

• 药理与临床 •

丹参茎叶提取物抗氧化活性物质基础与量效关系研究

曾慧婷^{1,2}, 宿树兰^{1*}, 沙秀秀¹, 尚尔鑫¹, 朱振华¹, 郭盛¹, 严辉¹, 钱大玮¹, 段金庵^{1*}1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心
国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 江苏 南京 210023

2. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330046

摘要: 目的 以7月份和12月份采收丹参茎叶的水提物和醇提物为研究对象, 评价丹参茎叶提取物的抗氧化效应, 并探讨丹参茎叶提取物抗氧化活性的物质基础。方法 采用超高效液相-三重四级杆质谱联用技术(UPLC-TQ/MS)对各提取物中化学成分进行定性定量分析, 明确丹参茎叶提取物中主要丹酚酸类化合物(丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B), 基于1,1-二苯基-2-三硝基苦肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除法和铁还原/抗氧化能力(FRAP)法对丹参茎叶提取物进行抗氧化活性评价, 同时以市售丹参(根及根茎)样品作对照。结果 7月份采收丹参茎叶水提物(SY-7)抗氧化活性最强, 且总酚酸的量最高(75.663 mg/g), 其次为7月份采收丹参茎叶醇提物(CY-7), 市售丹参提取物抗氧化活性及总酚酸的量均低于7月份采收丹参茎叶提取物。丹酚酸单体化合物丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B均具有明显抗氧化、清除自由基能力, 且表现出明显的量效关系。结论 丹参茎叶水提物和醇提物具有较强的体外抗氧化活性, 且含有丰富的丹酚酸类化合物, 其中含有的丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B具有明显抗氧化活性。

关键词: 丹参茎叶; 丹参; 丹酚酸; 抗氧化活性; 丹参素; 咖啡酸; 迷迭香酸; 丹酚酸B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4688-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.015

Study on chemical constituents and dose-effect correlation of anti-oxidative activities among extracts of stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*ZENG Hui-ting^{1,2}, SU Shu-lan¹, SHA Xiu-xiu¹, SHANG Er-xin¹, ZHU Zhen-hua¹, GUO Sheng¹, YAN Hui¹,
QIAN Da-wei¹, DUAN Jin-ao¹

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, and Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-oxidative effect and chemical constituents of stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* (SMSL) collected in July and December, water extracts and alcohol extracts of SMSL collected in July and December were taken as the subject, therefore provide scientific basis for the comprehensive development and utilization of SMSL. **Methods** The chemical constituents in the extracts were identified and determined by Ultra-high performance liquid chromatography combined with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-TQ/MS), then confirmed the main salvianolic acids (danshensu, caffeic acid, rosmarinic acid, and salvianolic acid B) as the material basis of anti-oxidant activity of SMSL. Moreover, based on the anti-oxidant activity evaluation index: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) free radical scavenging and iron reduction/anti-oxidant capacity (FRAP), anti-oxidant activity of SMSL was

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673533); 江苏省“333 高层次人才培养工程”资助项目(BRA2015391); 江苏省高校中医学优势学科II期建设项目(ysxk-2014)**作者简介:** 曾慧婷, 研究实习员。E-mail: zenght1991@163.com***通信作者** 宿树兰, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源化学及方剂功效物质基础研究。E-mail: sushulan1974@163.com
段金庵, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源化学与资源循环利用。E-mail: dja@njucm.edu.cn

evaluated. Meanwhile *Salvia Miltiorrhiza Radix et Rhizoma* (SM) from market was used to be control. **Results** It showed that the water extracts of SMSL in July possessed strong anti-oxidant activities, and the total salvianolic acids with the content of 75.663 mg/g was the highest; Followed by the alcohol extracts of SMSL in July, anti-oxidant activity and total phenolic acid contents of SM extracts were all lower than that of SMSL in July. Danshensu, caffeic acid, rosmarinic acid, and salvianolic acid B showed obvious anti-oxidative activities and significant dose-dependent effect in scavenging free radicals. **Conclusion** It revealed that SMSL possessed strong *in vitro* anti-oxidant activity. Additionally, it is shown that SMSL was rich in salvianolic acids, in which danshensu, caffeic acid, rosmarinic acid, and salvianolic acid B also had obvious anti-oxidant activity.

Key words: stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*; *Salvia Miltiorrhiza Radix et Rhizoma*; salvianolic acids; anti-oxidant activity; danshensu; caffeic acid; rosmarinic acid; salvianolic acid B

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 为唇形科鼠尾草属植物, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效^[1]。丹参作为传统中药中常用药物之一, 在我国已有近 2 000 年的临床应用历史, 以丹参为主要原料研制的复方丹参滴丸已成为首例美国 FDA III 期临床试验中成药。近年来随着丹参野生资源的减少及社会需求量的增大, 人们在寻找新药源的过程中发现丹参地上茎叶作为丹参非传统药用部位, 与根具有相似的活性成分及药理作用, 其化学成分主要为水溶性的丹酚酸类成分, 包括丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 等^[2-4]。研究发现丹参茎叶具有活血化瘀、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、改善糖尿病糖代谢紊乱等药理作用^[5-7]。

丹酚酸为一类具有酚羟基或邻二酚羟基的多聚酚酸类化合物, 历年来通过对丹参中酚酸类成分的深入研究, 证明其在丹参中占有重要的地位。由于其水溶性特点而容易被人体吸收, 大多数都具有显著抗氧化活性, 可清除超氧阴离子和羟基自由基, 抑制脂质过氧化^[8], 其抗氧化活性与表现出的多方面药理作用如改善血液循环、抗血栓、抗动脉粥样硬化、促进组织恢复等有着密切关系, 是丹参治疗心血管疾病的主要药效物质基础^[9-11]。本研究以清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基和还原 Fe^{3+} 能力为药效评价指标, 比较 7 月份和 12 月份采收的丹参茎叶水提物和醇提物之间的抗氧化活性; 同时结合超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用技术 (UPLC-TQ/MS) 对丹参茎叶提取物进行定量分析, 并以市售丹参药材作为对照。此外, 分析了丹参茎叶提取物中主要丹酚酸类化合物 (丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B) 的抗氧化活性, 比较各提取物及主要丹酚酸类化合物抗氧化活性量效关系特点, 为丹参地上茎叶的资源价值发现、资源化利用与产业化开发提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC 系统 (包括四元泵溶剂系统、在线脱气机和自动进样器, Waters 公司); Xevo 质谱检测器 (Waters 公司); MassLynxTM 质谱工作站软件 (Waters 公司); Enspire 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); TDL-240B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); EPED 超纯水系统 (南京易普易达科技发展有限公司); DSY-9002 高速万能粉碎机 (永康市九顺莹商贸有限公司); ML204/02、MS205 电子天平 (上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.2 药品、试剂与药材

对照品原儿茶醛 (批号 110810-200506)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、阿魏酸 (批号 110773-201012)、迷迭香酸 (批号 111871-201203)、丹参酮 II_A (批号 110766-201520)、隐丹参酮 (批号 110852-200806) 均购自中国食品药品检定研究院质量分数均大于 98%; 紫草酸 (批号 MUST-15022407)、丹酚酸 B (批号 MUST-13030203)、丹酚酸 A (批号 MUST-13030701)、丹参素 (批号 MUST-13030108)、二氢丹参酮 I (批号 MUST-15020102)、丹参酮 I (批号 MUST-14050701) 均购自北京普天同创生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%; DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)、三吡啶三嗪 (TPTZ)、抗坏血酸 (Vc) 均购自美国 Sigma 公司; 超纯水 (实验室自制); 甲酸、乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯。

丹参茎叶样品分别于 2014 年 7 月和 12 月采自南京中医药大学药用植物园 (江苏南京), 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科鼠尾草属植

物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥茎叶；丹参（根及根茎）样品购于山东长清丹参种植基地，经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。样品于 50 ℃ 烘干，粉碎过 40 目筛，常温干燥保存备用。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 水提物的制备 分别取 7 月份采收丹参茎叶（Y-7）、12 月份采收丹参茎叶（Y-12）和丹参根及根茎（G）粉末（过 40 目筛）50 g，1:10 加入蒸馏水 500 mL，浸泡过夜，超声提取 3 次，每次 40 min，分别离心取上清液，合并上清液。将水提液减压浓缩至生药质量浓度约为 1 g/mL，缓慢搅拌下加入一定量 95% 乙醇，使药液乙醇体积分数为 80%，4 ℃ 冷藏 24 h，抽滤，滤液减压浓缩，烘干至恒定质量，分别得到 7 月份采收丹参茎叶水提物（SY-7）、12 月份采收丹参茎叶水提物（SY-12）和丹参水提物（SG）。

2.1.2 醇提物的制备 取水提后的药渣，用 80% 乙醇加热回流，1:10 提取 3 次，每次 2 h，分别滤过，合并滤液，减压浓缩，烘干至恒定质量，分别得 7 月份采收丹参茎叶醇提物（CY-7）、12 月份采收丹参茎叶醇提物（CY-12）和丹参醇提物（CG）。

2.2 对照品溶液的制备

取干燥至恒定质量的各对照品适量，精密称定，置 10 mL 量瓶中，以少量 90% 甲醇溶解，定容至刻度，摇匀，制得丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 和丹参酮 I 质量浓度分别为 0.108、0.116、0.106、0.101、0.137、0.132、0.211、0.106、0.114、0.111、0.108、0.107 mg/mL 的混合对照品溶液作为储备液，其他不同质量浓度的对照品溶液由储备液依次稀释得到。

2.3 UPLC-TQ/MS 测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0~6 min，97%→70% A；6~7 min，70%→60% A；7~10 min，60%→5% A；10~12 min，5% A；12~13 min，5%→97% A；体积流量 0.4 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 2 μL。

2.3.2 质谱条件 离子化模式：ESI⁻/ESI⁺；检测方

式为多反应监测（MRM）；毛细管电压 3.0 kV；离子源温度 150 ℃；脱溶剂气温度 550 ℃；脱溶剂气体积流量 1 000 L/h；锥孔气体积流量 50 L/h；碰撞气体积流量 0.15 mL/min；UPLC-TQ/MS 离子流色谱图见图 1。

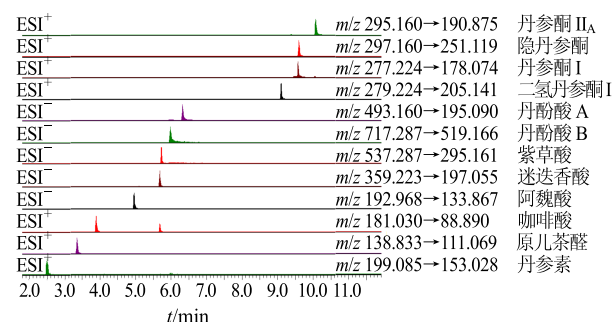


图 1 丹参中 8 种丹酚酸类和 4 种丹参酮类化学成分的 UPLC-TQ/MS 提取离子流图

Fig. 1 UPLC-TQ/MS chromatogram of eight salvianolic acids and four tanshinones in *S. miltiorrhiza*

2.3.3 方法学考察 精密吸取系列混合对照品溶液，按相应 UPLC-TQ/MS 条件检测，以各成分进样质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，得回归方程，结果见表 1。取混合对照品溶液重复进样 6 次，以峰面积为指标计算 RSD ($n=6$)，考察方法精密度。取同一份样品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，以峰面积为指标计算 RSD ($n=6$)，考察样品的稳定性。在已测定各成分质量浓度的样品溶液中加入等量对照品，考察方法的平均回收率 ($n=6$)。结果表明，各成分精密度 $RSD \leq 3.45\%$ ，稳定性 $RSD \leq 4.34\%$ ，平均回收率为 95.64%~104.85%，均符合分析要求。

2.3.4 样品测定分析 供试品溶液由上述提取物溶解得到，在相应条件下进行测定，结果见表 2。SY-7、SY-12、SG、CY-7、CY-12、CG 样品中主要化学组分为 8 种丹酚酸类成分（丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A）及 4 种丹参酮类成分（二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II_A）。丹参酮类成分主要存在于丹参醇提物中，丹参茎叶含极其微量脂溶性丹参酮类成分，但富含水溶性丹酚酸类成分，其中 SY-7 总酚酸量远高于 SG 中总酚酸的量。在整个生长期至 12 月份丹参地上茎叶枯萎，所测 SY-12 和 CY-12 中各成分的量均明显降低，总酚酸量顺序为 SY-7>CY-7>SG>CG>CY-12>SY-12。

表 1 丹参中 8 种丹酚酸类成分和 4 种丹参酮类成分的线性回归方程及线性范围

Table 1 Linear regression equation and linear range of eight salvianolic acids and four tanshinones in *S. miltiorrhiza*

化合物	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
丹参素	$Y=59.442 X+22.513$	0.999 0	0.108~ 54.000
原儿茶醛	$Y=687.57 X-84.93$	0.998 9	0.116~ 58.000
咖啡酸	$Y=1\ 875.1 X-279.46$	0.999 5	0.106~ 53.000
阿魏酸	$Y=1\ 015.6 X-173.17$	0.999 1	0.101~ 50.500
迷迭香酸	$Y=647.47 X-736.1$	0.997 1	0.137~ 68.500
紫草酸	$Y=67.32 X-154.82$	0.996 4	0.132~ 66.000
丹酚酸 B	$Y=306.26 X-525.11$	0.997 0	0.211~105.500
丹酚酸 A	$Y=1\ 025.4 X-559.95$	0.999 1	0.106~ 53.000
二氢丹参酮 I	$Y=15\ 897 X+6\ 139.6$	0.999 0	0.114~ 57.000
丹参酮 I	$Y=4\ 717.3 X+14\ 515$	0.994 6	0.107~ 53.500
隐丹参酮	$Y=26\ 726 X+31\ 570$	0.999 2	0.111~ 55.500
丹参酮 II _A	$Y=17\ 326 X+38\ 793$	0.997 4	0.108~ 54.000

表 2 丹参茎叶提取物中化学成分定量分析

Table 2 Content analysis of chemical composition in extracts from stems and leaves of *S. miltiorrhiza*

提取物	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)												
	丹参素	原儿茶醛	咖啡酸	阿魏酸	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A	二氢丹参酮 I	丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 II _A	总酚酸
SY-7	11.656	0.232	4.724	0.465	4.654	2.804	49.862	1.103	—	0.028	—	—	75.663
SY-12	—	0.343	0.363	0.557	—	2.359	2.669	0.599	—	—	—	—	6.888
SG	3.558	0.309	0.311	0.212	1.209	—	36.635	1.429	0.065	0.110	0.051	—	43.663
CY-7	10.459	0.941	6.472	0.782	4.923	2.891	26.586	1.230	0.019	0.283	0.168	0.020	54.283
CY-12	0.629	0.596	0.780	0.306	1.270	—	3.000	0.756	0.048	—	0.081	—	7.337
CG	7.337	0.634	1.053	0.254	1.304	2.595	18.071	1.337	5.040	29.134	26.144	31.567	32.939

2.4 体外抗氧化活性测定

2.4.1 DPPH 自由基清除率的测定^[12] 在 96 孔板中加入 0.25 mmol/L DPPH 甲醇溶液 100 μL 和不同质量浓度受试样品 100 μL , 混匀, 室温避光反应 30 min 后在 517 nm 波长下测定其吸光度 (A) 值, 计算 DPPH 自由基清除率, 通过清除率曲线计算 DPPH 自由基清除率为 50% 时的受试样品溶液质量浓度 (EC_{50})。实验重复 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A_0 为只加 DPPH 溶液的 A 值, A_1 为受试样品加入 DPPH 反应后的 A 值, A_2 为不加 DPPH 只有受试样品溶液的 A 值

2.4.2 ABTS 自由基清除率的测定^[13] 用去离子水将 ABTS 和过二硫酸钾 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 分别溶解后混合, 使其终浓度分别为 7.4 mmol/L 和 2.6 mmol/L, 室温、避光条件下静置 12~16 h, 得到 ABTS 储备液。测定时用 PBS ($\text{pH}=7.4$)、95% 乙醇或甲醇 1:1 稀释到 734 nm 处 A 值为 0.70 ± 0.02 , 即得 ABTS 工作液 (现配现用)。反应在 96 孔板中进行, 200 μL ABTS 工作液中含有 50 μL 不同质量浓度的受试样品溶

液。振荡摇匀后于室温下避光静置 6 min, 734 nm 下测定溶液 A 值。计算 ABTS 自由基清除率, 通过清除率曲线计算 EC_{50} 。实验重复 3 次。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A_0 为溶剂与 ABTS 工作液作用后的 A 值, A_1 为受试样品与 ABTS 工作液作用后的 A 值, A_2 为受试样品未加 ABTS 工作液时的 A 值

2.4.3 还原 Fe^{3+} 能力测定 (FRAP 法) FRAP 工作液现配现用: 300 mmol/L pH 3.6 的醋酸盐缓冲液 25 mL、10 mmol/L TPTZ 溶液 2.5 mL、20 mmol/L FeCl_3 溶液 2.5 mL 混合而成。900 μL FRAP 工作液中加入 100 μL 不同质量浓度受试样品溶液, 振荡均匀, 在室温下静置 30 min, 取 200 μL 于 96 孔板, 593 nm 处测 A 值, A 值越高, 表明还原 Fe^{3+} 的能力越强^[14-15]。样品抗氧化活性以达到同样 A 值所需的 FeSO_4 的物质的量 (mmol) 表示, 其标准方程为 $Y=11.52 X-0.004\ 3$, $R^2=0.999\ 5$ 。

2.4.4 丹参茎叶提取物抗氧化活性评价 通过以清除 DPPH 自由基、清除 ABTS 自由基及还原 Fe^{3+}

能力测定 (FRAP 法) 为指标, 以 Vc 为阳性对照, 对 6 种样品进行抗氧化能力测定, 见图 2、表 3。结果发现, 6 种丹参提取物对 DPPH 自由基的清除能力顺序为 SY-7>CY-7>CG>SG>CY-12>SY-12, 清除 ABTS 自由基能力顺序为 SY-7>CY-7>SG>CG>CY-12>SY-12, FRAP 总抗氧化能力顺序为 SY-7>

CY-7>SG>CG>CY-12>SY-12。结果显示, 在 3 个抗氧化测定指标下, 与 Vc 相比较, 丹参 6 个受试样品均具有不同程度的抗氧化活性, 在测定范围内, 其抗氧化能力随质量浓度的增大而增强, 呈现出明显的量效关系。抗氧化活性强度变化的整体趋势与定量分析中总酚酸质量分数变化趋势相同。

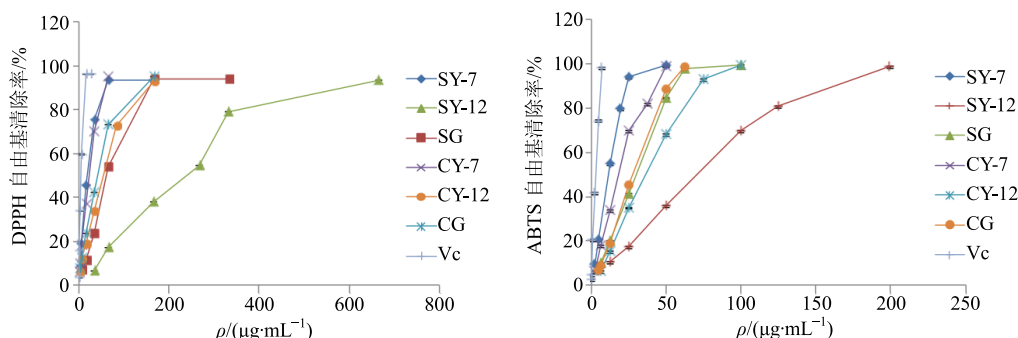


图 2 丹参茎叶提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of extracts from stems and leaves of *S. miltiorrhiza* on scavenging DPPH and ABTS radical ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 3 丹参茎叶提取物抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Anti-oxidant activity of extracts from stems and leaves of *S. miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		所需 FeSO ₄ /mmol					
	DPPH	ABTS	40 μg·mL ⁻¹	20 μg·mL ⁻¹	15 μg·mL ⁻¹	10 μg·mL ⁻¹	8 μg·mL ⁻¹	5 μg·mL ⁻¹
SY-7	19.14 ± 1.43	9.24 ± 0.14	0.148 3	0.073 9	0.055 3	0.036 7	0.029 3	0.018 1
SY-12	240.67 ± 11.92	55.54 ± 1.65	0.012 3	0.006 3	0.004 8	0.003 3	0.002 7	0.001 8
SG	59.03 ± 1.42	22.99 ± 0.86	0.066 2	0.031 8	0.023 2	0.014 6	0.011 1	0.006 0
CY-7	29.69 ± 2.28	14.52 ± 0.74	0.104 8	0.048 9	0.034 9	0.020 9	0.015 4	0.007 0
CY-12	59.35 ± 0.13	28.34 ± 0.83	0.038 2	0.017 9	0.012 8	0.007 7	0.005 6	0.002 6
CG	44.72 ± 1.72	20.39 ± 0.40	0.054 8	0.027 0	0.020 0	0.013 0	0.010 2	0.006 1
Vc	5.67 ± 0.40	2.27 ± 0.06	0.577 0	0.288 3	0.216 2	0.144 0	0.115 1	0.071 9

2.4.5 丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 抗氧化活性比较

6 种提取物成分定量分析结果表明, SY-7、CY-7 中丹酚酸类成分的量相对 SG 和 CG 较高, 且丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 的量最高, 在 SY-7 中分别达到 11.656、4.724、4.654、49.862 mg/g, 4 种丹参酮类单体化合物在 CG 中的量较高, 但通过预试验发现其抗氧化能力均不显著, 因此以 4 种代表性丹酚酸类单体化合物 (丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B) 为研究对象进行抗氧化活性研究。

由图 3、表 4 结果可以看出, 丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 均具有较强的抗氧化能力, 且在一定范围内, 抗氧化能力随质量浓度增大而提

强, 对 ABTS 自由基清除能力的顺序为咖啡酸>迷迭香酸>丹参素>丹酚酸 B, FRAP 总抗氧化能力顺序为咖啡酸≈迷迭香酸>丹参素>丹酚酸 B, 通过与阳性对照 Vc 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的 EC₅₀ 相比较, 发现这 4 种丹酚酸类化合物 (丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B) 抗氧化能力与 Vc 相当。

3 讨论

近年来国内外研究表明, 大多数自由基和活性氧与心血管疾病的发生、发展有着密切关系, 因此寻找抗氧化剂及其抗氧化机制的研究尤为重要, 而丹参用于治疗心脑血管疾病主要通过抗氧化、清除氧自由基, 调节受损机体组织的修复。丹参传统用药部位为丹参根及根茎, 本研究以清除 DPPH 自由

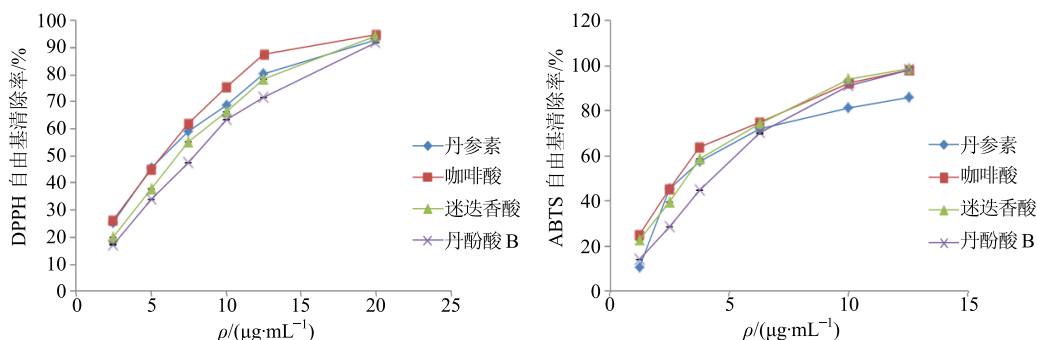


图 3 4 种丹酚酸类化合物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of four kinds of salviolic acids on scavenging DPPH and ABTS radical ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 4 种丹酚酸类化合物抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Anti-oxidant activity of four kinds of salviolic acids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		所需 FeSO ₄ /mol					
	DPPH	ABTS	4 μg·mL ⁻¹	2.5 μg·mL ⁻¹	2 μg·mL ⁻¹	1.5 μg·mL ⁻¹	1 μg·mL ⁻¹	0.5 μg·mL ⁻¹
丹参素	5.51 ± 0.24	3.53 ± 0.24	0.070 7	0.048 3	0.038 7	0.026 5	0.018 4	0.003 9
咖啡酸	4.76 ± 0.04	2.65 ± 0.06	0.083 6	0.055 3	0.039 5	0.030 9	0.021 3	0.010 6
迷迭香酸	6.20 ± 0.25	2.91 ± 0.36	0.084 8	0.056 5	0.041 5	0.032 2	0.020 9	0.010 8
丹酚酸 B	6.99 ± 0.38	3.68 ± 0.31	0.051 0	0.034 7	0.026 2	0.020 6	0.013 5	0.007 0

法)为评价体系,比较 7、12 月份采收的丹参茎叶水提取物及醇提取物抗氧化活性,同时对其化学组分进行定性定量分析,结果发现 7 月份采收的丹参茎叶提取物抗氧化活性最强,且所选取的丹参中主要丹酚酸类单体化合物(丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B)与阳性药 Vc 相比,皆具有很强的体外抗氧化活性,为天然有效的自由基清除剂。从化学结构来分析,丹酚酸类化合物为酚羟基或邻二酚羟基的供体,是其具有抗氧化活性的基本结构,推测丹酚酸类化合物的抗氧化途径主要是通过提供酚羟基上氢质子,生成半醌式的自由基结构,进而破坏自由基氧化链式反应,清除反应体系中形成的自由基,表现出不同程度的抗氧化活性^[16]。

丹参茎叶提取物清除自由基能力强弱与提取物中所含抗氧化成分种类及化合物结构有关外,还与其量密切相关。本课题组前期研究表明,7 月份为丹参地上茎叶生长旺盛期,总酚酸的量在此时达到最高^[2],12 月份丹参地上茎叶已达枯萎期,各化学组分的量和抗氧化活性均较低。本研究结果显示丹参茎叶水提取物和醇提取物中主要为丹酚酸类成分,各提取物中丹酚酸的量以 SY-7 最高,其次为 CY,与抗氧化活性呈正相关,这一结果与文献所报道的

酚酸类化合物为抗氧化活性主要药效基础相一致^[5]。因此,丹参地上茎叶作为丹参非传统药用部位,其富含水溶性丹酚酸类成分,以丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 为主,具有良好的体外抗氧化作用,提示可在不影响丹参药材生长的情况下对适宜生长期的丹参茎叶加以利用,将对丹参资源的综合利用与开发具有重要意义。由于本实验采用体外抗氧化检测体系(多为纯化学反应体系)进行评价,该反应体系中的自由基与生理自由基存在不一致性,检测中自由基损伤的分子种类也与生物体内形成的损伤物质不尽相同。因此,丹参茎叶抗氧化的药效价值尚需进一步在体内外生物体实验中得以验证。

参考文献

- [1] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009.
- [2] 沙秀秀, 宿树兰, 沈 飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分分布与积累动态分析评价 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3414-3419.
- [3] 史国柱, 郭庆梅, 周凤琴. 丹参叶的化学成分研究 [J]. 山西大学学报, 2015, 38(4): 692-695.
- [4] 曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药,

- 2017, 48(4): 767-772.
- [5] 薛治浦. 丹参叶抗氧化活性及相关酚酸类成分的研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2011.
- [6] Zhang Q, Chang Z, Yang J, *et al.* Antiatherogenic property of triterpenoids-enriched extract from the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(8): 1040-1045.
- [7] Zhang Y, Li X, Wang Z Z. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents [J]. *Food Chem Toxic*, 2010, 48(10): 2656-2662.
- [8] 曾慧婷, 宿树兰, 朱悦, 等. 丹参酚酸类成分生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3324-3331.
- [9] Ho J H, Hong C Y. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 30-47.
- [10] 唐于平, 黄美艳, 张彦华, 等. 四物汤类方与组方药材及其所含主要芳香酸体外抗氧化活性比较与量效关系研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 64-67.
- [11] 沙秀秀, 戴新新, 宿树兰, 等. 丹参茎叶药材的质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1094-1100.
- [12] Xia F B, Zhong Y, Li M Q, *et al.* Antioxidant and anti-fatigue constituents of Okra [J]. *Nutrients*, 2015, 7(10): 8846-8858.
- [13] Sun Y S, Zhu H F, Wang J H, *et al.* Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(8/9): 733-737.
- [14] 杜芹芹, 张旭, 宋凤瑞, 等. 人参与金银花、何首乌、黄芪配伍的化学成分变化研究及抗氧化活性测定 [J]. 药学报, 2010, 45(6): 756-760.
- [15] 乐世俊, 唐于平, 王林艳, 等. 红花中黄酮类化合物的分离与体外抗氧化研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3295-3300.
- [16] 夏鑫华, 刘梅, 张志敏, 等. 丹参中水溶性成分体外抗氧化活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(5): 1085-1087.