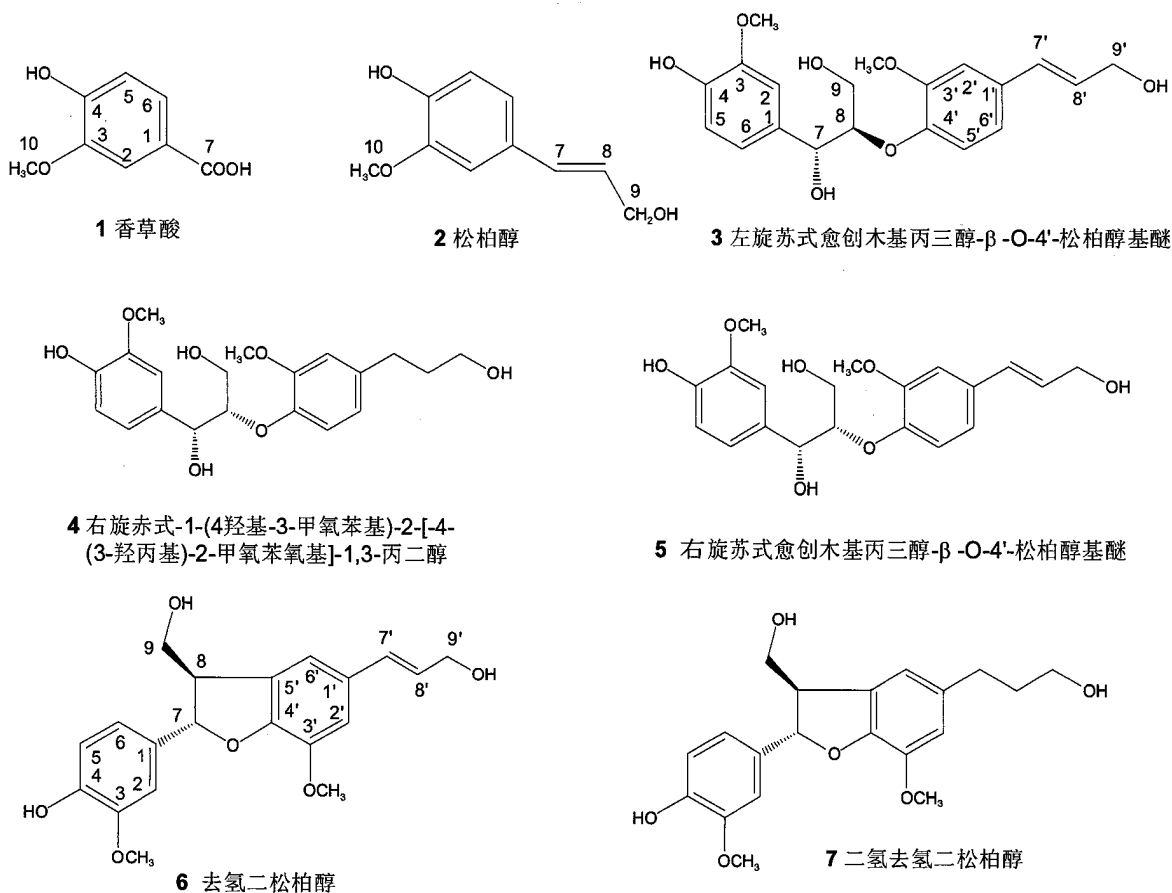


所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后，用 10 倍量的 60% 乙醇，加热回流提取 3 次，每次 2 小时，收集提取液，将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物；

(2) 以适量水溶解接骨木总提取物，进行大孔树脂开放柱层析，用 50% 乙醇洗脱，收集洗脱液，减压回收溶剂，得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

8. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的天然产物及适当的药物辅料的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的药物中的应用，其特征是：该活性部位的成分主要有 7 个化合物：香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇，二氢去氢二松柏醇，所述 7 个化合物的化学结构式分别是：

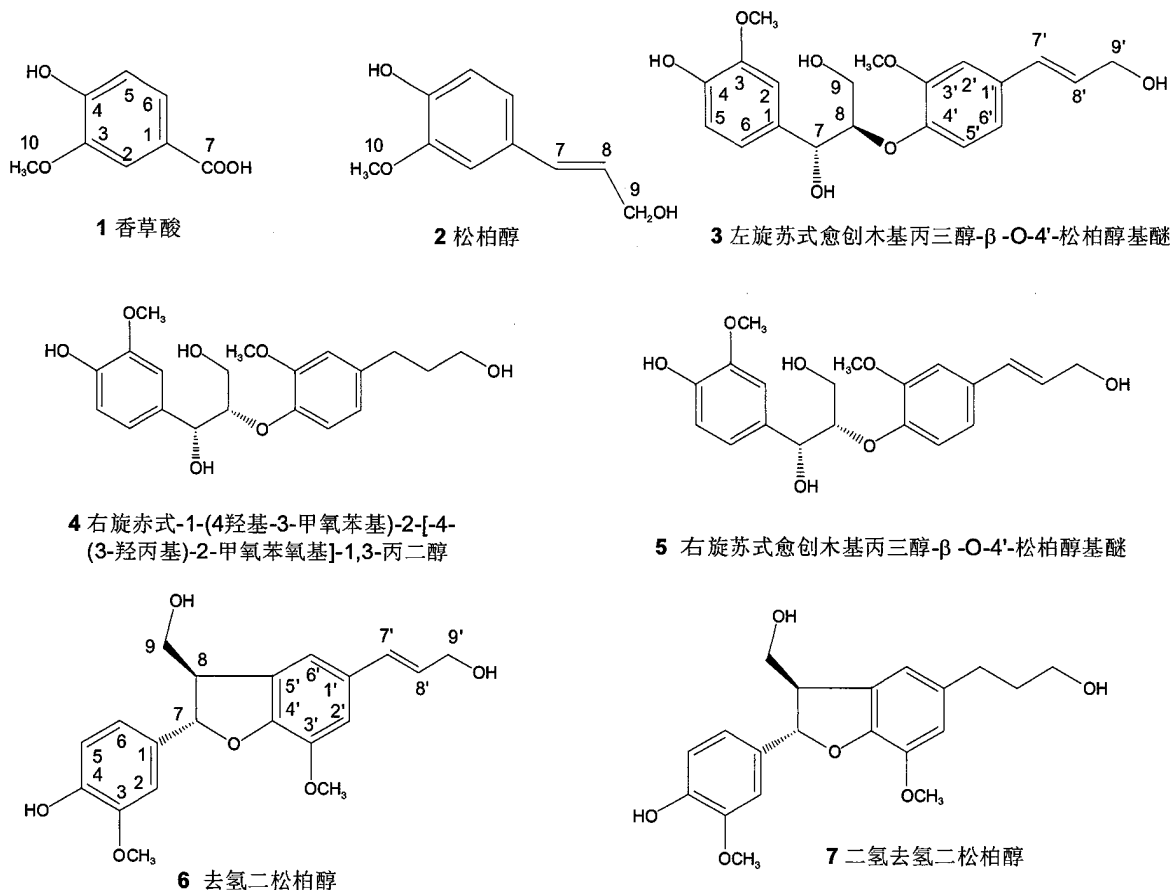


所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后,用 10 倍量的 60% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 小时,收集提取液,将提取液减压浓缩后得到接骨木总提物；

(2) 以适量水溶解接骨木总提物,进行大孔树脂开放柱层析,用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂,得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

9. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的药物的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的食品与食品添加剂中的应用,其特征是:该活性部位的成分主要有 7 个化合物:香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇,所述 7 个化合物的化学结构式分别是：

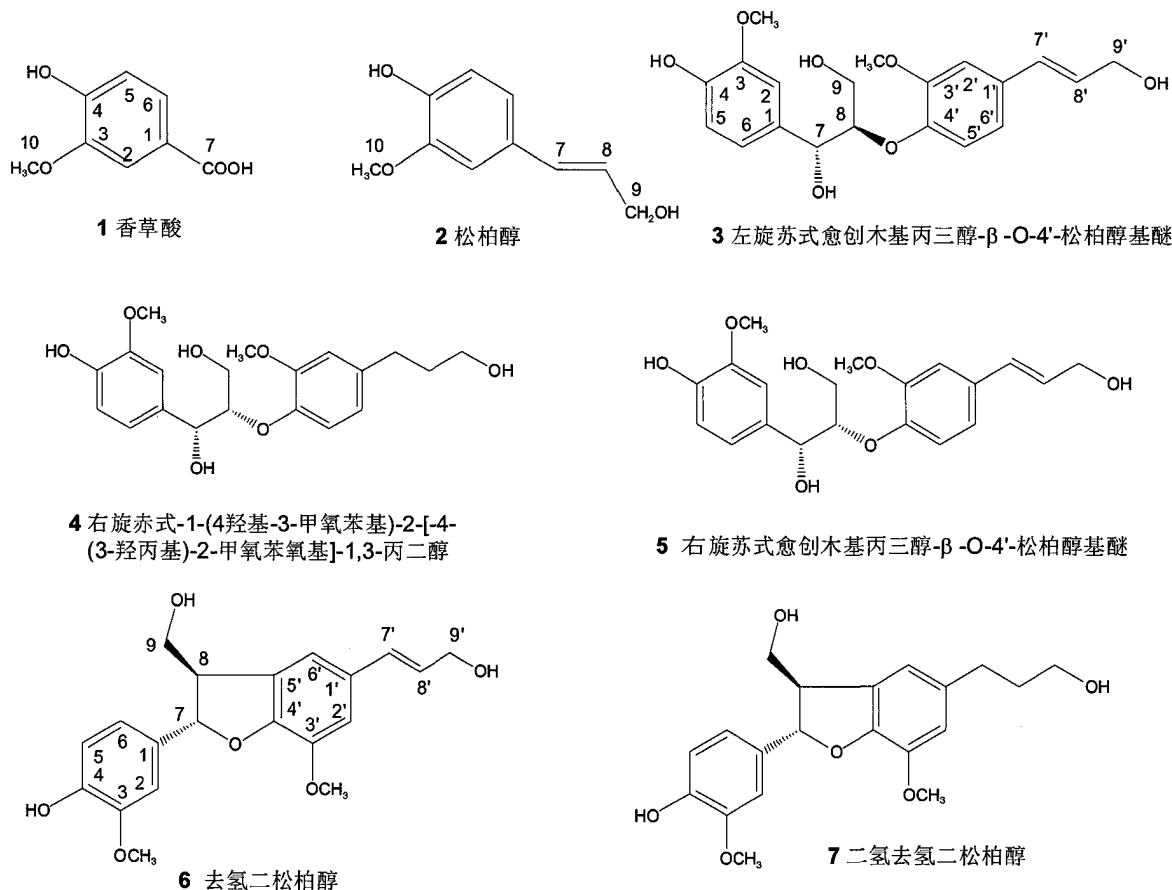


所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后，用 10 倍量的 60% 乙醇，加热回流提取 3 次，每次 2 小时，收集提取液，将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物；

(2) 以适量水溶解接骨木总提取物，进行大孔树脂开放柱层析，用 50% 乙醇洗脱，收集洗脱液，减压回收溶剂，得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

10. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的传统中药的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的食品与食品添加剂中的应用，其特征是：该活性部位的成分主要有 7 个化合物：香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇，二氢去氢二松柏醇，所述 7 个化合物的化学结构式分别是：

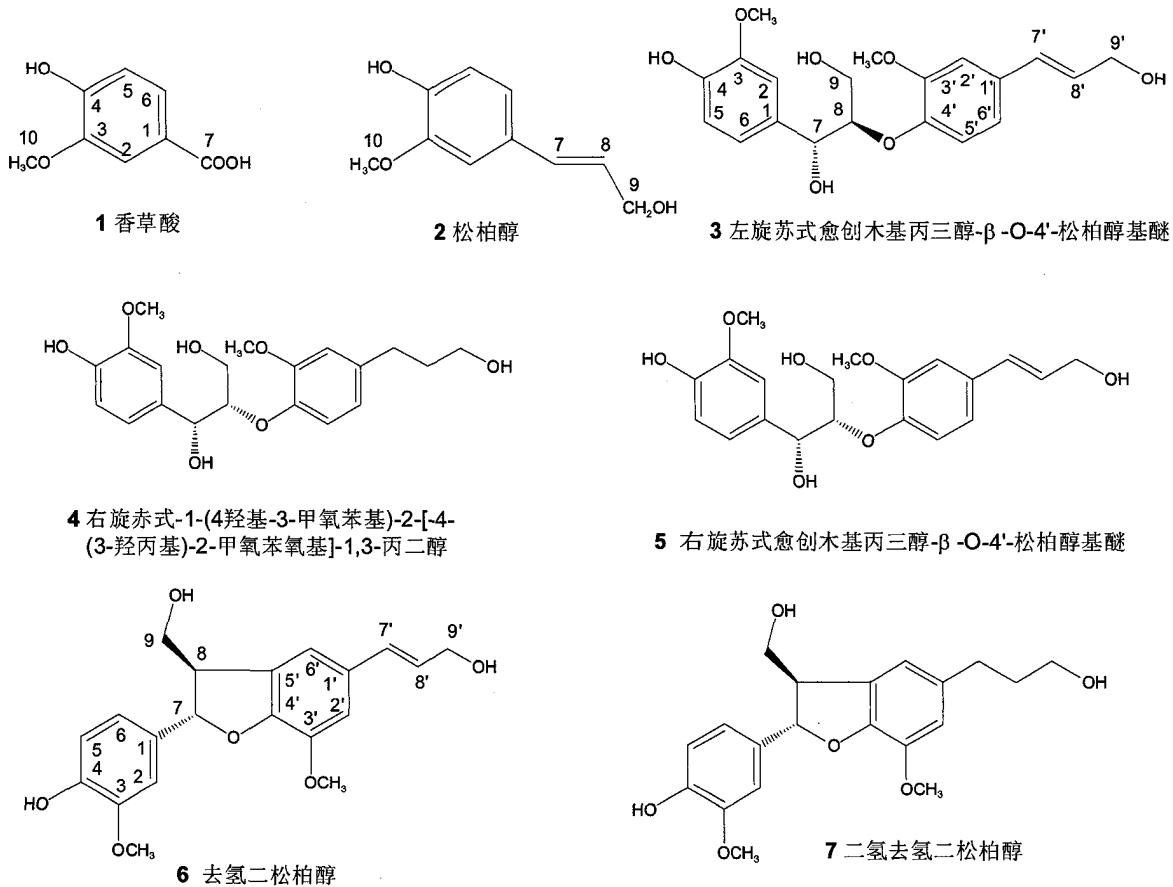


所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

(1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后,用 10 倍量的 60% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 小时,收集提取液,将提取液减压浓缩后得到接骨木总提物；

(2) 以适量水溶解接骨木总提物,进行大孔树脂开放柱层析,用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂,得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

11. 接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨质疏松疾病的天然产物的混合物在制备缓解及改善绝经期妇女骨质疏松疾病的食品与食品添加剂中的应用,其特征是:该活性部位的成分主要有 7 个化合物:香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇-β-O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇,所述 7 个化合物的化学结构式分别是：



所述接骨木活性部位的制备方法通过以下步骤实现：

- (1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后,用 10 倍量的 60% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 小时,收集提取液,将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物；
- (2) 以适量水溶解接骨木总提取物,进行大孔树脂开放柱层析,用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂,得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

具有降低绝经期妇女骨相关疾病发病风险的接骨木活性部位及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及接骨木活性部位对绝经后骨的保护作用,具体的说是接骨木活性部位及所含活性成分在制备预防或治疗绝经后骨相关疾病的药物或保健品中的应用。

背景技术

[0002] 20 世纪随着医疗水平的进步、人类寿命的延长,女性绝经后的生存时间有了显著的延长。因此,由绝经所引发的更年期综合征、肥胖症、骨质疏松、泌尿生殖道萎缩、糖尿病、心血管疾病与老年痴呆等疾病的发病率也有了显著的增加。这些疾病不仅影响了患者个人的生活质量,亦给社会和家庭带来了沉重的负担。

[0003] 女性绝经后 1 ~ 10 年内,体内会出现钙的快速丢失,易于发生骨质疏松症。骨质疏松是一种骨量减少,骨组织显微结构破坏,骨骼脆性增加,从而易于发生骨折的全身性骨骼疾病 [1]。WHO 资料显示,骨质疏松居于老年人常见病、多发病的第六位 [2]。在欧洲、日本和美国,每年有超过 7500 万人患有骨质疏松症。50% 的女性可因骨质疏松而发生骨折;据统计,骨质疏松骨折所致的死亡率超过乳腺癌、宫颈癌和子宫内膜癌的总和 [3-6]。我国是全世界老龄人口最多的国家,目前受到骨质疏松症威胁的老年人群有 8400 万,随着人口老龄化加剧,这个数字还在逐步增长 [7]。

[0004] 近几十年来,治疗绝经后骨质疏松症的药物发展迅速。目前所用的治疗药物主要为合成药,包括雌激素、降钙素、二磷酸盐等抗骨质吸收药物,氟化物等促进骨形成药物,钙剂、维生素 D 等骨矿化药物。这些药物能够不同程度地预防骨质疏松症的发生,缓解病痛症状、降低骨折发生率,但也存在着毒副作用大、远期疗效不肯定,价格昂贵等多方面的缺点。至今尚无一种集高效、安全、毒副作用小、经济等优点于一身的理想药物。

[0005] 我国先民在 2000 多年前的传统医学著作《素问》中,就对男女在生长发育不同阶段骨的变化作了详细描述。传统医学认为:肾为先天之本,肾主骨生髓,骨的生长、发育、强劲、衰弱都与肾精的盛衰有密切关系。肾精亏损,则骨髓生长乏源,骨骼失养,骨矿含量下降,骨密度下降,则会产生“骨枯”、“骨极”、“骨痿”,即现代医学定义的骨质疏松。中医药的辩证施治也将骨与肾紧密相连,提出补肾益精、补肾益肝、补肾健脾、补肾活血益气等治疗方法。中草药资源丰富、毒副作用小、价格相对低廉且有丰富的中医理论和临床实践支持,已成为当代寻找治疗骨质疏松药物的重要源泉。

[0006] 接骨木 (*Sambucus williamsii* Hance) 始载于《唐本草》,别名续骨木 (《纲目》)、铁骨散 (《植物名实图考》)、接骨丹 (《草木便方》) 等,为忍冬科接骨木的干燥茎枝。其味甘、苦,性平,无毒,归肝经。接骨木具有祛风利湿、活血止痛、接骨续筋的功效,主要用于治疗风湿筋骨疼痛、腰痛、跌打肿痛、骨折、创伤出血等症 [8]。现代药理学研究表明接骨木所含的部分木脂素成分在体外能够促进成骨样细胞增殖和 ALP 活性。然而对于上述成分的研究缺乏体内动物药效学实验证据,同时接骨木抗骨质疏松活性部位及其作用机理也尚未明晰。为此,有必要对其提取物及其馏分,采用国际公认的药效学动物模型,开展深入的研究。

发明内容

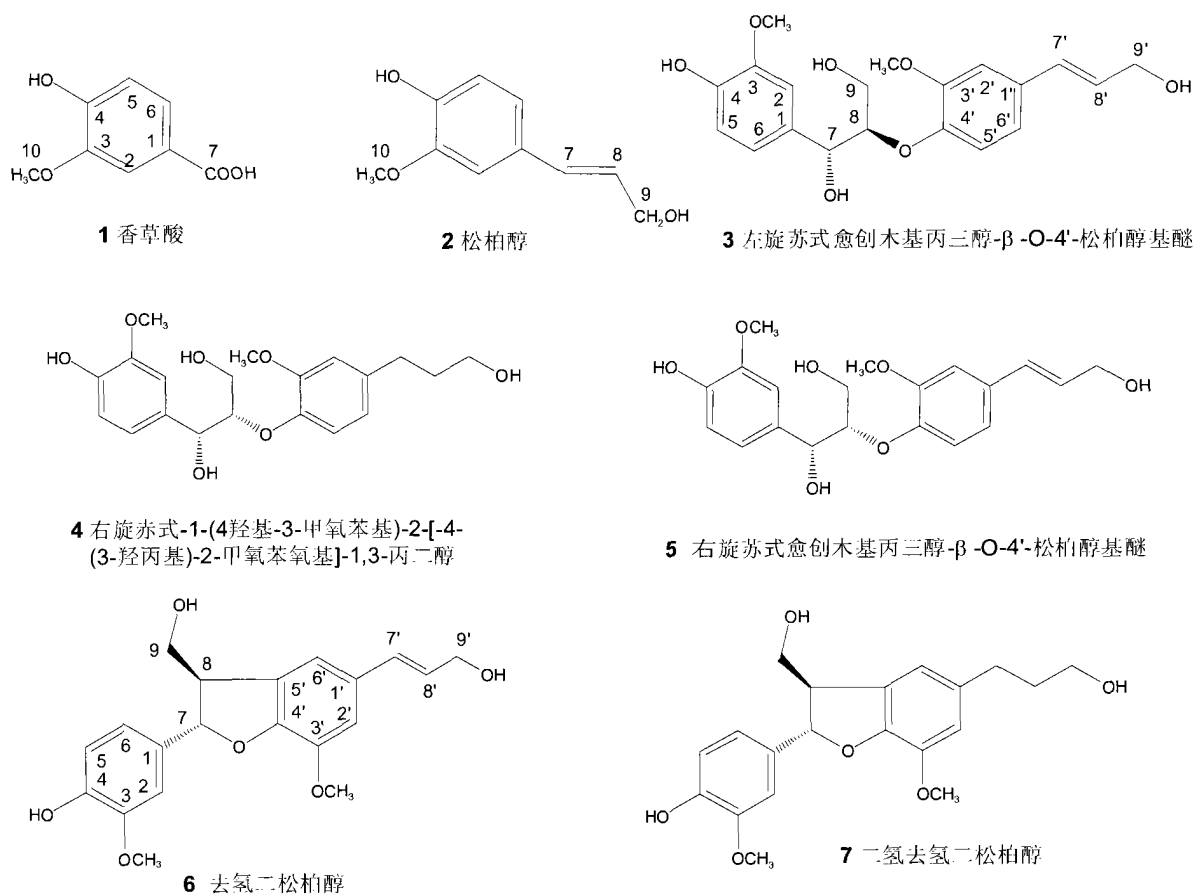
[0007] 本发明要解决的技术问题是确定接骨木活性部位及所含的主要活性成分。

[0008] 本发明要解决的另一个技术问题是提供一种接骨木活性部位,用于制备预防或治疗绝经后骨相关疾病的药物、食品或食品添加剂,以及接骨木活性部位与具有缓解和改善骨相关疾病的药物、传统中药、天然产物混合,制备具有防治绝经后骨相关疾病作用的药物、食品或食品添加剂。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0010] 本发明公开了接骨木活性部位,及其所含的主要活性成分,该活性部位的成分主要有7个化合物:香草酸、松柏醇、左旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-甲氧苯氧基]-1,3-丙二醇、右旋苏式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚、去氢二松柏醇,二氢去氢二松柏醇,所述7个化合物的化学结构式分别是:

[0011]



[0012] 所述接骨木活性部位按重量百分比该活性部位由以下化学成分组成:

- | | | |
|--------|---|-----------|
| [0013] | 香草酸 (1) | 0.5% -5% |
| [0014] | 松柏醇 (2) | 0.5% -10% |
| [0015] | 左旋赤式愈创木基丙三醇- β -O-4'-松柏醇基醚 (3) | 1.0% -15% |
| [0016] | 右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇 (4) | 1.0% -15% |
| [0017] | | |

[0018]	右旋苏式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚(5)	1.0% -15%
[0019]	去氢二松柏醇(6)	2.0% -20%
[0020]	二氢-去氢二松柏醇(7)	2.0% -20%
[0021]	其他组分	余量

[0022] 所述其他组分主要是提取过程中得到的其他苯丙素、木脂素、酚酸及糖苷类物质。

[0023] 所述接骨木活性部位的 HPLC 指纹图谱包含 10 个主要色谱峰,其中 7 个色谱峰的化学结构已经被准确指认,以去氢二松柏醇(峰 9)的保留时间为 1 计算得到的各色谱峰的相对保留时间,分别为 0.40 ± 0.02 (香草酸)、 0.55 ± 0.02 (松柏醇)、 0.67 ± 0.02 (左旋赤式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚)、 0.69 ± 0.02 (右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇)、 0.71 ± 0.02 (右旋苏式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚)、1.00(去氢二松柏醇)、 1.02 ± 0.02 (二氢-去氢二松柏醇)。

[0024] 所述接骨木活性部位的 HPLC 指纹图谱是采用反相高效液相色谱法建立的,所述反相高效液相色谱法的条件是:以十八烷基硅氧键和硅胶为固定相;以含有 0.1% 醋酸的甲醇-水溶液作为流动相,梯度洗脱;流速为 0.8mL/min;检测波长为 280nm;色谱柱温度为 35°C,以去氢二松柏醇计算理论塔板数,不低于 2000。

[0025] 本发明公开了一种接骨木活性部位的制备方法,其特征是通过以下步骤实现:

[0026] (1) 接骨木干燥茎枝适当粉碎后,用甲醇、乙醇或水,采用不同提取次数和时间,通过冷提取、热提取或者超声提取提取,收集提取液,将提取液减压浓缩后得到接骨木总提取物;

[0027] (2) 以适量水溶解接骨木总提取物,进行大孔树脂开放柱层析,用水或 30% -95% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂,得到洗脱部分即为接骨木活性部位。

[0028] 上述提取步骤中,在步骤(1)中优选 10 倍量的 60% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 小时;在步骤(2)中优选 50% 乙醇洗脱。

[0029] 本发明公开了接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨相关疾病的药物中的应用。所述药物是药学上可接受的剂型,所述剂型包括但不限于片剂、胶囊剂、口服液。

[0030] 本发明公开了接骨木活性部位在制备缓解及改善绝经期妇女骨相关疾病的食品或食品添加剂中的应用。

[0031] 将前述接骨木活性部位,直接与适量药物制剂辅料或食品混合,制成适于服用的药物、食品或食品添加剂。或将前述接骨木活性部位与一种或多种具有缓解或改善骨相关疾病的药物、传统中药、天然产物(淫羊藿、仙茅、女贞子、熟地、当归、泽泻等)及适量辅料混合,制成药品、食品或食品添加剂。对制得的含有接骨木活性部位的药品、食品或食品添加剂进行去卵巢小鼠骨相关疾病的活性评价,结果显示与病理模型组比较,上述含有接骨木活性部位的药品、食品或食品添加剂可以不同程度的抑制去卵巢所引发的股骨及胫骨的骨量丢失,而对子宫指数无影响。表明上述含有接骨木活性部位的药品、食品或食品添加剂具有不同程度的缓解和改善绝经后骨质丢失,提高股骨及胫骨骨密度,增加骨容积,且不增加子宫重量,提示上述药品、食品或食品添加剂能够安全有效地缓解和改善绝经后妇女骨相关疾病各种症状。

[0032] 综上,本发明公开的接骨木活性部位能够显著改善去卵巢小鼠的骨质流失,提高

股骨及胫骨骨密度,增加骨容积,且不增加子宫重量,是一种安全有效地缓解和改善绝经期妇女骨相关疾病各种症状的成分。本发明的有益效果是提供了一种接骨木活性部位,可以用于制备具有防治绝经后骨相关疾病作用的药物、食品或食品添加剂。

附图说明

- [0033] 图 1 是通过 HPLC 分析液相确定的接骨木 50%乙醇洗脱部分的指纹图谱;
- [0034] 图 2 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的 7 个化合物的化学结构图;
- [0035] 图 3 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 1 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0036] 图 4 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 2 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0037] 图 5 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 3 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0038] 图 6 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 4 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0039] 图 7 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 5 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0040] 图 8 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 6 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0041] 图 9 是从接骨木 50%乙醇洗脱部分中分离得到的化合物 7 在相同 HPLC 条件下的色谱峰指认图谱;
- [0042] 图 10 是本发明接骨木各馏分对小鼠子宫重量的影响分析图;
- [0043] 图 11 是本发明接骨木各馏分对小鼠股骨及胫骨骨密度的影响分析图;
- [0044] 图 12 是本发明接骨木各馏分对小鼠股骨及胫骨骨容积的影响分析图。

具体实施方式

[0045] 以下结合实施例以及应用研究、验证的数据进一步阐述本发明的技术方案,但发明内容并不局限于所列实施例。

[0046] 实施例 1:接骨木活性部位的制备方法

[0047] 取接骨木的干燥茎枝 50 公斤,经适当粉碎后,用 10 倍量的 60%乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 小时。合并提取液,减压蒸去溶剂,得到接骨木总提物 2160 克。随后取接骨木总提物 1250 克,以适量水溶解,进行大孔树脂开放柱层析,依次用 5 倍柱床体积的水、30%、50%、95%的乙醇-水溶液梯度洗脱,收集各部分洗脱液,分别减压回收溶剂,得到水洗脱部分 712.5 克,30%乙醇洗脱部分 160 克,50%乙醇洗脱部分 125 克及 95%乙醇洗脱部分 111 克,其中 50%乙醇洗脱部分即为接骨木活性部位(活性筛选数据,参见实施例 4、5)。

[0048] 实施例 2:接骨木活性部位中主要成分的分离及鉴定

[0049] 实施例 1 中制备的接骨木 50%乙醇洗脱部分通过 HPLC 分析液相确定了其指纹图谱,见图 1。在指纹图谱指导下经过 ODS 柱色谱、HW 40 柱色谱、RP-HPLC 制备液相等分离手段,通过 HPLC、MS、NMR 等分析鉴定方法,确定了 7 个化合物,香草酸(1)、松柏醇(2)、

左旋苏式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚(3)、右旋赤式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇(4)、右旋赤式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚(5)、去氢二松柏醇(6),二氢去氢二松柏醇(7)。

[0050] 分离得到化合物结构式见图2。在与接骨木50%乙醇洗脱部分HPLC指纹图谱相同的色谱条件下,对分离得到的化合物进行指认,具体指认过程见图3。

[0051] 2.1 具体分离过程如下

[0052] 接骨木50%乙醇洗脱部分(SWC)20.33g,60%乙醇-水溶解、过滤,滤液进行ODS中低压柱色谱分离(ϕ 2.2 \times 30cm),30%、50%、100%甲醇-水梯度洗脱,得到三个馏分:SWC1(5.20g),SWC2(7.68g),SWC3(4.19g)。SWC1经过HW40柱色谱分离(ϕ 3 \times 60cm),20%、40%、100%甲醇-水梯度洗脱得到6个馏分(fraction A-F),其中fraction C(40%甲醇-水洗脱物)再经过ODS柱色谱分离,30%、50%、100%甲醇-水梯度洗脱得到7个馏分(subfraction C1-7),对得到的馏分Subfraction C2(30%甲醇-水洗脱物)进行制备型高效液相分离,以28%甲醇-水洗脱,得到化合物2(7.2mg);对Subfraction C3(30%甲醇-水洗脱物)进行制备型高效液相分离,30%甲醇-水洗脱,随后进一步通过Sephadex LH20柱色谱纯化后,得到化合物3(15.3mg)。同样fraction D(40%甲醇-水洗脱物)经过ODS柱色谱,30%、50%、100%甲醇-水梯度洗脱及制备型高效液相分离,30%甲醇-水洗脱,得到化合物1(31.0mg)、4(15.2mg)、5(15.4mg)。SWC2经过HW40柱色谱分离(ϕ 3 \times 60cm),20%、40%、100%甲醇-水梯度洗脱得到7个馏分(fraction A-G),其中fraction C(20%甲醇-水洗脱物)进行制备型高效液相分离,40%甲醇-水洗脱,得到化合物7(180.0mg);fraction D(40%甲醇-水洗脱物)经过ODS柱色谱分离(ϕ 3 \times 60cm),30%、50%、100%甲醇-水梯度洗脱后得到5个馏分(subfraction D1-5),其中subfraction D3进一步进行ODS柱色谱分离(ϕ 1 \times 30cm),30%甲醇-水等度洗脱后得到4个馏分(subfraction D3a-d),其中subfraction D3c进行制备型高效液相分离,38%甲醇-水洗脱,得到化合物6(22.7mg)。

[0053] 2.2 化合物结构解析过程如下

[0054] 2.21 化合物1

[0055] 白色粉末(甲醇)。ESI-MS实验给出 m/z 167[M-H]⁻,提示这是一个分子量为168的小分子化合物。

[0056] 化合物1的¹H NMR图谱较简单,低场区只有三组信号, δ 7.55(1H, d, J = 8.7, 1.9Hz, H-6); δ 7.54(1H, d, J = 1.9Hz H-2); δ 6.83(1H, d, J = 8.7Hz, H-5)和,为典型的苯环ABX耦合系统氢信号。高场区有一个甲氧基信号 δ 3.88(3H, s, 3-OMe)。

[0057] 化合物的¹³C NMR显示一个羰基信号 δ 170.1,由于化学位移相对于醛羰基偏向高场,说明这是一个酸羰基或酯羰基。此外在低场区还出现6个苯环上的碳信号: δ 152.7(C-4), δ 148.7(C-3), δ 125.3(C-6), δ 123.2(C-1), δ 113.9(C-2)及在高场区出现1个甲氧基碳信号。

[0058] 经过与文献[9]比较,化合物1的结构确定为3-甲氧基-4-羟基苯甲酸,即香草酸, vanillic acid,化合物的¹³C NMR参见表1。

[0059] 2.22 化合物2

[0060] 淡黄色胶状固体(甲醇)。ESI-MS实验给出 m/z 179[M-H]⁻,提示这是一个分子量

为 180 的小分子化合物。

[0061] 显示在低场区有一组典型的苯环 ABX 耦合氢信号 δ 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2); δ 6.83 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6); δ 6.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5) 和一对反式烯氢信号 δ 6.52 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7); δ 6.49 (1H, dt, $J = 15.8, 5.9$ Hz, H-8)。高场区显示一个亚甲基氢信号 δ 4.18 (2H, dd, $J = 5.9, 1.4$ Hz, H-9), 由其裂分情况可知其连接在双键上, 此外还有一个甲氧基氢信号 δ 3.85 (3H, s, H-10)。

[0062] 在化合物的 ^{13}C NMR 和 DEPT-135 图谱上, 可以清楚的看到在 δ 132.1, 121.0 处的不饱和双键的碳信号, δ 63.9 处的亚甲基碳信号及 δ 56.4 处的甲氧基碳信号, 其余为苯环上碳信号。因此确定化合物 2 结构为松柏醇 (Coniferylalcohol)。化合物的核磁数据参见表 1。

[0063] 表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) 数据

[0064]

Position	Compound 1		Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	123.2		130.7	
2	113.9	1H, 7.54(d), $J=1.9$	110.7	1H, 6.98(d), $J=1.9$
3	148.7		147.5	
4	152.7		149.1	
5	115.8	1H, 6.83(d), $J=8.7$	116.2	1H, 6.72(d), $J=8.1$
6	125.3	1H, 7.55(dd), $J=8.7, 1.9$	127.1	1H, 6.83(dd), $J=8.1, 1.9$
7	170.1		132.1	1H, 6.49(dd), $J=15.8$
8			121.0	1H, 6.18(qt), $J=15.8, 5.9$
9			63.9	2H, 4.18(dd), $J=6.2, 1.4$
10	56.4	3H, 3.88(s)	56.4	3H, 3.85(s)

[0065] 2.23 化合物 3

[0066] 黄色油状 (甲醇), $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -1.5^\circ$ ($c = 0.67$, MeOH)。结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT-135 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 计算其不饱和度为 9。

[0067] 在化合物 3 的 ^1H NMR (400MHz, in CD_3OD) 图谱上, 低场区给出 8 组氢信号, 其中一个单峰积分值为 2。尽管有信号重叠, 但根据化学位移值及耦合常数仍可以判断存在 2 个 ABX 耦合系统和 1 个反式双键耦合, ABX 耦合系统分别为 δ 7.01 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), δ 6.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5) 和 δ 6.83 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6); δ 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), δ 6.86 (1H, H-5') 和 δ 6.86 (1H, H-6'), 反式双键为 δ 6.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7') 和 δ 6.22 (1H, dt, $J = 15.8, 5.8$ Hz, H-8')。

[0068] ^1H NMR 图谱在高场区有 2 个明显的甲氧基信号： δ 3.86(3H, s, 3-OMe), δ 3.82(3H, s, 3'-OMe); 2 个连氧次甲基氢信号： δ 4.82(1H, d, $J = 5.8\text{Hz}$, H-7), δ 4.35(1H, m, H-8); 1 个连氧亚甲基氢信号： δ 4.18(2H, dd, $J = 5.8, 1.4\text{Hz}$, H-9') 以及 1 个被甲氧基氢掩盖的连氧亚甲基氢信号： δ 3.81(2H, o, H-9)。

[0069] 化合物 3 的 ^{13}C NMR (100MHz, in CD_3OD) 图谱给出 20 个碳信号, 结合 DEPE-135 图谱, 显示低场区有 6 个 SP^2 杂化的季碳信号： δ 151.9(C-3'), 148.9(C-4'), 148.7(C-3), 147.0(C-4), 134.1(C-1), 133.1(C-1'), 8 个 SP^2 杂化叔碳信号： δ 131.4(C-7'), 128.5(C-8'), 121.0(C-6), 120.7(C-6'), 118.9(C-5'), 115.7(C-5), 111.9(C-2), 111.4(C-2'); 2 个连氧的次甲基碳信号： δ 86.2(C-8), 74.1(C-7), 还有 2 个连氧的亚甲基碳信号： δ 63.7(C-9'), 62.2(C-9) 以及 2 个甲氧基碳信号 δ 56.5(3-OMe), 56.3(3'-OMe)。核磁数据与文献 [10, 11] 报道的核磁数据基本一致, 化合物 3 确定为左旋赤式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚, 即 (-)-erythro-guaiacylglycerol- β -0-4'-conifery ether。核磁数据见表 2。

[0070] 2.24 化合物 4

[0071] 黄色油状 (甲醇), $[\alpha]_D^{26} 11.3^\circ$ ($c = 0.67, \text{MeOH}$)。ESI-MS 给出 m/z 387 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 363 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 提示化合物的分子量为 364。结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT-135 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 计算其不饱和度为 8。

[0072] 化合物 4 与化合物 3 在 ^1H NMR (400MHz, in CD_3OD) 低场区的图谱比较相似, 除了 1 个反式烯键耦合的氢外, 也类似的有 2 个 ABX 耦合系统： δ 7.00(1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-2), δ 6.75(1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$, H-5) 和 δ 6.84(1H, dd, $J = 8.2, 1.8\text{Hz}$, H-6); δ 6.68(1H, d, $J = 2.0\text{Hz}$, H-2'), δ 6.90(1H, d, $J = 8.2\text{Hz}$, H-5') 和 δ 6.55(1H, dd, $J = 8.3, 2.1\text{Hz}$, H-6')。

[0073] 在高场, 除了只有一个甲氧基氢信号及在最低场出现 2 个亚甲基氢信号外, 其余氢信号也与化合物 3 类似, 甲氧基氢信号： δ 3.80(3H, s, 3-OMe); 2 个亚甲基氢信号： δ 2.54(2H, t, $J = 7.4\text{Hz}$, H-7'), δ 1.77(2H, m, H-8'); 2 个连氧次甲基氢信号： δ 4.89(1H, d, $J = 6.2\text{Hz}$, H-7), δ 4.07(1H, dd, $J = 10.5, 4.8\text{Hz}$, H-8); 2 个连氧亚甲基氢信号： δ 3.72(1H, dd, $J = 11.8, 4.1\text{Hz}$, H-9' b), δ 3.47(1H, dd, $J = 11.8, 5.0\text{Hz}$, H-9' a), δ 3.53(2H, t, $J = 6.5\text{Hz}$, H-9)。

[0074] 化合物 4 的 ^{13}C NMR (100MHz, in CD_3OD) 图谱给出 19 个碳信号, 结合 DEPE-135 图谱, 可以看出与化合物 3 比较少了一个甲氧基碳信号及两个烯碳信号, 其余碳信号较类似。低场区 6 个 SP^2 杂化的季碳信号： δ 149.3(C-3'), 146.0(C-4'), 148.9(C-3), 147.3(C-4), 134.0(C-1), 138.6(C-1'), 6 个 SP^2 杂化叔碳信号： δ 120.8(C-6), 120.6(C-6'), 119.5(C-5'), 117.2(C-2'), 116.0(C-5), 111.5(C-2); 高场区有 2 个连氧的次甲基碳信号： δ 87.8(C-8), 74.2(C-7), 还有 2 个连氧的亚甲基碳信号： δ 62.3(C-9'), 61.8(C-9) 以及 1 个甲氧基碳信号 δ 56.3(3-OMe)。

[0075] 由于化合物 4 中 C-8 的化学位移值 δ 87.8(C-8) 与化合物 3 中的 δ 86.2(C-8) 相比向低场位移, 由此推断, 该化合物相对构型为反式。参照文献 [12], 确定化合物 4 为右旋苏式-1-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-[-4-(3-羟丙基)-2-羟基苯氧基]-1,3-丙二醇, 即 (+)-thero-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[-4-(3-hydroxypropanyl)-2-hydroxy-p

henoxy]-1,3-propanediol。

[0076] 核磁数据见表 2。

[0077] 2.25 化合物 5

[0078] 黄色油状(甲醇), $[\alpha]_D^{27} 11.9^\circ$ ($c = 0.67, \text{MeOH}$)。ESI-MS 给出 $m/z 399 [M+Na]^+$, $775 [2M+Na]^+$ 提示化合物的分子量为 376。结合 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 和 DEPT-135 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 计算其不饱和度为 9。

[0079] 化合物 5 的与化合物 3 的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, in CD_3OD) 图谱比较相似, 在低场区给出 8 组氢信号, 根据化学位移和耦合常数可以确定也存在两个 ABX 耦合系统和一个反式双键耦合, ABX 耦合系统为: $\delta 7.02$ (1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-2), $\delta 6.75$ (1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$, H-5) 和 $\delta 6.85$ (1H, dd, $J = 8.1, 1.8\text{Hz}$, H-6); $\delta 7.04$ (1H, d, $J = 1.9\text{Hz}$, H-2'), $\delta 6.99$ (1H, d, $J = 8.3\text{Hz}$, H-5') 和 $\delta 6.90$ (1H, dd, $J = 8.3, 1.9\text{Hz}$, H-6'), 反式双键为 $\delta 6.52$ (1H, d, $J = 16.0\text{Hz}$, H-7') 和 $\delta 6.24$ (1H, dt, $J = 16.0, 5.7\text{Hz}$, H-8'), 不过这里的 H-5 和 H-6 未重叠, 有了很好的裂分。

[0080] 在高场区有 2 个明显的甲氧基信号: $\delta 3.86$ (3H, s, 3-OMe), $\delta 3.82$ (3H, s, 3'-OMe); 2 个连氧次甲基氢信号: $\delta 4.89$ (1H, d, $J = 5.8\text{Hz}$, H-7), $\delta 4.28$ (1H, m, H-8) 和 1 个连氧亚甲基氢信号: $\delta 4.19$ (2H, dd, $J = 5.8, 1.4\text{Hz}$, H-9') 都发生了一些变化; 而被掩藏在甲氧基里的 1 个亚甲基氢信号在该化合物中向高场位移至 $\delta 3.72$ (1H, dd, $J = 11.9, 4.1\text{Hz}$, H-9b), $\delta 3.47$ (1H, dd, $J = 11.9, 5.4\text{Hz}$, H-9a)。

[0081] 化合物 5 与化合物 3 的 $^{13}\text{C NMR}$ 数据更为接近, 仅是化合物 3 中 C-8 的化学位移值 $\delta 86.2$ (C-8) 在化合物 5 中向低场位移至 $\delta 87.2$ (C-8)。根据核磁数据推测化合物 5 与 3 结构相同, 仅立体构型不同, 与文献 [11] 对比, 肯定了这种推测, 确定化合物 5 为右旋苏式愈创木基丙三醇- β -0-4'-松柏醇基醚, 即 (+)-thero-guaiacylglycerol- β -0-4'-conifery ether。核磁数据见表 2。

[0082] 表 2 化合物 3、4 和 5 的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) 和 $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CD_3OD) 数据

[0083]

Position	Compound. 3 (in CD ₃ OD)		Compound. 4 (in CD ₃ OD)		Compound. 5 (in CD ₃ OD)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	134.1		134.0		133.8	
2	111.9	1H, 7.01(d), $J=1.8$	111.5	1H, 7.00 (d), $J=1.8$ Hz	111.8	1H, 7.02(d), $J=1.8$
3	148.7		148.9		148.8	
4	147.0		147.3		147.2	
5	115.7	1H, 6.72(d), $J=8.1$	116.0	1H, 6.75 (d), $J=8.1$ Hz	115.9	1H, 6.75(d), $J=8.1$
6	121.0	1H, 6.83(dd), $J=8.2, 1.8$	120.8	1H, 6.84 (dd), $J=8.2, 1.8$ Hz	120.8	1H, 6.85(dd), $J=8.1, 1.8$
7	74.1	1H, 4.82(d), $J=5.8$	74.2	1H, 4.89(d), $J=6.2$ Hz	74.1	1H, 4.89(d), $J=5.8$
8	86.2	1H, 4.35(m),	87.8	1H, 4.07(dd), $J=10.5, 4.8$	87.2	1H, 4.28(m)
9	62.2	2H, 3.81(o)	61.8	1H, 3.72 (dd), $J=11.8, 4.1$ Hz	62.0	1H, 3.72(dd), $J=11.9, 4.1$
				1H, 3.47 (dd), $J=11.8, 5.0$ Hz		1H, 3.47(dd), $J=11.9, 5.4$
1'	133.1		138.6		133.2	
2'	111.4	1H, 6.98(s)	117.2	1H, 6.68(d), $J=2.0$ Hz	111.4	1H, 7.04(d), $J=1.9$
3'	151.9		149.3		151.8	
4'	148.9		146.0		149.3	
5'	118.9	1H, 6.86(s)	119.5	1H, 6.90(d), $J=8.2$ Hz	119.0	1H, 6.99(d), $J=8.3$
6'	120.7	1H, 6.86(s),	120.6	1H, 6.55(dd), $J=8.2, 2.1$ Hz	120.8	1H, 6.90(dd), $J=8.3, 1.9$
7'	131.4	1H, 6.50(d), $J=16.0$	32.5	2H, 2.54(t), $J=7.4$ Hz	131.4	1H, 6.52(d), $J=16$
8'	128.5	1H, 6.22(dt), $J=15.8, 5.8$	35.5	2H, 1.77(m)	128.7	1H, 6.24(dt), $J=16, 5.7$
9'	63.7	2H, 4.18(d), $J=5.8, 1.4$	62.3	2H, 3.53(t), $J=6.5$ Hz	63.7	2H, 4.19(dd), $J=5.8, 1.4$
3-OMe	56.5	3H, 3.79(s)	56.3	3H, 3.80(s)	56.6	3H, 3.86(s)
3'-OMe	56.3	3H, 3.79(s)			56.4	3H, 3.82(s)

[0084] 2.26 化合物 6

[0085] 黄色油状, $[\alpha]_D^{26} 10.4^\circ$ ($c = 0.67, \text{MeOH}$)。结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT-135 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$, 计算其不饱和度为 10。

[0086] 在化合物 6 的 ^1H NMR (400MHz, in CD_3OD) 图谱上, 低场显示 8 组氢信号。根据化学位移值和耦合常数推断含 1 个 ABX 耦合系统、1 个四取代的苯环及 1 个反式双键耦合。ABX

耦合系统： δ 6.94(1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-2), δ 6.81(1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$, H-5) 和 δ 6.82(1H, dd, $J = 8.1, 1.8\text{Hz}$, H-6); 四取代苯环： δ 6.95(1H, s, H-2'), δ 6.93(1H, s, H-6'); 反式双键耦合： δ 6.53(1H, d, $J = 15.9\text{Hz}$, H-7'), δ 6.21(1H, dt, $J = 15.8, 5.9\text{Hz}$, H-8')。

[0087] 在 ^1H NMR 图谱的高场区, 可以看到两个明显的甲氧基信号： δ 3.86(3H, s, 3-OMe), δ 3.80(3H, s, 3'-OMe); 2 个次甲基氢信号： δ 5.51(1H, d, $J = 6.3\text{Hz}$, H-7), δ 3.48(1H, dd, $J = 12.3, 6.2\text{Hz}$, H-8); 1 个连氧亚甲基氢信号： δ 4.19(2H, dd, $J = 5.9, 1.3\text{Hz}$, H-9') 以及 1 个被甲氧基氢掩盖的连氧亚甲基氢信号： δ 3.73-3.85(2H, o, H-9)。

[0088] 化合物 6 的 ^{13}C NMR(100MHz, in CD_3OD) 图谱给出 20 个碳信号, 结合 DEPE-135 图谱, 显示低场区有 7 个 SP² 杂化的季碳信号： δ 149.2(C-4'), δ 145.5(C-3'), 149.1(C-3)、147.6(C-4)、134.5(C-1)、132.5(C-5'), 130.3(C-1'), 7 个 SP² 杂化叔碳信号： δ 132.0(C-7'), 127.5(C-8'), 119.8(C-6)、116.5(C-6'), 116.2(C-5)、112.1(C-2'), 110.5(C-2); 1 个连氧的次甲基碳信号：1 个次甲基碳信号 δ 55.1(C-8); 2 个连氧的亚甲基碳信号： δ 64.8(C-9)、63.9(C-9') 以及 2 个甲氧基碳信号 δ 56.7(3-OMe)、56.4(3'-OMe)。核磁数据与文献 [13] 报道的核磁数据基本一致, 化合物 6 确定为去氢二松柏醇, 即 dehydrodiconiferylalcohol。核磁数据见表 3。

[0089] 2.27 化合物 7

[0090] 黄色油状, $[\alpha]_D^{26} 17.3^\circ$ ($c = 0.67$, MeOH)。ESI-MS 给出 m/z 383[M+Na]⁺, 359[M-H]⁻ 提示化合物的分子量为 360。结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT-135 确定化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$, 计算其不饱和度为 9。

[0091] 化合物 7 的 ^1H NMR(400MHz, in CD_3OD) 图谱, 在低场区显示一个典型的 ABX 耦合系统和一个积分值为 2 的单峰, ABX 耦合系统： δ 6.94(1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-2), δ 6.83(1H, dd, $J = 8.2, 1.7\text{Hz}$, H-6) 和 δ 6.75(1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$, H-5); 单峰： δ 6.71(1H, s, H-2'), δ 6.71(1H, s, H-6')。

[0092] 在 ^1H NMR 图谱的高场区, 可以看到两个明显的甲氧基氢信号： δ 3.80(3H, s, 3-OMe), δ 3.84(3H, s, 3'-OMe); 此外还有 1 个连氧亚甲基氢信号： δ 3.56(2H, t, $J = 6.5\text{Hz}$, H-9'); 2 个亚甲基信号： δ 2.60(2H, t, $J = 8.0\text{Hz}$, H-7'), δ 1.80(2H, m, H-8'); 2 个次甲基氢信号： δ 5.48(1H, d, $J = 6.2\text{Hz}$, H-7), δ 3.46(1H, dd, $J = 12.4, 6.2\text{Hz}$, H-8) 以及 2 个单氢信号： δ 3.82(1H, m), δ 3.76(1H, m)。

[0093] 化合物 7 的 ^{13}C NMR(100MHz, in CD_3OD) 图谱与化合物 6 较相似, 除了在低场区少了两个烯碳而在高场区增加了两个仲碳外, 其余较接近, 由此推断化合物 7 是化合物 6 双键氢化后的衍生物。核磁数据与文献 [10, 14] 基本一致, 该化合物确定为二氢去氢二松柏醇, 即 dihydrodehydrodiconiferyl alcohol。核磁数据见表 3。

[0094] 表 3 化合物 6 和 7 的 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C NMR(100MHz, CD_3OD) 数据

[0095]

Position	Compound 6 (in CD ₃ OD)		Compound 7 (in CD ₃ OD)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	134.5		134.8	
2	110.5	1H, 6.94(d), $J=1.8$	110.6	1H, 6.94(d), $J=1.8$
3	149.1		149.1	
4	147.6		147.5	
5	116.2	1H, 6.81(d), $J=8.1$	116.2	1H, 6.75(d), $J=8.1$
6	119.8	1H, 6.82(dd), $J=8.1, 1.8$	119.7	1H, 6.83(dd), $J=8.2, 1.7$
7	89.3	1H, 5.51(d), $J=6.3$	89.0	1H, 5.48(d), $J=6.2\text{Hz}$
8	55.1	1H, 3.48(br dd), $J=12.3, 6.2$	55.4	1H, 3.46(dd), $J=12.4, 6.2$
9	64.8	2H, 3.73-3.85(m)	65.0	1Ha, 3.82(m) 1Hb, 3.76(m)
1'	130.3		136.9	
2'	112.1	1H, 6.95(s)	117.9	1H, 6.71(s)
3'	145.5		145.2	
4'	149.2		147.6	
5'	132.5		129.9	
6'	116.5	1H, 6.93(s)	114.2	1H, 6.71(s)
7'	132	1H, 6.53(d), $J=15.9$	32.9	2H, 2.60(t), $J=8.0$
8'	127.5	1H, 6.21(dt), $J=15.8, 5.9$	35.8	2H, 1.80(m)
9'	63.9	2H, 4.19(dd), $J=5.9, 1.3$	62.2	2H, 3.56(t), $J=6.5$
3-OMe	56.7	3H, 3.86(s)	56.4	3H, 3.80(s)
3'-OMe	56.4	3H, 3.80(s)	56.8	3H, 3.84(s)

[0096] 实施例 3 : 指纹图谱的建立及各化合物的指认

[0097] 3.1 指纹图谱的建立

[0098] 取上述接骨木 50%乙醇洗脱部分 40mg, 溶解于 2mL 60%甲醇-水后过 ODS 固相萃取柱, 10mL 甲醇洗脱, 洗脱液蒸干后, 溶于 2mL 甲醇, 再过 0.45 μ m 滤膜, 即得接骨木活性部位的供试品溶液。

[0099] 精密取上述供试品溶液 10 μ L, 参照国家药典附录中规定的高效液相分析方法, 注入高效液相色谱仪进行色谱分析, 记录色谱图 (见图 1)。液相色谱条件为: 采用十八烷基硅氧键合硅胶为固定相; 以含有 0.1% 醋酸的甲醇-水溶液作为流动相, 梯度洗脱; 流速为 0.8mL/min; 检测波长为 280nm; 色谱柱温度为 35 $^{\circ}$ C。获得的接骨木活性部位高效液相标准指纹图谱有 10 个色谱峰, 以 9 号峰的色谱保留时间为 1.00 计算得到的各色谱峰的相对保留时间, 分别为 0.40 \pm 0.02 (峰 1)、0.55 \pm 0.02 (峰 2)、0.67 \pm 0.02 (峰 3)、0.69 \pm 0.02 (峰 4)、0.71 \pm 0.02 (峰 5)、0.73 \pm 0.02 (峰 6)、0.86 \pm 0.02 (峰 7)、0.93 \pm 0.02 (峰 8)、1.00 (峰 9)、1.02 \pm 0.02 (峰 10)。以去氢二松柏醇 (9 号峰) 计算, 理论塔板数不低于 2000。

[0100] 3.2 各化合物的色谱峰指认

[0101] 各化合物适量分别溶于甲醇中, 过 0.45 μ m 的滤膜后, 制得供试品溶液。参照国家药典附录中规定得高校液相分析方法, 依次注入高效液相色谱仪进行色谱分析, 分别记录色谱图 (见图 3、图 4、图 5、图 6、图 7、图 8、图 9), 色谱条件与实施例 3.1 相同。从而, 借助分离得到的化合物 1-7 作为对照品, 完成了对 HPLC 特征图谱中主要色谱峰的化学指认。

[0102] 实施例 4: 实施例 1 制得的接骨木总提物及总提物的各洗脱馏分对体外培养的人类成骨 UMR 106 细胞的影响

[0103] 以大鼠成骨样 UMR 106 细胞的增殖和 ALP 活性, 评价实施例 1 中得到化合物的体外抗骨质疏松活性。

[0104] 4.1 实验样品

[0105] 取实施例 1 制得的馏分, 即指实施例 1 制得的接骨木总提物、接骨木总提物水洗脱部分、30%乙醇洗脱部分、50%乙醇洗脱部分及 95%乙醇洗脱部分。

[0106] 4.2 实验方法

[0107] UMR 106 细胞经胰蛋白酶消化分散后, 以 5000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}$ C、湿度 95%、含 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。在 10% FBS (胎牛血清)-DMEM 培养液中培养 2 天后, 用 1% Charcoal Stripped FBS (活性炭处理去除激素的胎牛血清)-Phenol red-free DMEM (去除酚红的 DMEM) 再培养 1 天。将实施例 1 中所述的馏分以 Phenol red-free DMEM 稀释成不同浓度 (0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、10 μ g/mL、100 μ g/mL) 加入到 96 孔板中, 每个浓度 4 个复孔, 再培养 24 或 48 小时。17 β -雌二醇 (E2, 10nM) 为阳性对照组, 无样品加入的细胞为正常组。

[0108] 4.3 细胞增殖活性检测

[0109] 细胞检测: 细胞在药物的作用下培养 24 或 48 小时后, 去除培养液, PBS 清洗后, 加入 MTS/PMS 试剂培养 3 小时, 于 490nm 处测定吸光度值, 以吸光度值来评价细胞的增殖情况。实验结果经单因素方差分析, 表示为: mean \pm S. E. M.。

[0110] 实验结果: 见表 4。

[0111] 表 4 各馏分对 UMR 106 细胞增殖的影响

[0112]

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	UMR 106 细胞增殖率 (%)		E2 (10 nM)	
		24 hours	48 hours	24 hours	48 hours
接骨木总提取物	0.1	101.90 \pm 0.72	101.87 \pm 0.75		
	1	110.17 \pm 0.85***	110.55 \pm 0.60***		
	10	99.37 \pm 0.47	102.40 \pm 0.67	110.41 \pm 0.83***	106.44 \pm 0.95**
	100	96.92 \pm 0.69	103.00 \pm 1.65		
水洗脱部分	0.1	120.66 \pm 0.81***	124.44 \pm 1.69***	120.55 \pm 0.59***	128.60 \pm 4.38**
	1	122.49 \pm 1.17***	118.90 \pm 0.85***		
	10	113.58 \pm 0.85***	114.77 \pm 0.70***		
	100	111.30 \pm 0.75**	103.90 \pm 0.65**		
30% 乙醇洗脱部分	0.1	108.21 \pm 1.03	106.61 \pm 1.60		
	1	103.65 \pm 1.01	109.53 \pm 1.29	120.55 \pm 0.59**	128.60 \pm 4.38***
	10	117.58 \pm 2.56**	127.30 \pm 2.50***		
	100	121.58 \pm 0.66***	138.57 \pm 4.12***		
50% 乙醇洗脱部分	0.1	125.68 \pm 2.46***	155.23 \pm 2.33***	120.54 \pm 0.51***	128.60 \pm 4.38***
	1	114.73 \pm 0.15***	152.48 \pm 2.55***		
	10	118.61 \pm 0.69***	142.02 \pm 2.14***		
	100	92.69 \pm 0.19	118.35 \pm 3.06***		
95% 乙醇洗脱部分	0.1	97.11 \pm 0.44	105.09 \pm 1.49	120.55 \pm 0.59***	128.60 \pm 4.38***
	1	100.76 \pm 0.62	95.88 \pm 1.03		
	10	97.56 \pm 0.35	94.91 \pm 1.58		
	100	44.86 \pm 0.76***	42.04 \pm 0.72***		

[0113] 注:与正常组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

[0114] 结论:与正常组比较,接骨木总提取物在 $1 \mu\text{g/mL}$ 时对细胞的增殖有显著性的差异,而水洗脱部分及 50%乙醇洗脱部分在 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 即较正常组有十分显著的差异,且 50%乙醇洗脱部分表现出更强的促进细胞增殖的活性,提示总提取物中的活性成分大多被富集到 50%乙醇洗脱部分。

[0115] 4.4 细胞 ALP 活性检测

[0116] ALP 活性检测 :ALP(alkaline phosphatase),碱性磷酸酶,成骨细胞分化的一种酶,也是参与骨代谢的重要蛋白质,通过分解磷酸酯,增加局部无机磷的浓度,从而促进骨基质的钙化 [15]。细胞在药物作用下培养 24 小时后,去除培养液,PBS 清洗两次,3 个复孔各加入 20 μ L 裂解液,5 个复孔加入 100 μ L ALP 试剂 (4-NPP),96 孔板置于培养箱中培养 15、30、45 分钟,405nm 测定 ALP 吸收值,595nm 测定蛋白的吸收值。ALP 活性以单位蛋白碱性磷酸酶活性的变化率来表示。实验结果经单因素方差分析,表示为 :mean \pm S. E. M. 。

[0117] 实验结果 :见表 5。

[0118] 表 5 各馏分对 UMR 106 细胞 ALP 活性的影响

[0119]

组别	浓度 (μ g/mL)	UMR 106 细胞 ALP 活性 (%)	E2 (10 nM)
接骨木总提物	0.1	103.97 \pm 0.73*	
	1	99.19 \pm 0.77	
	10	97.46 \pm 0.88	105.88 \pm 1.02***
	100	92.27 \pm 0.91***	
水洗脱部分	0.1	102.50 \pm 2.26	
	1	102.12 \pm 1.17	
	10	113.58 \pm 0.85	118.03 \pm 1.96***
	100	111.30 \pm 0.75	
30% 乙醇洗脱部分	0.1	107.65 \pm 1.961**	
	1	101.90 \pm 0.73	
	10	100.97 \pm 1.13	109.76 \pm 1.18***
	100	102.16 \pm 1.08	
50% 乙醇洗脱部分	0.1	115.13 \pm 0.13***	107.11 \pm 0.12***
	1	123.51 \pm 0.07***	
	10	114.39 \pm 0.14***	
	100	115.41 \pm 0.18***	

[0120]

95% 乙醇洗脱部分	0.1	96.28 ± 1.45	117.34 ± 1.69***
	1	101.29 ± 0.61	
	10	106.16 ± 0.80*	
	100	83.00 ± 1.24***	

[0121] 注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0122] 结论:从实验结果可以看出,与正常组比较,接骨木总提物在 0.1 μg/mL 表现出显著性差异,而 30%乙醇洗脱部分及 50%乙醇洗脱部分在该浓度可以极其显著的促进细胞的分化,且 50%较 30%乙醇洗脱部分的活性更强。

[0123] 综合体外实验结果可以看出,无论对细胞的增殖还是 ALP 活性,50%乙醇洗脱部分都表现出最强的活性。

[0124] 实施例 5:接骨木总提物及总提物的各洗脱馏分对去卵巢骨质疏松模型小鼠的影响

[0125] 5.1 实验样品及试剂

[0126] 实施例 1 制得的各馏分,即指实施例 1 制得的接骨木总提物、接骨木总提物水洗脱部分、30%乙醇洗脱部分以及 50%部分(由 50%及 95%乙醇洗脱部分合并而成)。17β-雌二醇(Sigma, USA)

[0127] 5.2 实验动物

[0128] 清洁级 C57BL/6J 小鼠,雌性,3 月龄,购自于香港中文大学实验动物中心。

[0129] 5.3 实验方法

[0130] 分组及给药:小鼠乙醚麻醉后俯位固定,在背部脊柱处切口,于无菌条件下摘除双侧卵巢作为骨质疏松症模型小鼠,假手术组背部脊柱两侧切口后再缝合作为对照。手术后恢复两周,存活下来健康的小鼠 55 只,随机分为 7 组,分别灌胃给予以下药物。小鼠每天给予双蒸水和去除雌激素的鼠粮(AIN93M)。

[0131] 假手术组(Sham, n = 8) 0.1%乙醇水 10mL/Kg 体重/d

[0132] 病理模型组(OVX, n = 8) 0.1%乙醇水 10mL/Kg 体重/d

[0133] 阳性对照组(OVX+E2, n = 8) 17β-雌二醇 3.2mg/Kg 体重/d

[0134] 受试药组

[0135] 接骨木总提物(OVX+SWT, n = 7):1g/Kg 体重/d

[0136] 水洗脱部分(OVX+SWA, n = 8):570mg/Kg 体重/d

[0137] 30%乙醇洗脱部分(OVX+SWB, n = 8):128mg/Kg 体重/d

[0138] 50%+95%乙醇洗脱部分(OVX+SWC, n = 8):189mg/Kg 体重/d

[0139] 5.4 对小鼠子宫重量的影响

[0140] 连续灌胃给药三个月后,小鼠乙醚麻醉,腹主动脉取血后,摘出子宫,迅速称重,计算子宫脏器系数。实验结果经单因素方差分析,表示为:mean ± S. E. M.。

[0141] 实验结果:见表 6 及附图 10。

[0142] 表 6 各馏分对小鼠子宫系数的影响

[0143]

组别	子宫系数 (子宫重量/体重)
Sham	1.17 ± 0.11***
OVX	0.48 ± 0.02
E ₂	6.06 ± 0.24****
SWT	1.11 ± 0.18
SWA	0.96 ± 0.14
SWB	0.78 ± 0.07
SWC	0.94 ± 0.12

[0144] 注:与模型组比较,***P < 0.001

[0145] 结论:小鼠去卵巢后,病理模型 OVX 组与假手术 Sham 组比较,子宫系数显著下降,表明造模成功。与 OVX 组比较,雌激素组使子宫指数急剧的增加,可以看出雌激素的副作用非常显著。与 OVX 组比较接骨木各馏分子宫系数与模型组无差异,说明接骨木各馏分无雌激素样副作用。

[0146] 5.5 骨密度及骨容积的测定

[0147] 小鼠乙醚麻醉,腹主动脉取血后,取出小鼠左侧的股骨和胫骨,剔除肌肉和软骨,用浸润了 PBS 的纱布包好,采用 Micro-CT 技术测定股骨远端和胫骨近端的骨密度及形态计量学参数骨容积 (BV/TV)。实验结果经 T 检验分析,表示为 :mean ± S. E. M. 。

[0148] 实验结果,见表 7、图 11 及图 12:

[0149] 表 7 各馏分对小鼠股骨及胫骨骨密度及骨容积的影响

[0150]

组别	股骨		胫骨	
	骨密度 (mg/ccm)	骨容积 (BV/TV)	骨密度 (mg/ccm)	骨容积 (BV/TV)
Sham	119.20 ± 16.00*	0.043 ± 0.008*	119.81 ± 16.71*	0.039 ± 0.001*
OVX	69.35 ± 3.66	0.018 ± 0.004	57.23 ± 5.98	0.023 ± 0.003
E ₂	168.24 ± 11.85***	0.074 ± 0.006***	176.72 ± 9.34***	0.071 ± 0.006***
SWT	117.50 ± 6.14***	0.041 ± 0.006*	123.10 ± 6.62***	0.045 ± 0.004**
SWA	105.79 ± 2.68***	0.037 ± 0.003**	102.76 ± 6.39*	0.037 ± 0.002*
SWB	86.59 ± 8.78	0.029 ± 0.002	81.71 ± 8.75	0.035 ± 0.002
SWC	124.00 ± 10.63**	0.043 ± 0.004**	113.17 ± 5.94***	0.046 ± 0.003**

[0151] 注:与模型组比较,*P < 0.05,**P < 0.01,***P < 0.001

[0152] 结论:Micro-CT 扫描结果表明,模型组大鼠股骨及胫骨骨密度与假手术 Sham 组比较明显降低。与 OVX 组比较,SWT(接骨木乙醇总提物)、SWA(水洗脱部分)及 SWC(50%+95%乙醇洗脱部分)可以显著的促进股骨及胫骨的骨密度,同时可以显著的增加骨容积。其中 SWC 的作用,接近或强于 SWT。

[0153] 实施例 6:接骨木活性部位相关制剂的制备

[0154] 6.1 接骨木活性部位片剂的制备

[0155] 处方:接骨木活性部位(50%乙醇洗脱部分),20 克;可压性淀粉,20 克;50%糖浆,适量;硬脂酸镁,1%。

[0156] 制备方法:将接骨木 50%乙醇洗脱部分在 60℃-80℃烘箱中烘干,磨成细粉过 80 目筛,加 50%糖浆制成合适软材,用 16 目筛网制粒,60℃干燥,整粒(16 目),加入硬脂酸镁混合均匀,压片,即得。

[0157] 6.2 接骨木活性部位胶囊剂的制备

[0158] 处方:接骨木活性部位(50%乙醇洗脱部分),45 克;淀粉,2 克;微晶纤维素,3 克;75%乙醇,适量。

[0159] 制备方法:将接骨木 50%乙醇洗脱部分在 60℃-80℃烘箱中烘干,粉碎成细粉过 80 目筛,60℃干燥。按比例加入药粉、微晶纤维素、打糊后的淀粉及 75%乙醇适量,制成合适软材,40 目筛网制粒,70℃烘干,整粒,60 目筛去细粉,灌装胶囊,即得。

[0160] 6.3 接骨木活性部位口服液的制备

[0161] 处方:接骨木活性部位(50%乙醇洗脱部分),100 克;甜菊晶,10 克;苯甲酸,1 克;尼泊金乙酯,0.3 克;1%甲壳素稀醋酸溶液,适量。

[0162] 制备方法:取接骨木 50%乙醇洗脱部分,溶解于适量 60%乙醇中,搅拌均匀,静置于 2℃-8℃冷库沉淀 48 小时,过滤,滤液回收乙醇,至无醇味,加入适量水及处方剂量的甜菊晶、苯甲酸、尼泊金乙酯,搅拌均匀,再加入 1%的甲壳素稀醋酸溶液适量,过滤,分装,压盖,100℃流通蒸汽灭菌 30 分钟,即得。

[0163] 6.4 接骨木复方药酒的制备

[0164] 药物组成:接骨木活性部位 10 克,淫羊藿 10 克,仙茅 10 克,女贞子 8 克,熟地 8 克,当归 8 克,泽泻 8 克,茯苓 8 克,白酒适量(50 度以上)。

[0165] 制备方法:将接骨木 50%乙醇洗脱部分在 60℃-80℃烘箱中烘干,粉碎成细粉;将药材仙茅、熟地、当归、泽泻、茯苓切成 3 毫米薄的药片;淫羊藿切成 2~3 厘米的段;女贞子粉碎。处理后的药材按处方配比装入布袋,置于酒坛内,加入 8~12 倍白酒,密封,于常温下浸泡 15~25 天,即得。

[0166] 6.5 接骨木牦牛骨髓骨粉的制备

[0167] 药物组成:接骨木活性部位(50%乙醇洗脱部分),牦牛骨粉,香菇,杏仁,薏米,黄豆。

[0168] 制备方法:将接骨木 50%乙醇洗脱部分在 60℃-80℃烘箱中烘干,粉碎成细粉过 80 目筛。香菇、杏仁、薏米、黄豆均干燥后粉碎过 80 目筛。接骨木 50%乙醇洗脱部分、牦牛骨粉、香菇、杏仁、薏米、黄豆按 1:2:1:2:3:3 混合均匀,即得。

[0169] 实施例 7:接骨木活性部位制剂对骨质疏松模型小鼠骨的影响

[0170] 7.1 动物实验方法

[0171] 动物实验方法,同实施例 5。

[0172] 组别如下:

[0173]	假手术组	双蒸水	10mL/Kg 体重/d
[0174]	病理模型组	空白片剂	10mL/Kg 体重/d
[0175]	片剂处方组	接骨木活性部位片剂	300mg/Kg 体重/d
[0176]	胶囊剂处方组	接骨木活性部位胶囊剂	300mg/Kg 体重/d
[0177]	口服液处方组	接骨木活性部位口服液	15ml/Kg 体重/d
[0178]	药酒处方组	接骨木活性部位酒剂	15ml/Kg 体重/d
[0179]	牦牛骨髓骨粉处方组	接骨木牦牛骨髓骨粉	300mg/Kg 体重/d

[0180] 7.2 实验样品

[0181] 片剂:分别取空白片剂及接骨木活性部位片剂,研磨、混悬于双蒸水中,灌胃给药。

[0182] 胶囊剂:分别取空白胶囊剂及接骨木活性部位胶囊剂,取出内容物,混悬于双蒸水中,灌胃给药。

[0183] 口服液:取出口服液用双蒸水配成适宜的浓度,灌胃给药。

[0184] 药酒:按照剂量灌胃给药。

[0185] 牦牛骨髓骨粉:取出适量的接骨木牦牛骨髓骨粉,沸水调成糊状,灌胃给药。

[0186] 7.3 实验结果

[0187] 实验结果,见表 8。

[0188] 表 8 灌胃给予接骨木活性部位各种制剂对小鼠骨密度的影响

[0189]

组别	动物数 (n)	股骨骨密度 (mg/ccm)	胫骨骨密度 (mg/ccm)
假手术组	10	115.35 ± 4.69	116.13 ± 3.87
病理模型组	10	55.89 ± 5.12	54.28 ± 6.27
片剂组	10	97.89 ± 3.92***	93.08 ± 5.47***
胶囊剂组	10	120.39 ± 6.45***	118.13 ± 5.68***
口服液组	10	83.91 ± 8.02**	80.08 ± 5.47**
药酒组	10	75.69 ± 8.30	73.48 ± 6.17
骨髓骨粉组	10	64.27 ± 5.08	60.38 ± 4.15

[0190] 注：与模型组比较，**P < 0.01，***P < 0.001

[0191] 7.4 结论

[0192] 实验结果显示，与模型组比较，实施例 6 制得的接骨木活性部位片剂、胶囊剂及口服液，均能显著改善由于去卵巢所引起的小鼠股骨及胫骨骨量的流失，可以作为治疗骨量流失相关疾病的药物使用。同时结果显示，胶囊剂对骨的保护作用最好，其次是片剂，再次是口服液。接骨木活性部位药酒组与骨髓骨粉组对骨的作用虽然没有统计学意义，却表现出抑制骨量流失的趋势，可以作为预防骨质疏松的保健品应用。

[0193] 实施例 8：接骨木活性部位及其制剂主要活性成分的含量测定

[0194] 取接骨木活性部位片剂 20 片，研磨后称取 40mg，溶解于 2mL 60% 甲醇 - 水后过 ODS 固相萃取柱，10mL 甲醇洗脱，洗脱液蒸干后，溶于 2mL 甲醇，再过 0.45 μm 滤膜，即得接骨木活性部位片剂的供试品溶液。

[0195] 分别取接骨木胶囊内容物和牦牛骨髓骨粉各 40mg，用与上述相同的方法制得接骨木胶囊剂和牦牛骨髓骨粉的供试品溶液。

[0196] 分别取接骨木口服液和药酒各 4mL，蒸干后，溶解于 2mL 60% 甲醇 - 水，用与上述相同的方法制得接骨木口服液与酒剂的供试品溶液。

[0197] 采用实施例 3.1 中所述液相条件进行液相分析。参照 2005 版药典附录中高效液相法项下含量测定中的面积归依化法计算各化合物的含量，含量测定结果如下：

[0198] 表 9 接骨木活性部位及其制剂中各活性成分的含量

[0199]

化合物	活性部位 (%)	片剂 (%)	胶囊剂 (%)	口服液 (%)	酒剂 (%)	牦牛骨髓骨粉 (%)	含量范围 (%)
1	2.90	3.10	3.74	2.64	1.04	0.54	0.5-5.0
2	3.23	5.43	7.82	3.02	1.38	0.73	0.5-10.0
3	7.15	8.36	10.21	7.03	2.96	1.42	1.0-15.0

4	7.36	8.71	10.44	7.27	3.05	1.55	1.0-15.0
5	7.56	10.98	11.37	7.45	3.11	1.62	1.0-15.0
6	15.80	17.49	19.05	15.58	7.37	2.37	2.0-20.0
7	13.63	16.28	17.46	13.43	6.53	2.16	2.0-20.0

[0200] 目前几乎没有市售的疗效好、副作用小且价格相对较低的用于治疗绝经后骨相关性疾病的药物,本发明提供了一种接骨木活性部位提取物,结合体内和体外实验证明了该活性部位对子宫无副作用且对骨有很好的保护作用,同时应用该活性部位制备了多种剂型,为充分的开发、研制绝经后骨保护作用的药物及保健品提供了依据。

[0201] 【参考文献】

[0202] [1]Consensus Development Conference.Prophylxis and treatment of osteoporosis[J]Am J Med,1991,90 :107-110

[0203] [2]Health ageing practical pointers on keeping well.World Health OrganizationRegional Office for the western pacific.2005

[0204] [3] 田秦杰. 妇女绝经后相关问题的处理. 临床药理学杂志. 2004,2(3) :47-50.

[0205] [4] 杨闻,杨述华. 骨质疏松症的病因与骨折发病率调查研究. 中国中医骨伤科杂志. 2003,11(2) :49-51

[0206] [5]Maarit Piirtola, Tero Vahlberg, **Minna Loippo**nen, et al.Fractures as predictors of excess mortality in the aged-A population-based study with a 12-year follow-up. Eur J Epidemiol. 2008,23 :747-755

[0207] [6]George Ioannidis, Alexandra Papaioannou, Wilma M. Hopman, et al.Relation between fractures and mortality:results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. CMAJ. 2009,181(5) :265-271

[0208] [7] 赵燕玲,潘子昂,王石麟等. 中国原发性骨质疏松症流行病学. 中国骨质疏松杂志. 1998,4(1) :1-5

[0209] [8] 接骨木百科. <http://baike.baidu.com/view/192551.htm>

[0210] [9] 徐志红,刘星楷,徐光升. 蛇葡萄根化学成分的研究. 中国中药杂志. 1995,20(8) :484-512

[0211] [10] 杨序娟. 接骨木中抗骨质疏松活性成分的研究. 中国博士学位论文全文数据库. 2005

[0212] [11]Takeshi Katayama • Yuki Kado. Formation of optically active neolignans from chiral coniferyl alcohol by cell-free extracts of *Eucommia ulmoides*. The Japan Wood Research Society. 1998. 44 :244-246

[0213] [12]Cutillo, Francesca ;D'Abrosca, Brigida ;DellaGreca, Marina ;Fiorentino, Antonio ;Zarrelli, Armando. Lignans and neolignans from *Brassica fruticulosa*: effect on seed germination and plant growth. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2003), 51(21), 6165-6172.

[0214] [13] 韩美华,杨秀伟,钟国跃,张明. 鲜半夏中抑制肿瘤坏死因子- α 产生的活性成分. 中国中药杂志. 2007,32(17):1755-1759

[0215] [14] Chin, Young-Won ;Chai, Hee-Byung ;Keller, William J. ;Kinghorn, A. Douglas. Lignans and Other Constituents of the Fruits of Euterpe oleracea (Acai) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2008), 56(17), 7759-7764.

[0216] [15] 薛延. 骨质疏松症的生化诊断. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1):58-62.

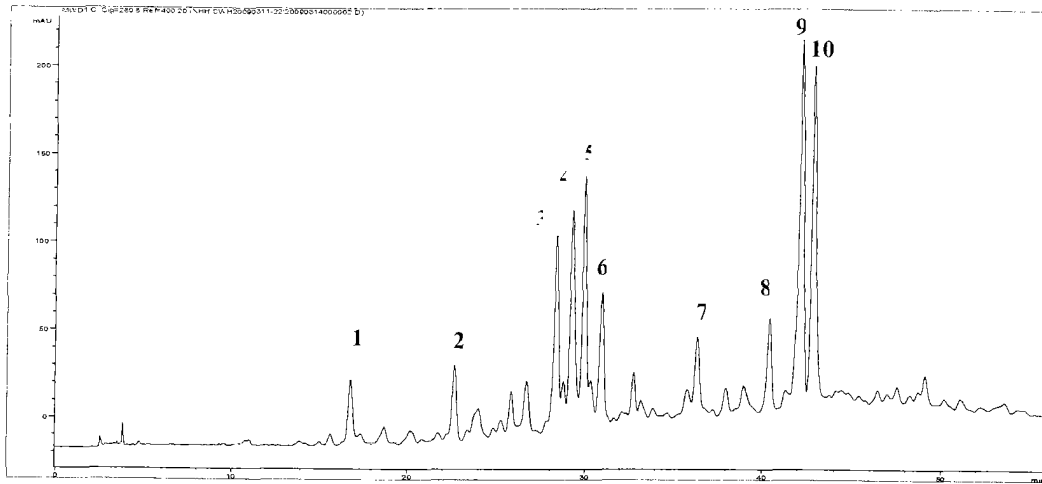


图 1

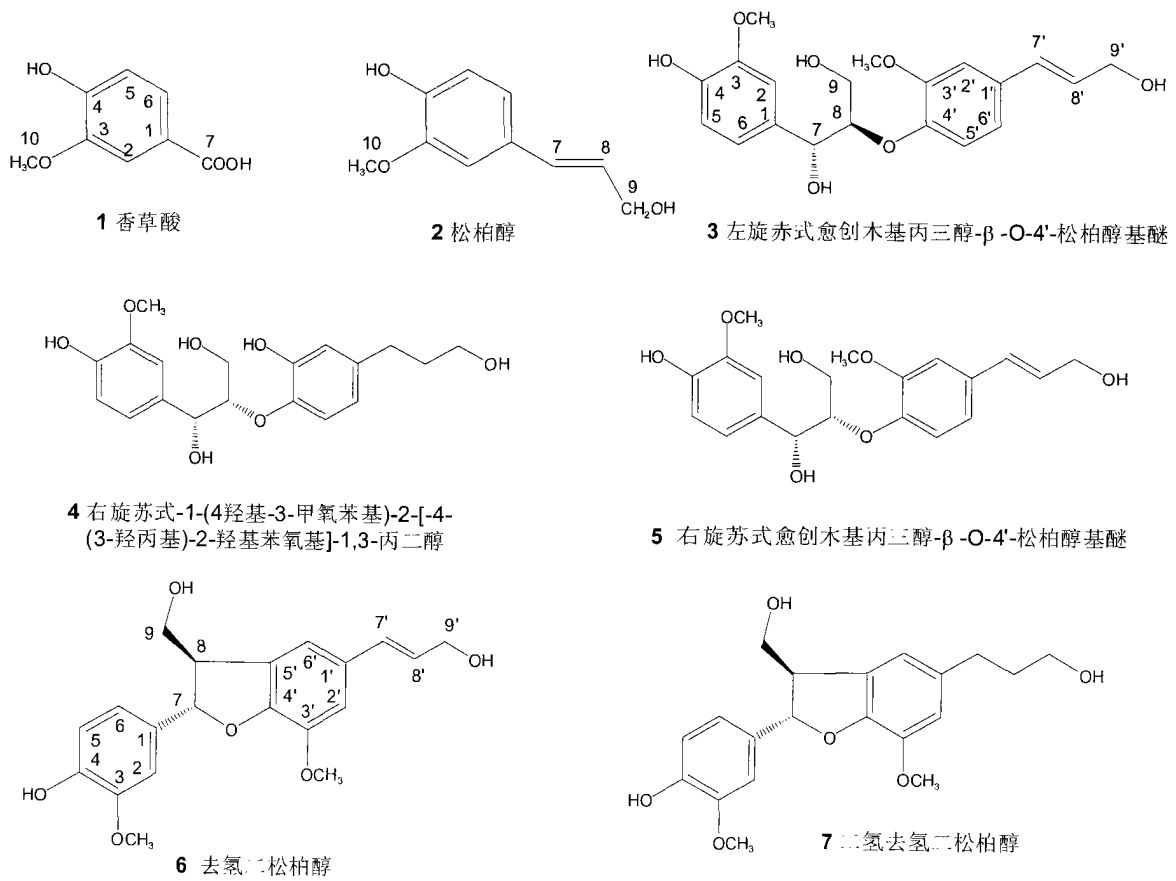


图 2

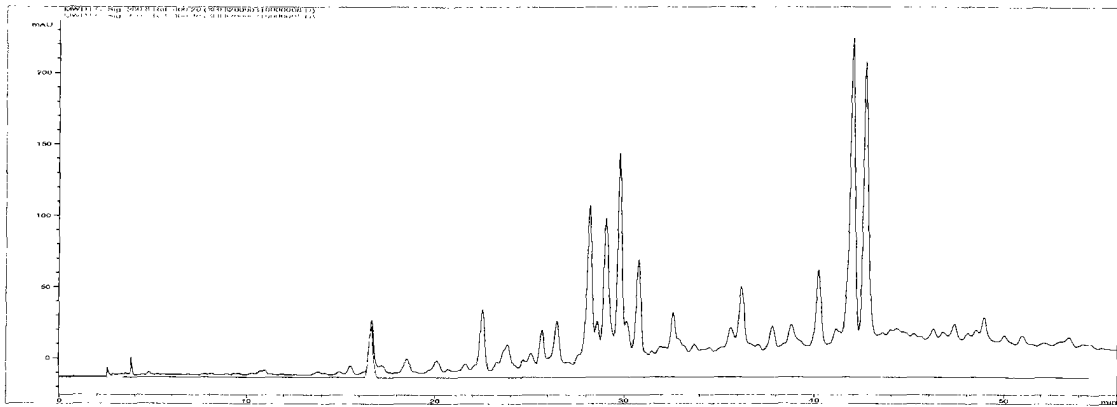


图 3

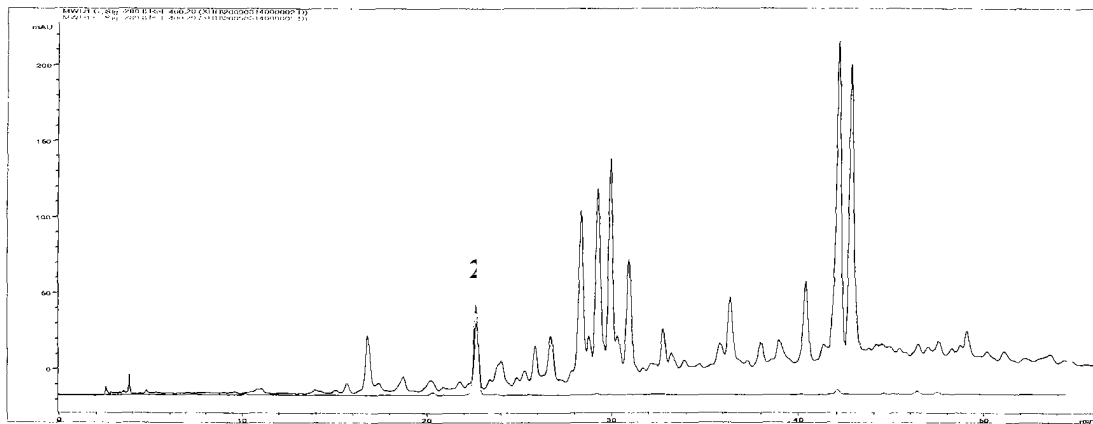


图 4

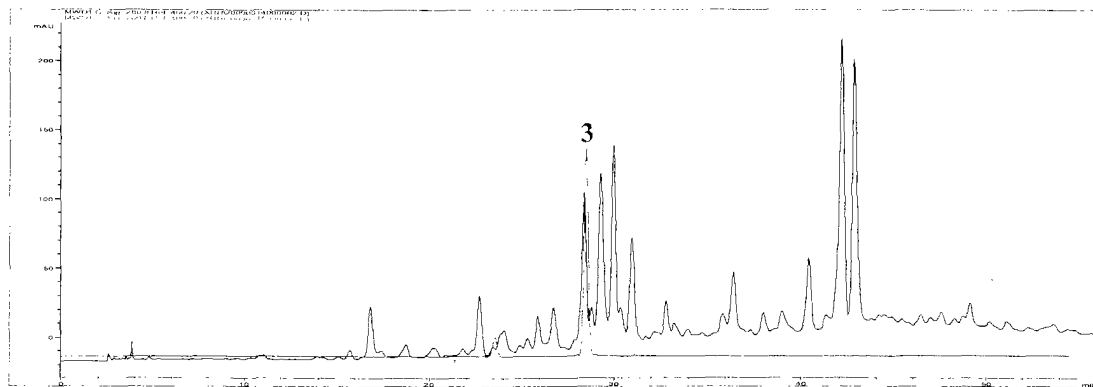


图 5

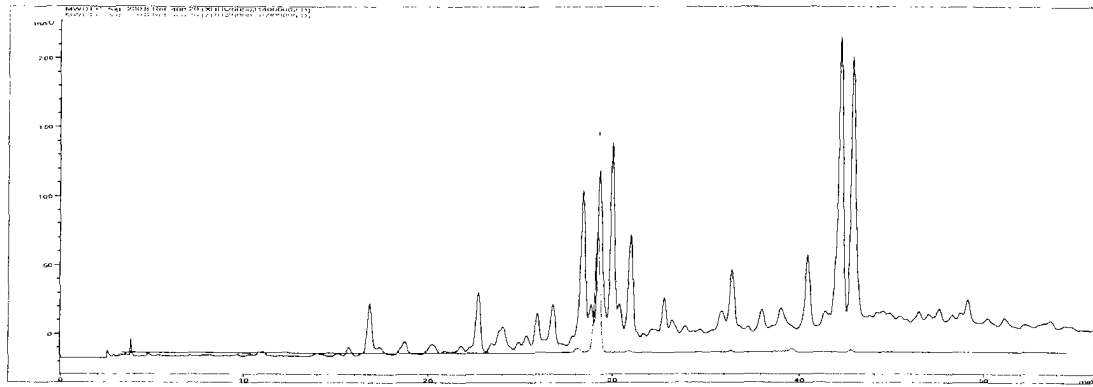


图 6

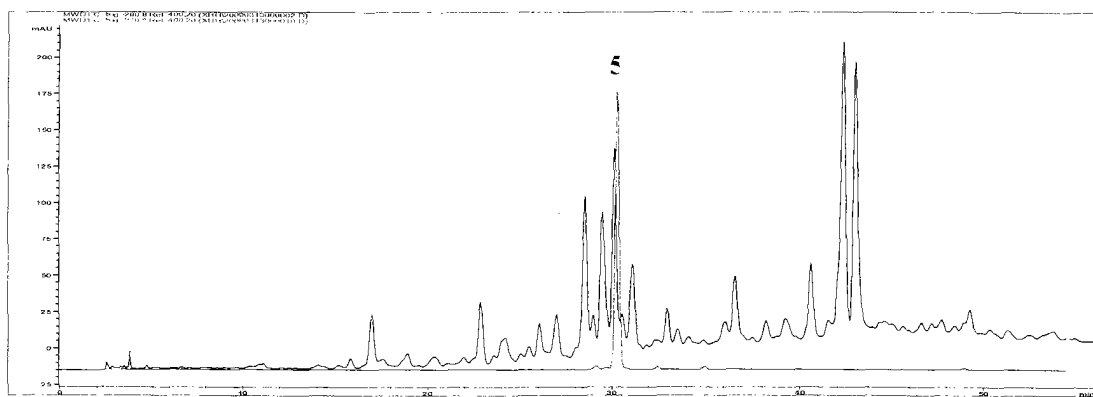


图 7

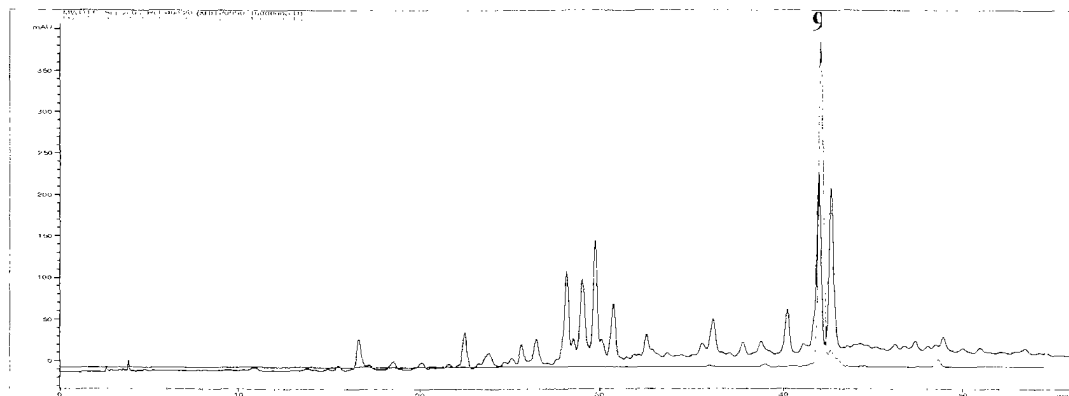


图 8

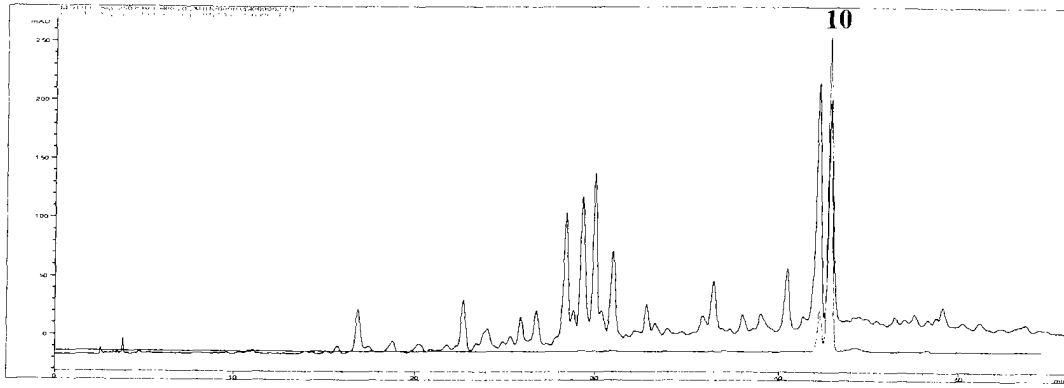


图 9

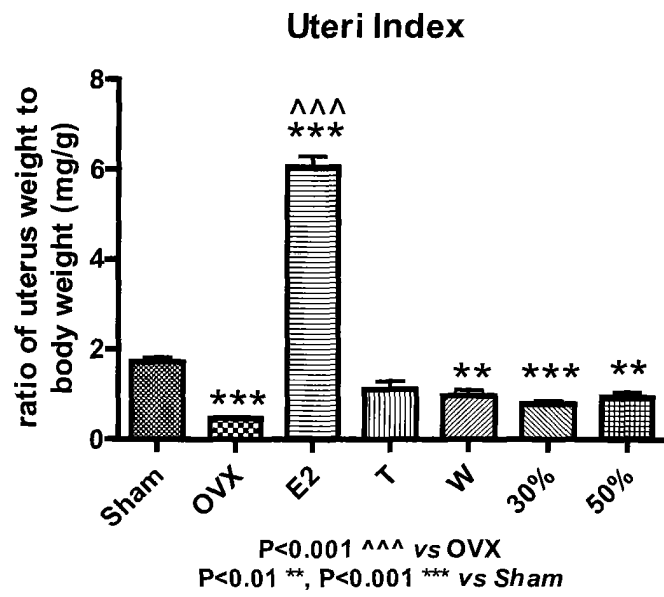


图 10

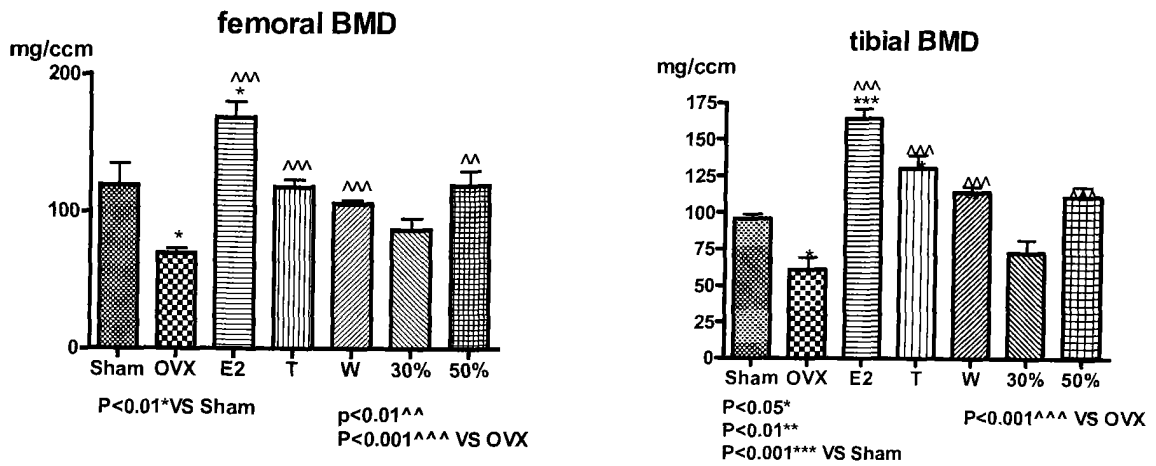


图 11

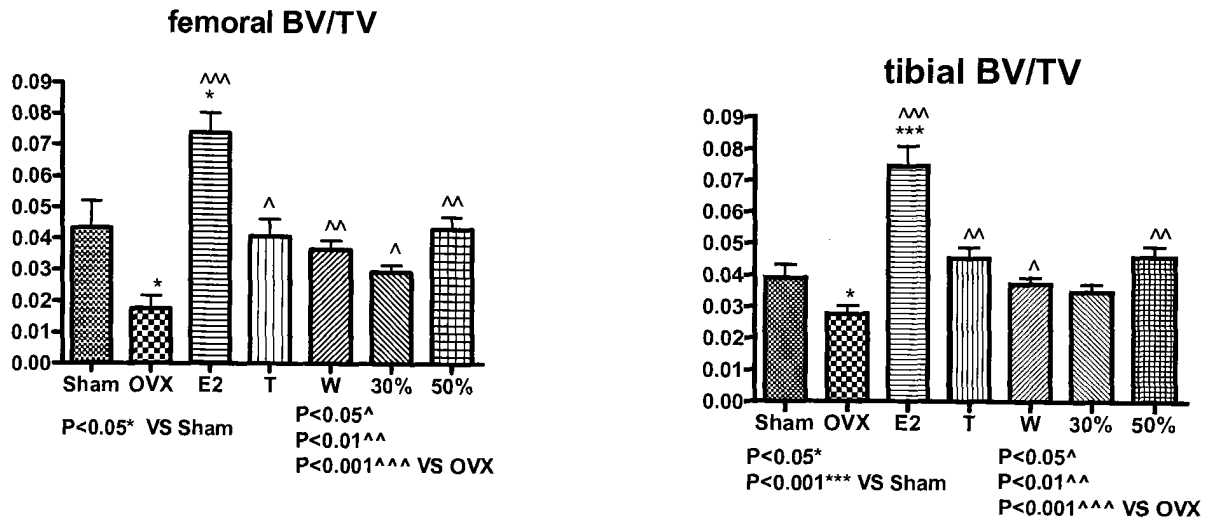


图 12