



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101590128 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 11

(21) 申请号 200910141969. X

G01N 30/36 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 12

A61K 36/734 (2006. 01)

(73) 专利权人 刘斌

A61P 39/06 (2006. 01)

地址 100102 北京市朝阳区望京中环南路 6 号

A61P 3/06 (2006. 01)

(72) 发明人 刘斌 姜艳艳 王伟 石任兵 杨英

(56) 对比文件

CN 1911334 A, 2007. 02. 14, 全文.

(74) 专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理有限公司 11108

杨英等. 降脂宁调血脂及抗脂质过氧化作用的实验研究. 《中华中医药杂志 (原中国医药学报)》. 2009, 第 24 卷 (第 5 期), 647-649.

代理人 刘伟

杨英等. 降脂宁有效部位及其药效组分对脐静脉内皮细胞损伤的保护作用. 《北京中医药大学学报》. 2009, 第 32 卷 (第 3 期), 160-163.

(51) Int. Cl.

审查员 刘瑞华

G01N 1/28 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。该评价方法主要包括药效组分制备、供试品制备、调脂抗氧化生物效应测定、供试品生物效价比计算及统计学分析、供试品质量评价等。药效组分包括 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚和槲皮素,其质量比为 7~8 : 2~3 : 0.5~1 : 0.2~0.5 : 0.5~1 : 0.5~1.5。质量评价指标包括:(1) 抗氧化指标:Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力,Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量,Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力;(2) 代谢物含量指标:Be1-7402 肝细胞内胆固醇含量,Be1-7402 肝细胞内外 TBA 含量。质量评价标准为:生物效价比在 80%~120%之间,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为合格品;生物效价比<80%,或经统计学检验与效应标准有显著性差异,为不合格品;生物效价比>120%,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为优质品。

CN 101590128 B

1. 一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量检测方法,其特征在于该检测方法为:

A、药效组分制备:

精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚、槲皮素,按质量比 7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5 的比例混匀,用蒸馏水溶解,配成相应浓度的储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存,备用;

B、供试品制备:

取待检样品,加水溶解分散,通过树脂柱径高比为 1:6~10AB-8 型或 D-101 型或 HPD-300 型大孔吸附树脂柱,树脂体积与药量之比 (ml:g) 为 1:0.5~1.5;待吸附完成,水液全部通过树脂柱后,树脂柱先用 3~6 倍树脂体积水洗脱,水洗脱液弃去,树脂柱再用 3~6 倍树脂体积的 40~70%乙醇洗脱;收集 40~70%乙醇洗脱液,减压回收溶剂,50℃减压干燥,得供试品;取供试品用蒸馏水溶解后,配成相应浓度储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存,备用;

C、细胞培养:

将冻存的人脐静脉血管内皮细胞株 EAHY926 置 37℃水浴中复苏,接种至培养皿中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养;待细胞长成致密单层后,传代培养,传代时弃去原培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤两次,加入 0.125%/0.02%,1:1 的胰酶-EDTA 消化液消化 5min,在倒置显微镜下观察,当出现细胞回缩或细胞间隙增大,且有少量细胞悬浮时,立即弃去消化液,加入 2 倍于胰酶的完全培养基终止消化,轻轻吹打细胞使成均匀的细胞悬液,吸入离心管中在 1000rpm,5min 条件下离心,上清液弃去,用完全培养基重悬细胞后进行细胞计数,以 1~2 \times 10⁶ 个细胞/mL 的密度接种于新的培养皿中培养;每 2~3d 换液一次,长满后即可再次传代;

将冻存的人肝细胞株 Bel-7402 置 37℃水浴中复苏,按 2 \times 10⁵/mL 接种于 25cm² 培养瓶中,培养基为 RPMI-1640 完全培养基,其中含 10%胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素;置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3d 换液一次;待细胞铺满培养瓶 80%以上时,用 0.125%/0.02%,1:1 的胰酶-EDTA 消化传代;选择对数生长期细胞用于实验;

D、调脂抗氧化生物效应测定:

分别取药效组分及供试品储备液配成相应剂量,按照抗氧化指标 a、代谢物含量指标 b 平行进行调脂抗氧化效应测定:

a 抗氧化指标测定为:

细胞模型制备,用 Ox-LDL 氧化型低密度脂蛋白制备 HUVEC 细胞损伤模型;Ox-LDL 原始浓度为 1~1.5mg/mL,4℃冰箱保存,备用;临用时稀释至 80~100 μ g/mL;

分组,空白对照组:仅加入无血清培养基;模型对照组:仅加入 Ox-LDL 100 μ g/mL 于无血清培养基;阿托伐他汀对照组:无血清培养基中含阿托伐他汀 1 \times 10⁻⁷mg/mL;供试品低、中、高剂量组:无血清培养基分别含供试品 2 \times 10⁻⁴,2 \times 10⁻³,1 \times 10⁻²mg/mL;药效组分低、中、高剂量组:无血清培养基中分别含药效组分 1 \times 10⁻⁴,1 \times 10⁻³,1 \times 10⁻²mg/mL;

Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定:选择人脐静脉血管内皮细胞株常规细胞培养,用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模,用供试品及药效组分进行干预后,噻唑蓝比色法检测内

皮细胞活力；具体方法为：取培养后细胞，按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 1×10^4 接种于 96 孔培养板中，按“ α 抗氧化指标测定分组”项下方法分为 9 组，每组 6 个平行孔；药物作用于细胞 24h 后，加入 $5\text{mg}/\text{mL}$ MTT $50 \mu\text{L}$ 继续培养 4h，吸弃上清液，各孔加二甲基亚砜 $150 \mu\text{L}$ ，室温避光微振荡 10min，使结晶充分溶解，用酶标仪在 570nm 处测定 OD 值；由下列公式计算内皮细胞活力：内皮细胞活力% = 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ ；

Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定：选择人脐静脉血管内皮细胞株，常规细胞培养，用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模，用供试品及药效组分进行干预后，取培养上清液，按试剂盒说明书检测 NO、ET-1 含量；具体方法为：取培养后细胞，按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板，置 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养 24h，弃去原培养基，按“ α 抗氧化指标测定分组”项下方法分为 9 组，每组 3 个平行孔，加入各药液，再置 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养 24h 后，取各孔细胞培养上清液，2000rpm 离心 10min，取上清液分装于 EP 管中， 4°C 冰箱保存，备用；分别按试剂盒说明书用分光光度法检测 NO 含量、用放射免疫分析法检测 ET-1 含量；

Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定：选择人脐静脉血管内皮细胞株，常规细胞培养，用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模，用供试品及药效组分进行干预后，移除培养液，按试剂盒说明书检测 MDA 含量、SOD 活力；具体方法为：将移去培养基的细胞用胰酶-EDTA 消化液消化，用 PBS 洗下细胞，1000rpm 离心 5min 收集细胞；每孔收集的细胞，加入 0.5mL 双蒸水，用超声波粉碎仪粉碎细胞，3000rpm 离心 10min，取上清液分装于 EP 管中， 4°C 冰箱保存，备用；按试剂盒说明书用分光光度法分别测定 MDA 含量、SOD 活力；

b 代谢物含量指标测定为：

分组，空白对照组：含 $2\text{g}/\text{L}$ 牛血清白蛋白的 1640 培养液；阿托伐他汀组：含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液加 $10^{-7}\text{mg}/\text{mL}$ 阿托伐他汀；供试品高、中、低剂量组：含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 $1 \times 10^{-2}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $2 \times 10^{-3}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $2 \times 10^{-4}\text{mg}/\text{mL}$ 的供试品；药效组分高、中、低剂量组：含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 $1 \times 10^{-2}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{-3}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{-4}\text{mg}/\text{mL}$ 的药效组分；每组做 3 个平行孔；

Bel-7402 肝细胞内胆固醇含量测定：Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h，将每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，移除培养基，细胞用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入体积比为 3 : 2 的正己烷-异丙醇 1mL，室温下放置 30min，分取有机溶剂，重复操作一次；合并 2 次收集的有机溶剂，置玻璃管内吹干，用 $200 \mu\text{L}$ 甲醇复溶，测定胆固醇含量；提取了脂质的细胞加入 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 裂解后，用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度；胆固醇含量采用 HPLC 法测定，色谱条件为：色谱柱：Hypersil APS2C₁₈ $150\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ ， $5 \mu\text{m}$ ；流动相：乙腈-异丙醇 = 90 : 10，流速： $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱温： 25°C ，检测波长： 216nm ；峰面积外标法定量，以 mg/g 细胞蛋白为单位；

Bel-7402 肝细胞内外 TBA 含量测定：采用酶法 TBA 试剂盒测定；Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h 后，每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，收集培养基，分装于 EP 管中，测定培养基中 TBA；将移除培养基的细胞，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 $300 \mu\text{L}$ 含 1% Triton-X100 的双蒸水裂解后，收集液体，3000rpm，10min 的条件下离心，分装于 EP 管中，测定细胞内 TBA，并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度；细胞内 TBA 含量用每克细胞蛋白所含 TBA 的 μmol 数表示；

E、供试品生物效价比计算和统计学分析：

将供试品经过与药效组分所确立的标准生物效应指标进行检测后,计算该供试品的生物效价比并进行统计学分析;

F、供试品质量评价:

根据生物效价比及统计学分析结果进行供试品的质量评价;生物效价比范围及标准:效价比 $< 80\%$,或经统计学检验与效应标准有显著性差异,为不合格品;效价比在 $80\% \sim 120\%$ 之间,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为合格品;效价比 $> 120\%$,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为优质品。

一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中药复方的生物效应质量评价方法,特别是涉及一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。

背景技术

[0002] 降脂宁始载于《千金方》,现载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药)第十三册,由山楂、制首乌、决明子、荷叶 4 味中药组成,具有温通经脉、扶正疏风、通经活络的功效。现代药理研究表明降脂宁具有降血脂、软化血管作用,临床使用广泛,疗效显著。但目前有关降脂宁的质量控制和评价方法,非常简单,仅有鉴别项(采用化学反应鉴别生物碱、蒽醌和黄酮)收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药)第十三册降脂宁项下,水平很低,导致临床疗效不稳定,安全性存在隐患。因此,迫切需要建立降脂宁合理的质量评价体系,以改进药品生产工艺、提升药品质量、促进药品二次开发、实现药品的现代化,最终保证临床用药的安全有效。目前亦未见有关降脂宁质量评价方法的相关专利。

[0003] 技术方案

[0004] 本发明的目的在于提供一种中药复方的生物效应质量评价方法;本发明的目的还在于提供一种基于调脂抗氧化生物效应的中药复方质量评价方法;本发明的目的还在于提供一种基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价方法。

[0005] 本发明基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价方法建立的基本程序如下:

[0006] (1) 降脂宁组方药材(山楂、荷叶、何首乌、决明子)→制备工艺→降脂宁提取物→分离纯化,活性筛选→降脂宁有效部位→成分分析,活性评价→降脂宁药效组分。

[0007] (2) 待检样品→分离纯化→供试品。

[0008] (3) 降脂宁药效组分生物效应测定、供试品生物效应测定(平行操作)。

[0009] (4) 降脂宁药效组分生物效价比计算及统计学分析,确定药效组分效应标准及标准生物效应。

[0010] (5) 供试品效应与药效组分标准效应比较,供试品生物效价比计算及统计学分析(生物效价比=供试品效应/药效组分标准效应×100%)。

[0011] (6) 供试品质量评价。

[0012] 质量评价标准:生物效价比在 80%~120%之间,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为合格品;生物效价比<80%,或经统计学检验与效应标准有显著性差异,为不合格品;生物效价比>120%,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为优质品。

[0013] 本发明基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价指标包括:

[0014] (1) 抗氧化指标:氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导损伤的人脐静脉血管内皮细胞株(HUVEC)细胞活力;Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)含量;Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力。

[0015] (2) 代谢物含量指标:Be1-7402 肝细胞内胆固醇含量;Be1-7402 肝细胞内外总胆汁酸(TBA)含量。

[0016] 本发明基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法为：

[0017] 1. 药效组分制备

[0018] 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚、槲皮素,按质量比 7~8 : 2~3 : 0.5~1 : 0.2~0.5 : 0.5~1 : 0.5~1.5 的比例混匀,用蒸馏水溶解(可加入少量二甲基亚砷助溶),配成相应浓度的储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存,备用。

[0019] 2. 供试品制备

[0020] 取待检样品,加水溶解分散,通过 AB-8 型或 D-101 型或 HPD-300 型大孔吸附树脂柱(树脂柱径高比为 1 : 6~10),树脂体积(mL)与药量(g)之比为 1 : 0.5~1.5。待吸附完成,水液全部通过树脂柱后,树脂柱先用 3~6 倍树脂体积水洗脱,水洗脱液弃去,树脂柱再用 3~6 倍树脂体积的 40~70%乙醇洗脱。收集 40~70%乙醇洗脱液,减压回收溶剂,50℃减压干燥,得供试品。取供试品用蒸馏水溶解后,配成相应浓度储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存,备用。

[0021] 3. 细胞培养

[0022] 将冻存的人脐静脉血管内皮细胞株 EAHY926 置 37℃水浴中复苏,接种至培养皿中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞长成致密单层后,传代培养,传代时弃去原培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次,加入胰酶-EDTA 消化液(0.125%/0.02%,1 : 1)消化 5min 左右,在倒置显微镜下观察,当出现细胞回缩或细胞间隙增大,且有少量细胞悬浮时,立即弃去消化液,加入 2 倍于胰酶的完全培养基终止消化,轻轻吹打细胞使成均匀的细胞悬液,吸入离心管中离心(1000rpm,5min),上清液弃去,用完全培养基重悬细胞后进行细胞计数,以 1~2 $\times 10^6$ 个细胞/mL 的密度接种于新的培养皿中培养。每 2~3d 换液一次,长满后即可再次传代。

[0023] 将冻存的人肝细胞株 Be1-7402 置 37℃水浴中复苏,按 2 $\times 10^5$ /mL 接种于 25cm² 培养瓶中,培养基为 RPMI-1640 完全培养基,其中含 10%胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素。置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3d 换液一次。待细胞铺满培养瓶 80%以上时,用胰酶-EDTA(0.125%/0.02%,1 : 1)消化传代。选择对数生长期细胞用于实验。

[0024] 4. 调脂抗氧化生物效应测定

[0025] 分别取药效组分及供试品储备液配成相应剂量,按照下列测定指标平行进行调脂抗氧化效应测定。

[0026] 4.1 抗氧化指标

[0027] 4.1.1 细胞模型制备

[0028] 用氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)制备 HUVEC 细胞损伤模型。Ox-LDL 原始浓度为 1~1.5mg/mL,4℃冰箱保存,备用。临用时稀释至 80~100 μ g/mL。

[0029] 4.1.2 分组

[0030] 空白对照组:仅加入无血清培养基;模型对照组:仅加入 Ox-LDL 100 μ g/mL 于无血清培养基;阿托伐他汀对照组:无血清培养基中含阿托伐他汀 1 $\times 10^{-7}$ mg/mL;供试品低、中、高剂量组:无血清培养基分别含供试品 2 $\times 10^{-4}$,2 $\times 10^{-3}$,1 $\times 10^{-2}$ mg/mL;药效组分低、中、高剂量组:无血清培养基中分别含药效组分 1 $\times 10^{-4}$,1 $\times 10^{-3}$,1 $\times 10^{-2}$ mg/mL。

[0031] 4.1.3 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定

[0032] 选择人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC) 常规细胞培养,用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模,用供试品及药效组分进行干预后,噻唑蓝 (MTT) 比色法检测内皮细胞活力。具体方法为:取培养后细胞,按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ (约 1×10^4) 接种于 96 孔培养板中,按“4.1.2 分组”项下方法分为 9 组,每组 6 个平行孔。药物作用于细胞 24h 后,加入 $5\text{mg}/\text{mL}$ MTT $50 \mu\text{L}$ 继续培养 4h,吸弃上清液,各孔加二甲基亚砜 (DMSO) $150 \mu\text{L}$,室温避光微振荡 10min,使结晶充分溶解,用酶标仪在 570nm 处测定 OD 值。由下列公式计算内皮细胞活力:内皮细胞活力% = 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

[0033] 4.1.4 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定

[0034] 选择人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC),常规细胞培养,用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模,用供试品及药效组分进行干预后,取培养上清液,按试剂盒说明书检测 NO、ET-1 含量。具体方法为:取培养后细胞,按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板,置 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养 24h,弃去原培养基,按“4.1.2 分组”项下方法分为 9 组,每组 3 个平行孔,加入各药液,再置 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养 24h 后,取各孔细胞培养上清液,2000rpm 离心 10min,取上清液分装于 EP 管中, 4°C 冰箱保存,备用。分别按试剂盒说明书用分光光度法检测 NO 含量、用放射免疫分析法检测 ET-1 含量。

[0035] 4.1.5 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定

[0036] 选择人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC),常规细胞培养,用 Ox-LDL 进行氧化损伤造模,用供试品及药效组分进行干预后,移除培养液,按试剂盒说明书检测 MDA 含量、SOD 活力。具体方法为:将移去培养基的细胞用胰酶-EDTA 消化液消化,用 PBS 洗下细胞,1000rpm 离心 5min 收集细胞。每孔收集的细胞,加入 0.5mL 双蒸水,用超声波粉碎仪粉碎细胞,3000rpm 离心 10min,取上清液分装于 EP 管中, 4°C 冰箱保存,备用。按试剂盒说明书用分光光度法分别测定 MDA 含量、SOD 活力。

[0037] 4.2 代谢物含量指标**[0038] 4.2.1 分组**

[0039] 空白对照组:含 $2\text{g}/\text{L}$ 牛血清白蛋白 (BSA) 的 1640 培养液;阿托伐他汀组:含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液加 $10^{-7}\text{mg}/\text{mL}$ 阿托伐他汀;供试品高、中、低剂量组:含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 $1 \times 10^{-2}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $2 \times 10^{-3}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $2 \times 10^{-4}\text{mg}/\text{mL}$ 的供试品;药效组分高、中、低剂量组:含 $2\text{g}/\text{L}$ BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 $1 \times 10^{-2}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{-3}\text{mg}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{-4}\text{mg}/\text{mL}$ 的药效组分。每组做 3 个平行孔。

[0040] 4.2.2 Bel-7402 肝细胞内胆固醇含量测定

[0041] Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h,将每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基,培养 24h 后,移除培养基,细胞用 PBS 洗 2 次,每孔加入正己烷-异丙醇 (3 : 2, V/V) 1mL,室温下放置 30min,分取有机溶剂,重复操作一次。合并 2 次收集的有机溶剂,置玻璃管内吹干,用 $200 \mu\text{L}$ 甲醇复溶,测定胆固醇含量。提取了脂质的细胞加入 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 裂解后,用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。胆固醇含量采用 HPLC 法测定,色谱条件为:色谱柱:Hypersil APS2 C_{18} ($150\text{mm} \times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相:乙腈-异丙醇 (90 : 10),流速: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温: 25°C ,检测波长: 216nm ;峰面积外标法定量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

[0042] 4.2.3 Bel-7402 肝细胞内外 TBA 含量测定

[0043] 采用酶法 TBA 试剂盒测定。Be1-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h 后,每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基,培养 24h 后,收集培养基,分装于 EP 管中,测定培养基中 TBA;将移除培养基的细胞,用 PBS 洗 2 次,每孔加入 300 μ L 含 1% Triton-X100 的双蒸水裂解后,收集液体,离心 (3000rpm, 10min),分装于 EP 管中,测定细胞内 TBA,并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。细胞内 TBA 含量用每克细胞蛋白所含 TBA 的 μ mol 数表示。

[0044] 5 供试品生物效价比计算和统计学分析

[0045] 将供试品经过与药效组分所确立的标准生物效应指标进行检测后,计算该供试品的生物效价比并进行统计学分析。

[0046] 6 供试品质量评价

[0047] 根据生物效价比及统计学分析结果进行供试品的质量评价。生物效价比范围及标准:效价比 $< 80\%$,或经统计学检验与效应标准有显著性差异,为不合格品;效价比在 $80\% \sim 120\%$ 之间,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为合格品;效价比 $> 120\%$,且经统计学检验与效应标准无显著性差异,为优质品。

[0048] 实施例 1

[0049] 1. 药效组分制备

[0050] 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚、槲皮素,按质量比 7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5 的比例混匀,用蒸馏水溶解(可加入少量 DMSO 助溶),配成相应浓度的储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。

[0051] 2. 供试品制备

[0052] 取待检样品,加水溶解分散,通过 AB-8 型或 D-101 型或 HPD-300 型大孔吸附树脂柱(树脂柱径高比为 1:6~10),树脂体积(mL)与药量(g)之比为 1:0.5~1.5。待吸附完成,水液全部通过树脂柱后,树脂柱先用 3~6 倍树脂体积水洗脱,水洗脱液弃去,树脂柱再用 3~6 倍树脂体积的 40~70%乙醇洗脱。收集 40~70%乙醇洗脱液,减压回收溶剂,50 $^{\circ}$ C 减压干燥,得供试品。取供试品用蒸馏水溶解(可加入少量 DMSO 助溶),配成相应浓度储备液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。

[0053] 3. 细胞培养及模型制备

[0054] 常规培养 HUVEC 细胞和 Be1-7402 细胞。用 Ox-LDL 制备 HUVEC 细胞损伤模型, Ox-LDL 原始浓度为 1mg/mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。临用时稀释至 80 μ g/mL。

[0055] 4. 分组

[0056] 4.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞影响

[0057] 细胞共分为 9 组。空白对照组:仅加入无血清培养基;模型对照组:仅加入 Ox-LDL 100 μ g/mL 于无血清培养基;阿托伐他汀对照组:无血清培养基中含阿托伐他汀 1×10^{-7} mg/mL;供试品低、中、高剂量组:无血清培养基分别含供试品 2×10^{-4} , 2×10^{-3} , 1×10^{-2} mg/mL;药效组分低、中、高剂量组:无血清培养基中分别含药效组分 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} mg/mL。

[0058] 4.2 对 Be1-7402 细胞胆固醇代谢影响

[0059] 细胞共分为 8 组。空白对照组:含 2g/L 牛血清白蛋白(BSA)的 1640 培养液;阿托伐他汀组:含 2g/L BSA 的 1640 培养液加 10^{-7} mg/mL 阿托伐他汀;供试品高、中、低剂量组:含

2g/L BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 2×10^{-3} mg/mL、 2×10^{-4} mg/mL 的供试品；药效组分高、中、低剂量组：含 2g/L BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 1×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-4} mg/mL 的药效组分。

[0060] 5. 实验方法

[0061] 5.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0062] MTT 比色法测定内皮细胞活力：取培养后细胞，按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ （约 1×10^4 ）接种于 96 孔培养板中，按“4. 分组”项下方法分为 9 组，每组 4 个平行孔。药物作用于细胞 24h 后，加入 5mg/mL 的 MTT $50 \mu\text{L}$ 继续培养 4h，吸弃上清液，各孔加 DMSO $150 \mu\text{L}$ ，室温避光微振荡 10min，使结晶充分溶解，用酶标仪在 570nm 处测定吸光度 (OD) 值。由下列公式计算内皮细胞活力：内皮细胞活力% = 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

[0063] 5.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 的 NO 及 ET-1 含量的影响

[0064] 取培养后细胞，按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板，置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24h，弃去原培养基，按“4. 分组”项下方法分为 9 组，每组 3 个平行孔，加入各药液，再置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24h 后，取各孔细胞培养上清液，离心 (2000rpm, 10min)，取上清液分装于 EP 管中， 4°C 冰箱保存，备用。按试剂盒说明书用分光光度法检测 NO 含量，用放射免疫分析法检测 ET-1 含量。

[0065] 5.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 的 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0066] 将移去培养基的细胞用胰酶-EDTA 消化液消化，用 PBS 洗下细胞，1000rpm 离心 5min，收集细胞。每孔收集的细胞，加入 0.5mL 双蒸水，用超声波粉碎仪粉碎细胞，3000rpm 离心 10min，取上清液分装于 EP 管中， 4°C 冰箱保存，备用。按试剂盒说明书用分光光度法分别测定 MDA 含量和 SOD 活力。

[0067] 5.4 对 Bel-7402 细胞内胆固醇 (CHO) 含量的影响

[0068] Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h，将每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，移除培养基，细胞用 PBS 洗 2 次，每孔加入正己烷-异丙醇 (3 : 2, V/V) 1mL，室温下放置 30min，分取有机溶剂，重复操作一次。合并 2 次收集的有机溶剂，置玻璃管内吹干，用 $200 \mu\text{L}$ 甲醇复溶，测定胆固醇含量。提取了脂质的细胞加入 0.1mol/L NaOH 裂解后，用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。胆固醇含量采用 HPLC 法测定，色谱条件为：色谱柱：Hypersil APS2 C_{18} (150mm \times 4.6mm, $5 \mu\text{m}$)；流动相：乙腈-异丙醇 (90 : 10)，流速：1.0mL \cdot min $^{-1}$ ，柱温： 25°C ，检测波长：216nm；峰面积外标法定量，以 mg/g 细胞蛋白为单位。

[0069] 5.5 对 Bel-7402 细胞内 TBA 含量的影响

[0070] 采用酶法 TBA 试剂盒测定。Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h 后，每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，收集培养基，分装于 EP 管中，测定培养基中 TBA；将移除培养基的细胞，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 $300 \mu\text{L}$ 含 1% Triton-X100 的双蒸水裂解后，收集液体，3000rpm 离心 10min，分装于 EP 管中，测定细胞内 TBA，并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。细胞内 TBA 含量用每克细胞蛋白所含 TBA 的 μmol 数表示。

[0071] 5.6 统计学分析及生物效价比计算

[0072] 所有药效学实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间比较用 q 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

[0073] 供试品的生物效价比（简称效价比）= 供试品效应 / 药效组分效应 $\times 100\%$ ；其中

效价比 1、2、3 分别代表低、中、高三个剂量组的效价比；统计学分析使用单因素方差分析，以 $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

[0074] 6. 结果

[0075] 6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0076] 表 1 供试品 1 对内皮细胞活力的影响 ($X \pm s, n = 4$)

[0077]

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***	80.41%
供试品1低剂量组	0.375±0.06**	58.77%
供试品1中剂量组	0.475±0.03***	74.45%
供试品1高剂量组	0.522±0.04***★	81.82%

[0078] 注：VS 对照组： $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ；VS Ox-LDL 组： $#P < 0.05$ ， $##P < 0.01$ ；VS

[0079] 阿托伐他汀组： $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；VS 低剂量组： $\star P < 0.05$ ， $\star\star P < 0.01$ ；

[0080] VS 中剂量组： $\blacktriangle P < 0.05$ ， $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。下表同。

[0081] 6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

[0082] 表 2 供试品 1 对内皮细胞 NO、ET-1 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0083]

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45##	7.21±0.88##
药效组分低剂量组	4.63±0.26##	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26##	7.87±0.84##
药效组分高剂量组	5.93±0.26***★▲	5.20±1.07***★
供试品1低剂量组	3.52±0.26#△△	12.34±0.85△
供试品1中剂量组	4.26±0.26##	10.67±1.37
供试品1高剂量组	5.19±0.26***★	7.75±1.12***★

[0084] 6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0085] 表 3 供试品 1 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0086]

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15**	15.69±1.53**
阿托伐他汀组	1.15±0.04##	21.53±0.35##
药效组分低剂量组	1.85±0.24*##ΔΔ	18.9±0.47***
药效组分中剂量组	1.64±0.07##ΔΔ	22.12±0.21##*
药效组分高剂量组	1.37±0.08***	23.07±0.9***
供试品1低剂量组	1.73±0.07##ΔΔ	18.68±0.48***Δ
供试品1中剂量组	1.55±0.07##Δ	21.58±0.92##*
供试品1高剂量组	1.34±0.05***	23.45±0.69***

[0087] 6.4 对 Be1-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

[0088] 表 4 供试品 1 对肝细胞内 TBA、CHO 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0089]

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 $\Delta\Delta$	255.6±4.65** $\Delta\Delta$
药效组分中剂量组	6.41±0.13***	228.7±24** $\Delta\Delta$
药效组分高剂量组	6.86±0.04***	178.2±3.65** $\Delta\Delta$
供试品1低剂量组	6.01±0.23 Δ	460.9±50.35**
供试品1中剂量组	6.24±0.03**	391.7±2.8**
供试品1高剂量组	6.82±0.03*** Δ	278.2±25** $\Delta\Delta$ *** Δ

[0090] 6.5 统计分析及生物效价比计算

[0091] (1) 抗氧化指标

[0092] ① Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定:低、中、高剂量组的供试品 1 均可以提高损伤的 HUVEC 细胞活力。三个剂量组的细胞活力 A 值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $0.375/0.415 \times 100\% = 90.36\%$ 、效价比 2 = $0.475/0.472 \times 100\% = 100.64\%$ 、效价比 3 = $0.522/0.513 \times 100\% = 101.75\%$ 。

[0093] ② Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定:中、高剂量组的供试品 1 可以增加损伤的 HUVEC 的 NO 的分泌,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 2 = $4.26/4.82 \times 100\% = 88.38\%$ 、效价比 3 = $5.19/5.93 \times 100\% = 87.52\%$ 。高剂量组的供试品 1 可以降低损伤的 HUVEC 的 ET-1 含量,与降脂宁药效组分中剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 3 = $7.75/7.87 \times 100\% = 98.48\%$ 。

[0094] ③ Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定:低、中、高剂量组的供试品 1 均可以减少损伤的 HUVEC 的 MDA 含量,三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $1.73/1.85 \times 100\% = 93.51\%$ 、效价比 2 = $1.55/1.64 \times 100\% = 94.51\%$ 、效价比 3 = $1.34/1.37 \times 100\% = 97.81\%$ 。三个剂量组的供试品 1 均可以提高损伤的 HUVEC 的 SOD 活力,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $18.68/18.9 \times 100\% = 98.84\%$ 、效价比 2 =

21.58/22.12×100%=97.56%、效价比3=23.45/23.07×100%=101.65%。

[0095] (2) 代谢物含量指标

[0096] ① Be1-7402 肝细胞内 CHO 含量测定：低、中、高剂量组的供试品 1 均可以降低细胞内 CHO 含量，其中高剂量组与降脂宁药效组分低剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 3 = 278.2/255.6×100% = 108.84%。

[0097] ② Be1-7402 肝细胞内 TBA 含量测定：中、高剂量组的供试品 1 可以升高细胞内 TBC 含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 2 = 6.24/6.41×100% = 97.35%、效价比 3 = 6.82/6.86×100% = 99.42%。

[0098] 实施例 2

[0099] 1. 药效组分制备：同实施例 1。

[0100] 2. 供试品制备：同实施例 1。

[0101] 3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。

[0102] 4. 实验分组：同实施例 1。

[0103] 5. 实验方法：同实施例 1。

[0104] 6. 结果

[0105] 6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0106] 表 5 供试品 2 对内皮细胞活力的影响 (X±s, n = 4)

[0107]

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***★	80.41%
供试品2低剂量组	0.463±0.02***	72.57%
供试品2中剂量组	0.492±0.02***	77.12%
供试品2高剂量组	0.512±0.04***	80.25%

[0108] 注：VS 对照组：*P < 0.05, **P < 0.01；VS Ox-LDL 组：#P < 0.05, ##P < 0.01；VS

[0109] 阿托伐他汀组：△P < 0.05, △△P < 0.01；VS 低剂量组：★P < 0.05, ★★P < 0.01；

[0110] VS 中剂量组：▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01。下表同。

[0111] 6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

[0112] 表 6 供试品 2 对内皮细胞 NO、ET-1 含量的影响 (X±s, n = 3)

[0113]

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08 \pm 0.32	8.22 \pm 1.19
Ox-LDL组	2.41 \pm 0.26**	14.80 \pm 1.68**
阿托伐他汀组	5.00 \pm 0.45##	7.21 \pm 0.88##
药效组分低剂量组	4.63 \pm 0.26##	10.99 \pm 1.78
药效组分中剂量组	4.82 \pm 0.26##	7.87 \pm 0.84##
药效组分高剂量组	5.93 \pm 0.26####**▲	5.20 \pm 1.07##**
供试品2低剂量组	3.71 \pm 0.26## $\Delta\Delta$	10.15 \pm 0.56#
供试品2中剂量组	4.08 \pm 0.26##	8.42 \pm 0.86##
供试品2高剂量组	4.63 \pm 0.26##	6.17 \pm 0.30##*

[0114] 6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0115] 表 7 供试品 2 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0116]

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46 \pm 0.07	24.21 \pm 0.47
Ox-LDL组	2.49 \pm 0.15**	15.69 \pm 1.53**
阿托伐他汀组	1.15 \pm 0.04##	21.53 \pm 0.35##
药效组分低剂量组	1.85 \pm 0.24## $\Delta\Delta$	18.9 \pm 0.47**#
药效组分中剂量组	1.64 \pm 0.07## Δ	22.12 \pm 0.21##*
药效组分高剂量组	1.37 \pm 0.08##*	23.07 \pm 0.9##**
供试品2低剂量组	1.76 \pm 0.08## $\Delta\Delta$	19.04 \pm 0.76***
供试品2中剂量组	1.49 \pm 0.04##	20.9 \pm 0.5***
供试品2高剂量组	1.48 \pm 0.15##	22.65 \pm 0.85##**

[0117] 6.4 对 Be1-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

[0118] 表 8 供试品 2 对肝细胞内 TBA、CHO 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0119]

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58 \pm 0.23	683.1 \pm 29.54
阿托伐他汀组	6.6 \pm 0.26**	479.1 \pm 45.59**
药效组分低剂量组	5.81 \pm 0.1 $\Delta\Delta$	255.6 \pm 4.65** $\Delta\Delta$
药效组分中剂量组	6.41 \pm 0.13**	228.7 \pm 24** $\Delta\Delta$
药效组分高剂量组	6.86 \pm 0.04***	178.2 \pm 3.65** $\Delta\Delta$
供试品2低剂量组	6.12 \pm 0.46	463.9 \pm 25.35**
供试品2中剂量组	6.55 \pm 0.03*	364.2 \pm 15.1** $\Delta\Delta$ *
供试品2高剂量组	6.63 \pm 0.46*** Δ	180.7 \pm 23.65** $\Delta\Delta$ ** Δ *

[0120] 6.5 统计分析 & 生物效价比计算

[0121] (1) 抗氧化指标

[0122] ① Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品 2 均可以提高损伤的 HUVEC 细胞活力。三个剂量组的细胞活力 A 值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比 1 = 0.463/0.415 \times 100% = 111.57%、效价比 2 =

$0.492/0.472 \times 100\% = 104.24\%$ 、效价比 3 = $0.512/0.513 \times 100\% = 99.81\%$ 。

[0123] ② Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定：低、中、高剂量组的供试品 2 均可以增加损伤的 HUVEC 细胞 NO 的分泌，其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 1 = $3.71/4.63 \times 100\% = 80.13\%$ 、效价比 2 = $4.08/4.82 \times 100\% = 84.65\%$ 。低、中、高剂量组的供试品 2 可以降低损伤的 HUVEC 细胞 ET-1 含量，其中中、高剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 2 = $8.42/7.87 \times 100\% = 106.99\%$ 、效价比 3 = $6.17/5.2 \times 100\% = 118.65\%$ 。

[0124] ③ Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定：低、中、高剂量组的供试品 2 均可以减少损伤的 HUVEC 的 MDA 含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 1 = $1.76/1.85 \times 100\% = 95.14\%$ 、效价比 2 = $1.49/1.64 \times 100\% = 90.85\%$ 、效价比 3 = $1.48/1.37 \times 100\% = 108.03\%$ 。三个剂量组的供试品 2 均可以提高损伤的 HUVEC 的 SOD 活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 1 = $19.04/18.9 \times 100\% = 100.74\%$ 、效价比 2 = $20.9/22.12 \times 100\% = 94.48\%$ 、效价比 3 = $22.65/23.07 \times 100\% = 98.18\%$ 。

[0125] (2) 代谢物含量指标

[0126] ① Be1-7402 肝细胞内 CHO 含量测定：低、中、高剂量组的供试品 2 均可以降低细胞内 CHO 含量，其中高剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 3 = $180.7/178.2 \times 100\% = 101.4\%$ 。

[0127] ② Be1-7402 肝细胞内 TBA 含量测定：中、高剂量组的供试品 2 可以升高细胞内 TBC 含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比 2 = $6.55/6.41 \times 100\% = 102.18\%$ 、效价比 3 = $6.63/6.86 \times 100\% = 96.65\%$ 。

[0128] 实施例 3

[0129] 1. 药效组分制备：同实施例 1。

[0130] 2. 供试品制备：同实施例 1。

[0131] 3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。

[0132] 4. 实验分组：同实施例 1。

[0133] 5. 实验方法：同实施例 1。

[0134] 6. 结果

[0135] 6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0136] 表 9 供试品 3 对内皮细胞活力的影响 ($X \pm s, n = 4$)

[0137]

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***★	80.41%
供试品3低剂量组	0.441±0.02***	69.12%
供试品3中剂量组	0.468±0.01***	73.35%
供试品3高剂量组	0.535±0.03***△★	83.86%

[0138] 注:VS 对照组: *P < 0.05, **P < 0.01; VS Ox-LDL 组: #P < 0.05, ##P < 0.01; VS

[0139] 阿托伐他汀组: △P < 0.05, △△P < 0.01; VS 低剂量组: ★P < 0.05, ★★P < 0.01;

[0140] VS 中剂量组: ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01。下表同。

[0141] 6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

[0142] 表 10 供试品 3 对内皮细胞 NO、ET-1 含量的影响 (X±s, n = 3)

[0143]

组别	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45##	7.21±0.88##
药效组分低剂量组	4.63±0.26##	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26##	7.87±0.84##
药效组分高剂量组	5.93±0.26***★▲	5.20±1.07***★
供试品3低剂量组	4.08±0.26##	11.1±0.99
供试品3中剂量组	4.63±0.26##	9.21±0.94##
供试品3高剂量组	5.00±0.00##	5.45±0.94***★

[0144] 6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0145] 表 11 供试品 3 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 (X±s, n = 3)

[0146]

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15**	15.69±1.53**
阿托伐他汀组	1.15±0.04##	21.53±0.35##
药效组分低剂量组	1.85±0.24## $\Delta\Delta$	18.9±0.47**
药效组分中剂量组	1.64±0.07## Δ	22.12±0.21##
药效组分高剂量组	1.37±0.08##*	23.07±0.9##**
供试品3低剂量组	1.70±0.15## $\Delta\Delta$	18.77±1.14**
供试品3中剂量组	1.67±0.11## Δ	21.13±0.86##
供试品3高剂量组	1.52±0.08##	23.94±1.59##**

[0147] 6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

[0148] 表 12 供试品 3 对肝细胞内 TBA、CHO 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0149]

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 $\Delta\Delta$	255.6±4.65** $\Delta\Delta$
药效组分中剂量组	6.41±0.13**	228.7±24** $\Delta\Delta$
药效组分高剂量组	6.86±0.04***	178.2±3.65** $\Delta\Delta$ *
供试品3低剂量组	6.16±0.02*	269.6±4.25** $\Delta\Delta$
供试品3中剂量组	6.43±0.07**	196.1±26.85** $\Delta\Delta$
供试品3高剂量组	7.89±0.21** $\Delta\Delta$ ** $\Delta\Delta$	135.8±1.8** $\Delta\Delta$ **

[0150] 6.5 统计分析 & 生物效价比计算

[0151] (1) 抗氧化指标

[0152] ① Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定: 低、中、高剂量组的供试品 3 均可以提高损伤的 HUVEC 细胞活力。三个剂量组的细胞活力 A 值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异, 效价比 1 = $0.441/0.415 \times 100\% = 106.27\%$ 、效价比 2 = $0.468/0.472 \times 100\% = 99.15\%$ 、效价比 3 = $0.535/0.513 \times 100\% = 104.29\%$ 。

[0153] ② Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定: 低、中、高剂量组的供试品 3 均可以增加损伤的 HUVEC 细胞 NO 的分泌, 三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异, 效价比 1 = $4.08/4.63 \times 100\% = 88.12\%$ 、效价比 2 = $4.63/4.82 \times 100\% = 96.06\%$ 、效价比 3 = $5.00/5.93 \times 100\% = 84.32\%$ 。中、高剂量组的供试品 3 可以降低损伤的 HUVEC 细胞 ET-1 含量, 与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异, 效价比 2 = $9.21/7.87 \times 100\% = 117.03\%$ 、效价比 3 = $5.45/5.2 \times 100\% = 104.81\%$ 。

[0154] ③ Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定: 低、中、高剂量组的供试品 3 均可以减少损伤的 HUVEC 的 MDA 含量, 三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异, 效价比 1 = $1.7/1.85 \times 100\% = 91.89\%$ 、效价

比 2 = $1.67/1.64 \times 100\% = 101.83\%$ 、效价比 3 = $1.52/1.37 \times 100\% = 110.95\%$ 。中、高剂量组的供试品 3 可以提高损伤的 HUVEC 的 SOD 活力,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 2 = $21.13/22.12 \times 100\% = 95.52\%$ 、效价比 3 = $23.94/23.07 \times 100\% = 103.77\%$ 。

[0155] (2) 代谢物含量指标

[0156] ① Be1-7402 肝细胞内 CHO 含量测定:低、中、高剂量组的供试品 3 均可以降低细胞内 CHO 含量,其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $269.6/255.6 \times 100\% = 105.48\%$ 、效价比 2 = $196.1/228.7 \times 100\% = 85.75\%$ 。

[0157] ② Be1-7402 肝细胞内 TBA 含量测定:中、高剂量组的供试品 3 可以升高细胞内 TBA 含量,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 2 = $6.43/6.41 \times 100\% = 100.31\%$ 、效价比 3 = $7.89/6.86 \times 100\% = 115.01\%$ 。

[0158] 实施例 4

[0159] 1. 药效组分制备:同实施例 1。

[0160] 2. 供试品制备:同实施例 1。

[0161] 3. 细胞培养及模型制备:同实施例 1。

[0162] 4. 实验分组:同实施例 1。

[0163] 5. 实验方法:同实施例 1。

[0164] 6. 结果

[0165] 6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0166] 表 13 供试品 4 对内皮细胞活力的影响 ($X \pm s, n = 4$)

[0167]

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***	80.41%
供试品4低剂量组	0.413±0.05***	64.73%
供试品4中剂量组	0.447±0.05***	70.06%
供试品4高剂量组	0.544±0.04***	85.27%

[0168] 注:VS 对照组:*P < 0.05, **P < 0.01;VS Ox-LDL 组:#P < 0.05, ##P < 0.01;VS

[0169] 阿托伐他汀组:△P < 0.05, △△P < 0.01;VS 低剂量组:★P < 0.05, ★★P < 0.01;

[0170] VS 中剂量组:▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01。下表同。

[0171] 6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

[0172] 表 14 供试品 4 对内皮细胞 NO、ET-1 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0173]

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08 \pm 0.32	8.22 \pm 1.19
Ox-LDL组	2.41 \pm 0.26**	14.80 \pm 1.68**
阿托伐他汀组	5.00 \pm 0.45##	7.21 \pm 0.88##
药效组分低剂量组	4.63 \pm 0.26##	10.99 \pm 1.78
药效组分中剂量组	4.82 \pm 0.26##	7.87 \pm 0.84##
药效组分高剂量组	5.93 \pm 0.26**** Δ	5.20 \pm 1.07##*
供试品4低剂量组	3.71 \pm 0.26# Δ	12.51 \pm 2.56 Δ
供试品4中剂量组	4.45 \pm 0.45##	9.29 \pm 1.21#
供试品4高剂量组	5.19 \pm 0.26****	5.83 \pm 0.86****

[0174] 6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0175] 表 15 供试品 4 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0176]

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46 \pm 0.07	24.21 \pm 0.47
Ox-LDL组	2.49 \pm 0.15**	15.69 \pm 1.53**
阿托伐他汀组	1.15 \pm 0.04##	21.53 \pm 0.35###
药效组分低剂量组	1.85 \pm 0.24## $\Delta\Delta$	18.9 \pm 0.47**** Δ
药效组分中剂量组	1.64 \pm 0.07## $\Delta\Delta$	22.12 \pm 0.21##*
药效组分高剂量组	1.37 \pm 0.08****	23.07 \pm 0.9****
供试品4低剂量组	1.73 \pm 0.07## $\Delta\Delta$	19.76 \pm 0.38***
供试品4中剂量组	1.37 \pm 0.08##	21.56 \pm 0.73###
供试品4高剂量组	1.30 \pm 0.05****	23.12 \pm 0.34****

[0177] 6.4 对 Be1-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

[0178] 表 16 供试品 4 对肝细胞内 TBA、CHO 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0179]

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58 \pm 0.23	683.1 \pm 29.54
阿托伐他汀组	6.6 \pm 0.26*	479.1 \pm 45.59**
药效组分低剂量组	5.81 \pm 0.1	255.6 \pm 4.65** $\Delta\Delta$
药效组分中剂量组	6.41 \pm 0.13*	228.7 \pm 24** $\Delta\Delta$
药效组分高剂量组	6.86 \pm 0.04***	178.2 \pm 3.65** $\Delta\Delta$
供试品4低剂量组	6.22 \pm 0.53	271.8 \pm 6.55** $\Delta\Delta$
供试品4中剂量组	6.26 \pm 0.18	192.9 \pm 32.1** $\Delta\Delta$ *
供试品4高剂量组	6.66 \pm 0.58*	120.8 \pm 8.1** $\Delta\Delta$ **

[0180] 6.5 统计分析及生物效价比计算

[0181] (1) 抗氧化指标

[0182] ① Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定:低、中、高剂量组的供试品 4 均可以提高损伤的 HUVEC 细胞活力。三个剂量组的细胞活力 A 值分别与降脂宁药效组分相应剂量

组的效应值相比无显著性差异,效价比 $1 = 0.413/0.415 \times 100\% = 99.52\%$ 、效价比 $2 = 0.447/0.472 \times 100\% = 94.7\%$ 、效价比 $3 = 0.544/0.513 \times 100\% = 106.04\%$ 。

[0183] ② Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定:低、中、高剂量组的供试品 4 均可以增加损伤的 HUVEC 细胞 NO 的分泌,三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $1 = 3.71/4.63 \times 100\% = 80.13\%$ 、效价比 $2 = 4.45/4.82 \times 100\% = 92.32\%$ 、效价比 $3 = 5.19/5.93 \times 100\% = 87.52\%$ 。中、高剂量组的供试品 4 可以降低损伤的 HUVEC 细胞 ET-1 含量,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $2 = 9.29/7.87 \times 100\% = 118.04\%$ 、效价比 $3 = 5.83/5.2 \times 100\% = 112.12\%$ 。

[0184] ③ Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定:低、中、高剂量组的供试品 4 均可以减少损伤的 HUVEC 的 MDA 含量,三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $1 = 1.73/1.85 \times 100\% = 93.51\%$ 、效价比 $2 = 1.37/1.64 \times 100\% = 83.54\%$ 、效价比 $3 = 1.39/1.37 \times 100\% = 101.46\%$ 。三个剂量组的供试品 4 均可以提高损伤的 HUVEC 的 SOD 活力,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $1 = 19.76/18.9 \times 100\% = 104.55\%$ 、效价比 $2 = 21.56/22.12 \times 100\% = 97.47\%$ 、效价比 $3 = 23.12/23.07 \times 100\% = 100.22\%$ 。

[0185] (2) 代谢物含量指标

[0186] ① Be1-7402 肝细胞内 CHO 含量测定:低、中、高剂量组的供试品 4 均可以降低细胞内 CHO 含量,其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $1 = 271.8/255.6 \times 100\% = 106.34\%$ 、效价比 $2 = 192.9/228.7 \times 100\% = 84.35\%$ 。

[0187] ② Be1-7402 肝细胞内 TBA 含量测定:中、高剂量组的供试品 4 可以升高细胞内 TBC 含量,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 $2 = 6.26/6.41 \times 100\% = 97.66\%$ 、效价比 $3 = 6.66/6.86 \times 100\% = 97.08\%$ 。

[0188] 实施例 5

[0189] 1. 药效组分制备:同实施例 1。

[0190] 2. 供试品制备:同实施例 1。

[0191] 3. 细胞培养及模型制备:同实施例 1。

[0192] 4. 实验分组:同实施例 1。

[0193] 5. 实验方法:同实施例 1。

[0194] 6. 结果

[0195] 6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

[0196] 表 17 供试品 5 对内皮细胞活力的影响 ($X \pm s, n = 4$)

[0197]

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02 ^{**}	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02 ^{***}	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02 ^{***}	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04 ^{***}	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06 ^{***★}	80.41%
供试品5低剂量组	0.409±0.02 ^{***}	64.1%
供试品5中剂量组	0.466±0.03 ^{***}	73.04%
供试品5高剂量组	0.527±0.02 ^{***△★★}	82.52%

[0198] 注:VS 对照组: *P < 0.05, **P < 0.01; VS Ox-LDL 组: #P < 0.05, ##P < 0.01; VS

[0199] 阿托伐他汀组: ^P < 0.05, ^^P < 0.01; VS 低剂量组: ★P < 0.05, ★★P < 0.01;

[0200] VS 中剂量组: ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01。下表同。

[0201] 6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

[0202] 表 18 供试品 5 对内皮细胞 NO、ET-1 含量的影响 (X±s, n = 3)

[0203]

组别	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26 ^{**}	14.80±1.68 ^{**}
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}
药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{***★▲}	5.20±1.07 ^{***★}
供试品5低剂量组	3.77±0.26 ^{#Δ}	10.99±1.46
供试品5中剂量组	4.08±0.26 ^{##}	9.03±1.36 ^{##}
供试品5高剂量组	5.09±0.45 ^{***★}	5.75±0.66 ^{***★}

[0204] 6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

[0205] 表 19 供试品 5 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 (X±s, n = 3)

[0206]

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15 ^{**}	15.69±1.53 ^{**}
阿托伐他汀组	1.15±0.04 ^{##}	21.53±0.35 ^{***}
药效组分低剂量组	1.85±0.24 ^{###Δ}	18.9±0.47 ^{***Δ}
药效组分中剂量组	1.64±0.07 ^{###Δ}	22.12±0.21 ^{***★}
药效组分高剂量组	1.37±0.08 ^{***★}	23.07±0.9 ^{***★}
供试品5低剂量组	1.85±0.24 ^{###Δ}	19.67±0.3 ^{***}
供试品5中剂量组	1.58±0.04 ^{##}	22.55±0.34 ^{***★}
供试品5高剂量组	1.37±0.08 ^{***★}	24.24±0.6 ^{###Δ★★}

[0207] 6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

[0208] 表 20 供试品 5 对肝细胞内 TBA、CHO 含量的影响 ($X \pm s, n = 3$)

[0209]

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 [△]	255.6±4.65** ^{△△}
药效组分中剂量组	6.41±0.13**	228.7±24** ^{△△}
药效组分高剂量组	6.86±0.04***	178.2±3.65** ^{△△}
供试品 5 低剂量组	6.23±0.07	262.9±1.1** ^{△△}
供试品 5 中剂量组	7.17±0.21***	143±3.55** ^{△△*}
供试品 5 高剂量组	7.27±0.57***	120.3±1.85** ^{△△**}

[0210] 6.5 统计分析及生物效价比计算

[0211] (1) 抗氧化指标

[0212] ① Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力测定:低、中、高剂量组的供试品 5 均可以提高损伤的 HUVEC 细胞活力。三个剂量组的细胞活力 A 值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $0.409/0.415 \times 100\% = 98.55\%$ 、效价比 2 = $0.466/0.472 \times 100\% = 98.73\%$ 、效价比 3 = $0.527/0.513 \times 100\% = 102.73\%$ 。

[0213] ② Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量测定:低、中、高剂量组的供试品 5 均可以增加损伤的 HUVEC 细胞 NO 的分泌,三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $3.77/4.63 \times 100\% = 81.43\%$ 、效价比 2 = $4.08/4.82 \times 100\% = 84.65\%$ 、效价比 3 = $5.09/5.93 \times 100\% = 85.83\%$ 。中、高剂量组的供试品 5 可以降低损伤的 HUVEC 细胞 ET-1 含量,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 2 = $9.03/7.87 \times 100\% = 114.74\%$ 、效价比 3 = $5.75/5.2 \times 100\% = 110.58\%$ 。

[0214] ③ Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力测定:低、中、高剂量组的供试品 5 均可以减少损伤的 HUVEC 的 MDA 含量,三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $1.85/1.85 \times 100\% = 100\%$ 、效价比 2 = $1.58/1.64 \times 100\% = 96.34\%$ 、效价比 3 = $1.37/1.37 \times 100\% = 100\%$ 。三个剂量组的供试品 5 均可以提高损伤的 HUVEC 的 SOD 活力,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $19.67/18.9 \times 100\% = 104.07\%$ 、效价比 2 = $22.55/22.12 \times 100\% = 101.94\%$ 、效价比 3 = $24.24/23.07 \times 100\% = 105.07\%$ 。

[0215] (2) 代谢物含量指标

[0216] ① Be1-7402 肝细胞内 CHO 含量测定:低、中、高三个剂量组的供试品 5 均可以降低细胞内 CHO 含量,其中低剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 1 = $262.9/228.7 \times 100\% = 114.95\%$ 。

[0217] ② Be1-7402 肝细胞内 TBA 含量测定:中、高剂量组的供试品 5 可以升高细胞内 TBC 含量,与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异,效价比 2 = $7.17/6.41 \times 100\% = 111.86\%$ 、效价比 3 = $7.27/6.86 \times 100\% = 105.98\%$ 。

专利名称(译)	一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法		
公开(公告)号	CN101590128B	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN200910141969.X	申请日	2009-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	刘斌		
申请(专利权)人(译)	刘斌		
当前申请(专利权)人(译)	刘斌		
[标]发明人	刘斌 姜艳艳 王伟 石任兵 杨英		
发明人	刘斌 姜艳艳 王伟 石任兵 杨英		
IPC分类号	G01N1/28 G01N21/31 G01N33/53 G01N30/36 A61K36/734 A61P39/06 A61P3/06		
代理人(译)	刘伟		
审查员(译)	刘瑞华		
其他公开文献	CN101590128A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。该评价方法主要包括药效组分制备、供试品制备、调脂抗氧化生物效应测定、供试品生物效价比计算及统计学分析、供试品质量评价等。药效组分包括2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚和槲皮素, 其质量比为7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5。质量评价指标包括:(1)抗氧化指标: Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力, Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量, Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力;(2)代谢物含量指标: Bel-7402肝细胞内胆固醇含量, Bel-7402肝细胞内外TBA含量。质量评价标准为: 生物效价比在80%~120%之间, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为合格品; 生物效价比<80%, 或经统计学检验与效应标准有显著性差异, 为不合格品; 生物效价比>120%, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为优质品。

组别	OD值	细胞活力(%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***	80.41%
供试品1低剂量组	0.375±0.06**	58.77%
供试品1中剂量组	0.475±0.03***	74.45%
供试品1高剂量组	0.522±0.04***	81.82%