

基于谱效整合指纹的体外活性与体内活性的生物等效性研究^{*}

□孙莉琼 丁晓萍 马生堂 戚进 寇俊萍 余伯阳^{**}

(中国药科大学中药复方研究室 南京 211198)

摘 要 :目的 :基于谱效整合指纹图谱的药物体外生物活性与体内活性的生物等效性研究。方法 :利用高效液相色谱-光电二极管阵列检测器-化学发光检测器(HPLC-DAD-CL)平台 ,建立 9 个不同产地山楂叶在线清除过氧化氢(H_2O_2)的活性整合指纹图谱 ,结合白藜芦醇清除 H_2O_2 的量效关系曲线方程 ,以 $1\ \mu g$ 白藜芦醇的药效为一个效价单位 ,计算各指纹峰的效价值 ,用各指纹峰的效价值之和表示山楂叶提取物体外清除过氧化氢的总活性 ;130 只小鼠随机分为 13 组 ,模型组与给药组皮下注射盐酸异丙肾上腺素 ,放入装有钠石灰的广口瓶中 ,密闭瓶口 ,考察缺氧状态下小鼠耐氧存活时间 ,计算山楂叶对心肌缺血小鼠的保护作用 ;对上述山楂叶抗氧化的体内外实验结果进行相关性研究 ,并采用药典方法测定了不同产地山楂叶总黄酮含量对上述结果进行佐证。结果 :不同产地山楂叶基于 HPLC-CL 化学发光体系的体外清除 H_2O_2 的总活性与其体内活性结果基本一致 ,具有很强的相关性。结论 :本研究组已建立的在线活性筛选技术检测结果的具有一定的可靠性 ,本研究为其进一步推广应用提供科学依据。

关键词 :谱效整合 山楂叶 过氧化氢 总黄酮 体内外相关 心肌缺血

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.03.016

中医药作为我国具有自主知识产权的事业在中国加入 WTO 之后产业化的步伐也随之加快。中药势必要走出国门 ,实现现代化。而建立符合中医药特点并被国际认可的中药质量分析与评价技术是推进中药现代化和国际化发展的关键任务之一。中药化学指纹图谱分析技术因其能够表征中药所含的物质成分 ,符合中医理论的整体性和中药作用

机理的模糊性 ,已被 WHO、美国 FDA 和中国 SFDA 等认同并广泛用于鉴别中药真伪、评价其质量一致性以及中药产品的稳定性^[1~3]。但是 ,当前中药指纹图谱技术所面临的局限越来越明显 ,它反映的仅是中药中的化学信息 ,与药效活性信息无关。这些化学信息所对应的物质类群并不完全等同于中药的药效物质基础 ,因此不能实现通过控制中药中各化学成分“量”进而控制药物的“质”。近年来 ,国内学者也逐渐认识到这一点 ,致力于进一步完善指纹

收稿日期 :2011-08-01

修回日期 :2012-06-14

^{*} 国家自然科学基金项目(30973965) :基于活性整合指纹图谱技术的中药复方药效活性物质间的协同作用及机理研究 ,负责人 :余伯阳 ;教育部新教师基金项目(20090096120008) :中药有效性真伪性关联分析方法-活性整合指纹图谱研究 ,负责人 :戚进 ;2010 年第 47 批中国博士后科学基金(药学)项目(20100471480) :基于“活性整合指纹图谱”的中药体内外药效相关性研究 ,负责人 :丁晓萍。

^{**} 通讯作者 余伯阳 教授 ,博导 ,主要研究方向 :中药活性物质基础研究 ,Tel 025-83271383 E-mail boyangyu59@163.com。

图谱体系。将指纹图谱与中药的药效评价相结合,开展了药效与指纹谱的相关性研究,即中药谱-效相关研究,其目的在于力图阐明指纹图谱特征与药效的相互关系,使构建的指纹图谱用于中药质量控制更具有针对性,并以之反映中药的内在质量^[4-8]。

如何将指纹图谱的“谱”和中药的“效”关联起来是谱效关系研究必须解决的关键问题之一。在此背景下,本研究组提出了“谱效整合指纹谱”这一思路,选择以中药的抗氧化活性作为切入点,对中药山楂叶、银杏叶和麦冬等的谱-效关系进行了研究^[9-21]。“谱效整合指纹谱”也是一种谱-效关系研究,是指通过离线或在线的活性检测方法,构建与中药化学成分指纹峰相对应的活性指纹谱,经过统计分析或计算机处理后,将不同的化学与生物学指纹信息整合后所得的综合性评价模式。“谱效整合指纹谱”评价模式将生物活性分析直接引入到质量评价体系中,是一种融化学特征鉴别与生物活性评价为一体的综合性评价模式,能够较好地反映中药中复杂的成分体系所各自对应的化学信息和生物活性信息。

在线活性分析联用技术是一种最近 10 年才开始逐渐发展起来的新型技术。其优点在于 HPLC 色谱分离和活性检测几乎同时完成,既可以获得植物提取物的化学信息,也可同时对色谱分离后的成分进行活性分析,获得活性信息,简化了活性指纹的数据处理方法,方法快速、操作简便,自动化程度高,适宜推广,是完善“谱效整合指纹谱”的一个较好选择。本研究组在前人研究的基础之上,构建了一系列直接清除自由基的在线活性分析联用技术。但是这些在线活性分析联用技术都是基于清除自由基的体外化学反应实验,其结果是否能代表药物在体内的生物活性还有待研究。本文以山楂叶在线清除 H_2O_2 为例,对本研究组建立的山楂叶抗氧化活性指纹与山楂叶对异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠的保护作用的相关性进行研究,并采用药典方法测定了不同批次山楂叶总黄酮含量对上述结果进行佐证。

一、材料和方法

1. 材料和仪器

(1) 实验材料和动物。

山楂(*Crataegus*)的干燥叶样品均于 2010 年 5

月采集来自不同产地的样品共 9 份,样品编号及来源如下:山东临沂(S01)、山东泰安(S02)、徐州邳州(S03)、山西太谷(S04)、徐州城东(S05)、山西晋中(S06)、新疆乌鲁木齐(S07)、湖北武汉(S08)、辽宁沈阳(S09)。

130 只清洁级雄性 ICR 健康小鼠,体重 22~25 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号:SCXK(沪)2007-0005。小鼠饲养在温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \pm 10\%$,12 h 明暗交替的环境中。实验动物全价颗粒饲料购自南京安立默科技有限公司。

(2) 器材。

Agilent 1100 型 HPLC 色谱仪(包括 HP 工作站、G1312A 型二元泵、G1313A 型全自动微量进样器、G1316A 型柱温箱、G1314A 型可变波长紫外检测器 VWD),Lichrospher C_{18} 分析柱(250 mm×4.6 mm I. D. 5 μm ,南京汉邦科技有限公司)。

BPCL-1-G-C 微弱发光测量仪及 BPCL Appl. 7.2 数据处理工作站(中国科学院北京生物物理研究所),十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,AE-240),PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂),BT-200 恒流泵(沪西分析仪器厂)。

磨口广口瓶(250 mL),秒表,凡士林,KD-160 电子秤(TANITA, Japan),PB303-N 电子精密天平(Mettler-Toledo, USA)。

(3) 试剂。

碳酸氢钠和无水碳酸钠(南京化学试剂厂,AR),乙二胺四乙酸二钠(EDTA,上海化学试剂总厂,标准纯),过氧化氢(江苏南京试剂公司,AR),焦性没食子酸(邻苯三酚,遵义第二化工厂,AR),3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺,luminol,Fluka 公司),盐酸普萘洛尔片(心得安,上海信谊黄河制药有限公司,批号:100301),盐酸异丙肾上腺素(Fluka,批号:1356233),钠石灰(上海陆都化学试剂厂,批号:20100328)。

甲醇、乙腈、乙酸、甲酸、磷酸等试剂均为色谱纯(德国 Merck 公司),其它试剂均为国产分析纯;水为自制 Milli-Q 超纯水。

2. 供试样品的制备及溶液的配制

山楂叶样品 60°C 干燥至恒重(6 h 左右),粉碎成 60 目粉末,称取各产地山楂叶 500 g,分别加入 75%乙醇溶液 3 L,回流提取 60 min,滤过,重复操作一次,合并滤液,减压浓缩至浸膏,所得浸膏用冷

冻干燥机冻干成粉末,放置在荫凉干燥处,密封保存,待用。

在线清除过氧化氢实验样品的制备:精密称取 0.25 g 山楂叶提取物冻干粉,加甲醇定容至 50 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得供试品溶液。取 900 μL 供试样品,加入 100 μL 内标物白藜芦醇的甲醇溶液(浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),进样 10 μL 用于清除过氧化氢测定。

碳酸缓冲液(pH 10.0):0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠水溶液 30 mL 和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠水溶液按一定比例混合,测定 pH 值为 10.0。加入 EDTA 浓度为 $6.3\times 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

鲁米诺储备液:精密称定鲁米诺试剂 0.32187 g 用 0.1 M 碳酸钠溶液溶解并稀释至 100 mL。浓度为 0.01817 M,4℃ 保存,3 天后使用。

鲁米诺溶液:精密量取鲁米诺储备液用碳酸缓冲液(pH10.0)稀释至浓度为 $9.1\times 10^{-6} \text{M}$ 。

过氧化氢溶液:精密量取 30% H_2O_2 溶液用水稀释至浓度为 $8.8\times 10^{-7} \text{M}$ 。

3. 不同产地山楂叶在线清除过氧化氢活性指纹图谱的建立

HPLC 流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液, B 为乙

腈,梯度洗脱见表 1,流速 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30℃,检测波长 254 nm。

HPLC-DAD-CL 仪器连接装置如图 1 所示,CL 负高压 800 V,鲁米诺溶液、过氧化氢溶液分别通过双通道恒流泵以 1.1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速输送用于清除过氧化氢测定。各色谱峰对于过氧化氢的清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{CL}_{\text{baseline}} - \text{CL}_{\text{peak}}}{\text{CL}_{\text{baseline}}} \times 100\%$$

表 1 山楂叶提取物的 HPLC 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
5	92	8
20	89	11
30	88	12
40	85	15
60	84	16
70	79	21
85	75	25
95	68	32
105	60	40
115	40	60

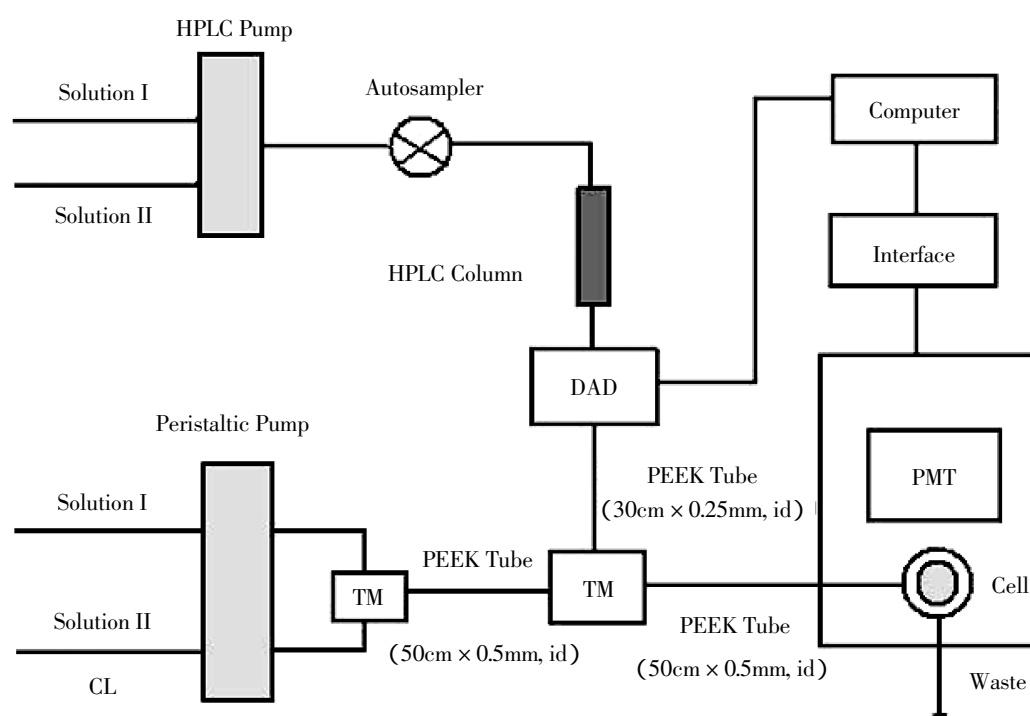


图 1 HPLC-DAD-CL 体系的仪器装置图

注:TM,T形混合器;Cell,玻璃盘管(80 μL);PMT,光电倍增管^[6]。

4. 不同产地山楂叶总黄酮含量的测定

对 9 个不同产地的山楂叶总黄酮含量进行了测定,具体操作方法参照 2010 版《中国药典》,干燥山楂叶总黄酮含量以无水芦丁计算^[22]。

5. 山楂叶提取物对于异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠的影响

本实验方法参照本研究组前人的研究进行^[23],小鼠 130 只,随机分为 13 组,每组 10 只,正常对照组和心肌缺血模型组分别灌胃给予等容量 0.5% CMC-Na,山楂叶提取物组(用量均为 1.000 g),阳性对照心得安 20 mg·kg⁻¹ 组。每日灌胃一次,连续 3 天,灌胃容量为 0.2 mL/10 g。最后一次灌胃给药 1 h 后,正常组皮下注射等容量生理盐水,其余各组皮下注射盐酸异丙肾上腺素 20 mg·kg⁻¹,15 min 后放入装有 15 g 钠石灰的 250 mL 广口瓶中,立即密闭瓶口,记录缺氧状态下小鼠存活时间。保护率参照以下公式计算:

$$\text{保护率}(\%) = \frac{\text{给药组存活时间} - \text{模型组存活时间}}{\text{正常组存活时间} - \text{模型组存活时间}} \times 100\%$$

二、结果与讨论

1. 不同产地山楂叶在线清除过氧化氢的活性指纹图谱

9 批不同产地山楂叶提取物的 HPLC 化学指纹

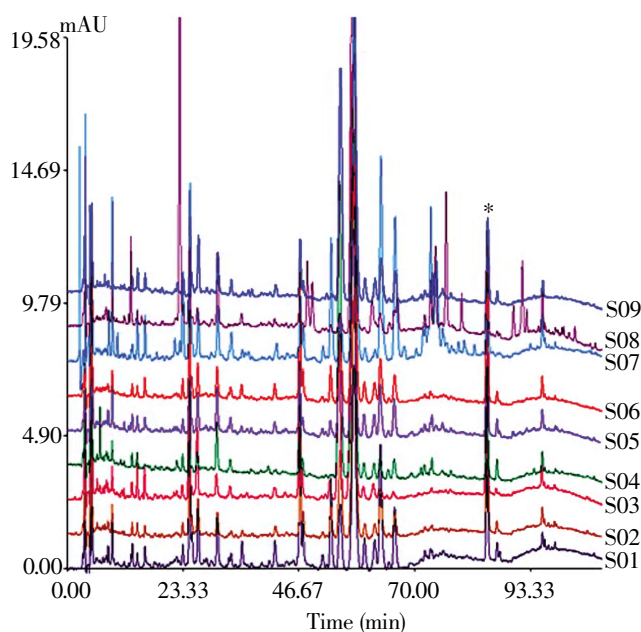


图 2 同一季节采收的不同产地山楂叶提取物的 HPLC 化学指纹图谱
注*:内标物,白藜芦醇。

图谱见图 2,结果显示不同产地的山楂叶其化学成分都大致一致,图 3 为山楂叶提取物清除过氧化氢的生物活性指纹图谱,山西产地的样品活性峰最少,而山东临沂的活性峰最多,初步判定山东临沂的山楂叶抗氧化活性最强。

虽然以上生物活性指纹图谱结合 HPLC 化学指纹图谱能反映各指纹峰的活性强弱和主要活性峰,但并不能完全反映该种山楂叶的整体效果,整体药效并不等于各指纹峰药效之和,因为峰效曲线并非线性关系,而是二次函数或三次函数。为了更好地反映山楂叶的整体药效,必须寻找到一个能加和的指标。基于这种考虑,我们选择了一种抗氧化阳性药白藜芦醇(Resveratrol)作为内标,建立了白藜芦醇的在线清除过氧化氢的量效关系数学模型($y = 1.86 \times 10^{-5}x^3 - 2.91 \times 10^{-3}x^2 + 0.16x + 0.88$,其中 x 为对过氧化氢的清除活性,用清除率(%)表示; y 为 W 的自然对数, W 为白藜芦醇的量,单位为 μg),将该模型编入计算机程序,然后将山楂叶各指纹峰的清除活性值导入程序进行运算,即可得到各活性指纹峰相当于白藜芦醇的量(μg)。以 1 μg 白藜芦醇的药效为一个效价单位,即可算出各指纹峰的效价值(Potency)。这些效价值是可以加和的,各指纹峰的效价值之和可反映该山楂叶的总体活性(总效价)(见表 2),而总效价的大小可以直接代表总提取物

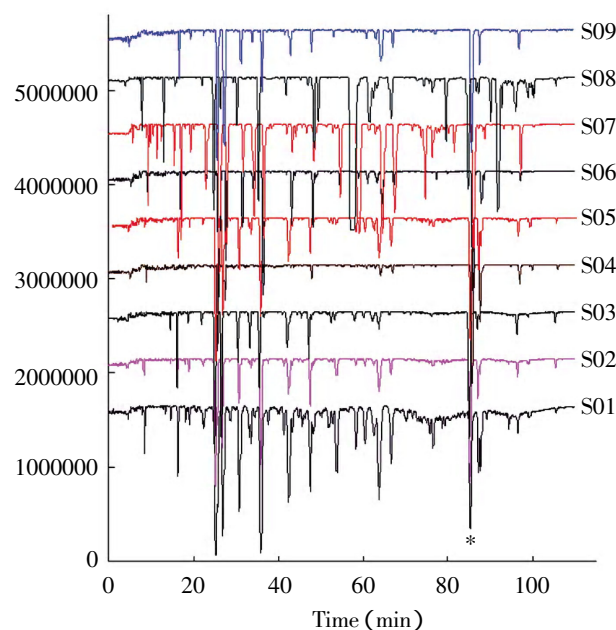


图 3 同一季节采收的不同产地山楂叶提取物的在线清除 H_2O_2 的活性指纹图谱
注*:内标物,白藜芦醇。

清除过氧化氢的能力,反映其体外抗氧化活性的大小。从计算结果可以看出不同产地的山楂叶的总效价有所不同,表明抗氧化活性有差异。其中山东临沂(S01)的抗氧化活性最强,而山西(S04)的活性最弱,表明山楂叶的整体质量在一定程度上受其生长地域的影响。

2. 不同产地山楂叶总黄酮含量

大量研究报道山楂叶对心血管疾病有显著的治疗作用,作为其主要活性成分的黄酮类物质有显

著的抗氧化作用,黄酮含量高低直接影响山楂叶的抗氧化活性,2010版《中国药典》规定干燥山楂叶总黄酮以无水芦丁计算,不得少于7.0%。本实验按照规定对9个不同产地的山楂叶总黄酮含量进行了测定(见表2),结果与在线清除过氧化氢实验中计算的各山楂叶的总效价结果大体一致(见图4),山东临沂(S01)的总黄酮含量最高,含量最低的为山西(S04)。用SPSS软件对经在线清除过氧化氢的生物活性指纹图谱计算出来的山楂叶总效价值与实

表2 9批不同产地山楂叶提取物对于异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠的保护作用,基于HPLC-CL体系清除 H_2O_2 的总活性,以及其总黄酮的含量($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量(g 提取物/kg 体重)	存活时间(分)	保护率(%)	体外清除 H_2O_2 总活性(u)	总黄酮含量(mg 芦丁/g 提取物)
正常组	—	25.86±2.45	—	—	—
模型组	—	20.67±2.50##	—	—	—
S01	1	25.13±3.41**	85.93	2.367	284.40
S02	1	23.26±5.66	49.90	0.526	153.06
S03	1	22.31±2.75	31.60	0.734	147.14
S04	1	21.39±3.71	13.87	0.207	60.24
S05	1	22.99±5.66	44.70	0.897	197.50
S06	1	23.05±3.27	45.86	0.691	189.60
S07	1	24.82±5.97	79.96	1.405	130.35
S08	1	24.16±3.14*	67.25	1.752	241.94
S09	1	23.64±3.63	57.23	0.533	128.38
心得安	0.02	22.95±1.99*	43.93	—	—

注:与正常组比较 ## $P<0.01$;与模型组比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

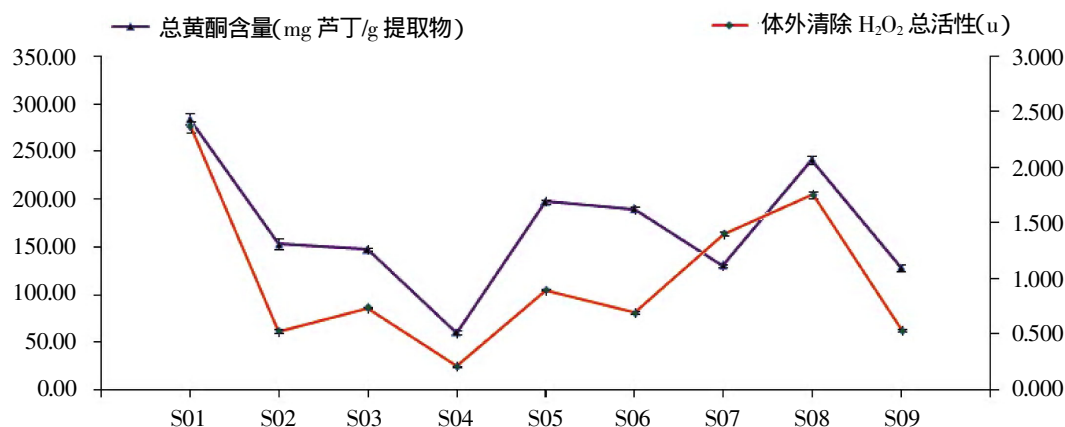


图4 9批不同产地山楂叶基于HPLC-CL体系清除 H_2O_2 的总活性与其总黄酮含量的相关性

验测得的总黄酮含量进行相关性分析,结果显示两者成显著正相关关系,相关系数为 $r=0.828$, $P<0.01$ 。

3. 山楂叶提取物对于异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠的保护作用

异丙肾上腺素通过作用于小鼠心脏 β 受体,加快心率,增强心肌收缩力,使得小鼠心肌耗氧量显著增加,从而引起心肌耗氧量增加性缺血,这是研究药物抗心肌缺血缺氧以及相应的体内抗氧化活性的经典模型。本研究预先对小鼠灌胃给予不同产地的山楂叶提取物 3 次($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),可明显延长小鼠心肌缺血损伤后的耐缺氧死亡时间,小鼠的寿命延长 $85.93\%\sim 13.87\%$ (见表 2)。其中山东临沂(S01)、新疆(S07)、湖北(S08)、辽宁(S09)的样品与模型组比较具有显著和极显著差异;其余产地山楂叶提取物对小鼠也有不同程度的保护作用;山西产山楂叶提取物保护率最低,与山东临沂的山楂叶提取物比较具有显著差异。植物药的质量受其生长的土壤、湿度,以及温度等因素的影响,因此不同产地的山楂叶其药效强弱也有所区别。

4. 在线清除过氧化氢体系与体内活性实验的相关性分析

体内活性实验是目前检测药物药效活性最为直接、科学的手段,但其只能检测单一化合物或者是总提取物,实验结果往往会受到实验动物本身的身体状况、性别、年龄、体重以及体质的影响,重现性低,而且操作繁琐,实验周期长。然而采用在线清除自由基平台,不仅操作简单,重现性高,而且能将

中药化学分离与各化学成分的活性检测同时进行,化学信息与生物学信息的结合能从整体上综合评价中药的质量。由于该平台是近几年才建立的,在国内还没有得到大规模的推广和实施。中药成分复杂,吸收进入体内的成分还受体内代谢、成分间的相互作用,以及内源性物质的干扰等复杂因素的影响,故同一样品体内活性数据常出现不一致的现象。因此本研究室建立的在线活性检测技术数据与体内的活性实验结果是否具有一致性还有待研究。

本实验采用在线清除过氧化氢的实验结果结合数学模型计算得出的各产地山楂叶的总效价表示山楂叶总提取物的体外抗氧化活性,对异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠的保护率代表山楂叶总提取物的体内抗氧化能力,从整体上考察样品的体外抗氧化活性与体内抗氧化活性的相关性。结果表明在线清除过氧化氢实验与体内实验有良好的正相关(见图 5),对于不同产地的山楂叶,其体外抗氧化活性高的样品体内抗氧化活性也较好。采用 SPSS 软件对山楂叶的体外抗氧化活性与实验测得的体内抗氧化活性进行相关性分析,结果显示两者为显著正相关关系,相关系数为 $r=0.839$, $P<0.01$,然而实验测得的总黄酮含量与体内抗氧化实验的相关系数 r 仅有 0.660,说明用山楂叶的总黄酮含量高低来评价其药效活性的强弱有待进一步商榷。中药成分复杂,而每种成分的药效活性各有差异,采用在线活性分析技术不仅可以得到每个化学峰的药效活性,还可以结合数学计算得出每个药材总提取物的药效活性,从整体上把握了中药的质量。

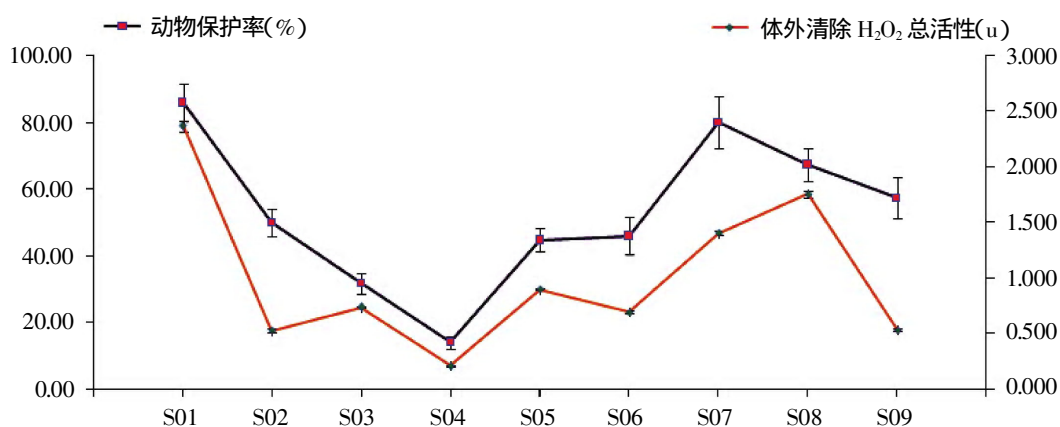


图 5 9 批不同产地山楂叶提取物对于异丙肾上腺素诱导的心肌缺氧小鼠的保护作用与基于 HPLC-CL 体系的清除 H_2O_2 的总活性的相关性

从上述研究结果来看,本研究组所采用的山楂叶在线清除过氧化氢活性指纹数据的可信度较高,与直接测定的体内总活性具有良好的相关性,具有生物效应上的等效性。

三、小 结

本研究采用研究组所提出并建立的谱效活性整合指纹技术对9批山楂叶药材的质量进行了评价,并采用了数学方法对结果进行了整合。通过与体内活性实验研究结果的生物等效性研究,以及采用药典方法测定的山楂叶总黄酮含量的比较,结果表明基于谱效整合指纹技术得出的活性数据与二者结果具有良好的相关性,与体内活性数据在生物效应上具有等效性和一致性。

目前,生物活性指纹图谱的在线检测技术已成为中药质量控制的重要研究方向,但是不同的活性检测指标所得出的生物活性图谱数据结果也不尽相同。因此针对不同的在线检测平台,都应该探讨对其对应的体内活性实验结果是否符合,从而建立更为合理的谱效相关研究,全面的表征中药的内在质量。

参考文献

- WHO. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva: World Health Organization, 2002.
- FDA. Guidance for industry botanical drug products. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000.
- 中国药品与食品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱技术要求(草案). SFDA, 2000.
- 李云飞, 程翼宇, 范晓辉. 中药多维谱效关系研究思路探讨. 中国天然产物, 2010, 8(3):167~170.
- 邓书鸿, 聂磊. 中药谱效关系的分析方法及数据处理技术研究进展. 中药材, 2010, 33(11):1819~1823.
- 戚进, 余伯阳. 中药质量评价新模式——“谱效整合指纹谱”研究进展. 中国天然产物, 2010, 8(3):171~176.
- 罗国安, 王义明, 曹进, 等. 建立我国现代中药质量标准体系的研究. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(4):5~11.
- 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨. 中国中药杂志, 2009, 34 (18):2410~2413.
- 刘荣华. 一种新的中药质量评价体系——山楂叶生物活性与化学特征相关指纹的探索研究. 南京:中国药科大学博士学位论文, 2005.
- 刘荣华, 余伯阳, 邱声祥, 等. 山楂叶中主要多元酚类成分的HPLC法比较分析. 中国天然药物, 2005, 3 (3):162~167.
- 刘荣华, 余伯阳, 陈兰英, 等. 山楂叶抗大鼠 PMN 呼吸爆发谱效关系研究. 中国中药杂志, 2008, 33 (15):4~9.
- 牟玲丽. 银杏叶质量评价方法学—谱效相关性研究. 南京:中国药科大学博士学位论文, 2007.
- 林以宁. 麦冬类药材质量评价的方法学研究. 南京:中国药科大学博士学位论文, 2007.
- Ding XP, Qi J, Chang YX, *et al.* Quality control of flavonoids in Ginkgo biloba leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (11):2204~2210.
- Ding XP, Wang XT, Chen LL, *et al.* Quality and antioxidant activity detection of Crataegus leaves using on-line high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to chemiluminescence detection. *Food Chem*, 2010, 120:929~933.
- 丁晓萍. 基于抗氧化活性的生物活性和化学相关指纹的构建及其在中药质量评价研究中的应用. 南京:中国药科大学博士学位论文, 2009.
- Chang YX, Ding XP, Qi J, *et al.* Determination of phenolic acids in Danshen preparations by LC with chemiluminescence detection. *Chromatographia*, 2009, 69:319~323.
- Chang YX, Ding XP, Qi J, *et al.* The antioxidant-activity-integrated fingerprint: an advantageous tool for the evaluation of quality of herbal medicines. *J Chromatogr A*, 2008, 1208 (1):76~82.
- Chang YX, Yan DM, Chen LL, *et al.* Potency fingerprint of herbal products Danshen injection for their quality evaluation. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(6):586~590.
- Wu L, Ding XP, Zhu DN, *et al.* Study on the radical scavengers in the traditional Chinese medicine formula Shengmai San by HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI MS/MS. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2010, 52:438~445.
- Ding XP, Wang XT, Chen LL, *et al.* On-line high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-mass spectrometry-chemiluminescence assay of radical scavengers in Epimedium. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(9):1227~1235.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:化学工业出版社, 2010.
- 尤燕, 寇俊萍, 余伯阳. 复方丹参片合生脉饮抗小鼠心肌缺氧缺血作用研究. 中药药理与临床, 2007, 23(5):4~7.

Studies on Bioequivalence of Activity based on “Spectrum-Effect Integrated Fingerprint” and Activity *In Vivo*

Sun Liqiong, Ding Xiaoping, Ma Shengtang, Qi Jin, Kou Junping, Yu Boyang

(Department of Chinese Complex Recipe Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: This work was aimed to study the bioequivalence of activity based on “spectrum–effect integrated fingerprint” and activity *in vivo*. The hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging activity fingerprints of 9 batches of *Crataegus* leaves collected from different provinces were established through an on–line high–performance liquid chromatography–diode array detector combined with chemiluminescence detection (HPLC–DAD–CL) system. As the positive control, if resveratrol (1 μg) was presumed as a potency unit, the relative activities of active peaks were calculated as potency unit according to standard potency curves of resveratrol. And the relative total activities of *Crataegus* leaves should be the sum of potency of all characteristic peaks. A total of 130 mice were randomly divided into 13 groups, the acute ischemic anoxic myocardial injury was induced by subcutaneous injection isoproterenol in mice, the survival time in mice with hypoxic state was recorded and the life extension rate of the treated group was studied. The correlation between the H_2O_2 scavenging capacity of *Crataegus* leaves based on HPLC–DAD–CL and the protective effect in mice with myocardial hypoxia was investigated. And the content of total flavonoids was determined to make the results above more authentic. It is found the antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* both confirm with each other, which means the on–line activity screening method and antioxidant–activity integrated fingerprint research platform can be further promoted.

Keywords: Spectrum–effect integrated fingerprint, *Crataegus* leaves, hydrogen peroxide, total flavonoids, *in vitro*–*in vivo* correlation, myocardial hypoxia

(责任编辑 李沙沙 张志华 责任译审 王 晶)