超滤亲和质谱结合分子对接探讨丹参活血化瘀功效成分群的显效形式

胡 虹[1,2,3], 赖 莉[1,2,3], 王淑美[1,2,3*], 谢媛媛[1,2,3*]

1. 广东药科大学中药学院，广东 广州 510006
2. 广东省中药质量工程技术研究中心，广东 广州 510006
3. 国家中医药管理局 中药数字化质量评价技术重点研究室，广东 广州 510006

摘 要：目的 采用亲和超滤-液质联用技术（ultra-filtration affinity-liquid chromatography-mass spectrometry，UF-LC-MS）结合体外酶活性实验和分子对接虚拟筛选，发现不同丹参提取物中凝血酶抑制活性成分，并靶向凝血酶探讨丹参活血化瘀功效成分群的显效形式。**方法** UF-LC-MS 分析结合体外凝血酶活性测定，筛选和鉴定丹参总酚酸提取物和丹参酮提取物的凝血酶抑制活性成分群；结合谱效关系探讨不同活性成分对丹参提取物抗凝活性的贡献；进一步通过分子对接虚拟筛选阐明主要活性成分作用于凝血酶的分子机制。**结果** UF-LC-MS 分析结合体外凝血酶活性测定，发现丹参中丹酚酸 C、紫草酸、丹酚酸 A、15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 和丹参酮 I 7 种具有直接凝血酶抑制活性的成分；灰色关联分析结果显示，在丹参总酚酸提取物中，紫草酸和丹酚酸 A 对抗凝活性具有正向促进作用，而在丹参酚酸和丹参酮同时存在的丹参酮提取物中，丹参酮类成分是主要抗凝活性成分，紫草酸和丹酚酸 A 对抗凝活性具有反向贡献；通过改变不同化合物配比考察多组分同时作用于凝血酶的共同效应，当高浓度（均大于 IC_{50}）的丹参酚酸类与丹参酮类成分同时存在时，两组成分会竞争凝血酶活性位点，使得整体抗凝活性降低；当丹参酚酸类与丹参酮类成分组的浓度均低于 IC_{50} 时，凝血酶活性位点充足，两组成分间存在协同增效作用。分子对接虚拟筛选研究发现这种竞争性抑制作用可能与不同活性成分竞争性结合凝血酶同一氨基酸残基有关。**结论** 采用超滤亲和质谱与分子对接虚拟筛选相结合，表征丹参活血化瘀功效成分群作用于凝血酶共同效应，发现活性成分的种类、含量及不同成分的含量比例等均是影响其显效的关键因素，为中药功效机制的探索和质量控制提供了有价值的参考。

关键词：丹参；凝血酶；亲和超滤质谱法；灰色关联分析；多成分单靶点共同效应；分子对接；丹参酚酸；丹参酮

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2024)21 - 7217 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.003

Ultra-filtration affinity mass spectrometry coupled with molecular docking to explore effective form of blood-activating and stasis-resolving active ingredient group in *Salvia miltiorrhiza*

HU Hong[1,2,3], LAI Li[1,2,3], WANG Shumei[1,2,3], XIE Yuanyuan[1,2,3]

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Quality Engineering and Technology Research Center, Guangzhou 510006, China
3. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective Ultra-filtration affinity-liquid chromatography-mass spectrometry (UF-LC-MS) was utilized in conjunction with enzyme activity assays *in vitro* and molecular docking virtual screening methodologies. These approaches were applied for the purpose of pinpointing active ingredient for thrombin inhibition in different *Salvia miltiorrhiza* extracts and for the specific

收稿日期：2024-05-14

基金项目：国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项课题资助项目（2017YFC1700800）

作者简介：胡 虹（1999—），硕士研究生，研究方向为中药分析新技术与新方法研究。Tel: (020)39352177 E-mail: huhong9909@163.com

***通信作者：**谢媛媛，博士，从事中药分析新技术与新方法研究。Tel: (020)39352177 E-mail: yuanyuan8078@163.com

王淑美，博士，从事中药质量控制新技术研究。Tel: (020)39352173 E-mail: 2395903468@qq.com

investigation of the "effective form" for these bioactive component group responsible for the blood-activating and stasis-resolving properties within *S. miltiorrhiza*. **Methods** UF-LC-MS analysis and *in vitro* thrombin activity assay were employed for the screening and identification of thrombin inhibitors in total phenolic extracts and tanshinone extracts. Spectrum-effect relationship was utilized to assess the contribution of different active ingredients to the anticoagulant activity of *S. miltiorrhiza* extracts. Additionally, molecular docking virtual screening was conducted to elucidate the underlying molecular mechanisms of the principal active components targeting thrombin. **Results** The combination of UF-LC-MS analysis and thrombin activity assay conducted *in vitro* led to the identification of seven components in *S. miltiorrhiza* with thrombin inhibitory activity. These components consist of salvianolic acid C, lithospermic acid, salvianolic acid A, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone II_A, and tanshinone I. Gray correlation analysis results indicated that lithospermic acid and salvianolic acid A positively enhanced the anticoagulant effect within the total phenolic acid extract of *S. miltiorrhiza*. Conversely, tanshinone was identified as the primary anticoagulant element in the tanshinone extracts, which containing salvianolic acid and tanshinone concurrently, while lithospermic acid and salvianolic acid A exhibited an opposing impact on the anticoagulant effect. Subsequently, an exploration of the collective impact of multi-components targeting thrombin was conducted by altering the compound ratios. At high concentrations (all exceeding IC_{50}) of salvianolic acid and tanshinones simultaneously present, these components vied for the thrombin's active site, resulting in an overall reduction in anticoagulant activity. Conversely, when the concentrations of salvianolic acid and tanshinone components were below IC_{50}, an obvious synergistic effect was observed due to sufficient thrombin active sites. Molecular docking virtual screening technology was utilized to confirm that the competitive inhibition may be related to the different active ingredients competitively bind to the same amino acid residue of thrombin. **Conclusion** Ultra-filtration affinity mass spectrometry, in conjunction with molecular docking virtual screening, was employed to delineate the collective impact of the blood-activating and stasis-resolving functional component group in *S. miltiorrhiza* on thrombin. The investigation revealed that the type and content of active ingredients and the content proportion of different ingredients played pivotal roles in determining their efficacy. These findings provide significant contributions to elucidating the pharmacological mechanisms and ensuring the quality assurance of traditional Chinese medicine.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; thrombin; ultra-filtration affinity mass spectrometry; gray relational analysis; multi-component single target common effect; molecular docking; salvianolic acid; tanshinone

中药化学成分组成复杂，其活性成分、作用机制和治疗靶点的不确定性，是阻碍中药现代化和国际化的重要因素[1]。活性成分是中药发挥药效的物质基础，它们通过作用于体内的药物结合位点（药物靶点）发挥作用。受体、酶等是最重要的药物靶点[2]。中药活性成分与靶点之间的相互作用包括多个成分作用于同一靶点、多个成分作用于多个靶点，以及一个成分作用于多个靶点等多种形式[3]。明确中药活性成分如何显效是中药药效物质及其作用机制研究重要基础，却是至今未解之难题[4]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎，是活血化瘀的要药[5]，在心脑血管疾病的临床治疗上有着广泛应用[6]。丹参酚酸类和丹参酮等二萜菲醌类化合物是丹参主要生物活性成分[7]。丹参酚酸可抑制各种诱导剂（如凝血酶、二磷酸腺苷、花生四烯酸等）诱导的血小板凝聚、清除氧自由基、保护心脏微血管内皮细胞从而拮抗血栓形成[8-9]。如丹酚酸 A[10-11]和丹酚酸 B[12-13]均显示出较强的抗凝血活性、抗血小板和抗血栓活性，原儿茶醛[14]显示出温和的抗血栓形成作用。丹参酮也发挥出很强的抗凝、抗血小板聚集效果，主要聚焦在丹参酮 II_A[15-17]、隐丹参酮[18]和 15,16-二氢丹参酮 I[19]的抗血小板活化和聚集的研究中。

凝血酶可水解多种凝血因子，在血小板活化和凝血级联过程中，发挥至关重要的作用[20-23]。凝血酶可激活因子V、VIII、XI生成更多的凝血酶[24]；可使纤溶酶原转变成纤溶酶，激活纤溶系统，两者共同调节机体正常凝血功能[25]。凝血酶在血栓形成过程中也具有重要作用，一方面可促使血浆中的可溶性纤维蛋白原转变成不溶的纤维蛋白，形成致密网络加固促进血栓形成，另一方面可与血小板膜蛋白（蛋白激活受体-1 或者蛋白激活受体-4）结合激活胞内磷脂酰肌醇激酶和花生四烯酸等通路从而诱导血小板聚集[26-28]。因此，基于凝血酶阐释活血化瘀中药治疗心脑血管疾病的药效物质基础及相关机制受到广泛关注。

直接凝血酶抑制剂通过与凝血酶活性位点结合并阻断其与底物的相互作用来发挥抗凝作用[29-31]。学者采用亲和超滤质谱[31]、细胞膜色谱[32]、分子印迹[33]等在丹参中发现了隐丹参酮、丹参酮 I、二氢

丹参酮 I 和丹参酮 II_A 等直接凝血酶抑制剂。然而，中药的治疗作用是通过多成分之间的相互促进、竞争和拮抗等共同发挥作用的。亲和超滤和细胞膜色谱法均是基于单一“点对点”的模式靶向捕获目标物质并进行分析鉴定[34-35]，由此发现的活性成分往往忽视了化合物之间的相互作用，具有一定的局限性，难于代表中药复杂物质体系的整体功效。

为此，本研究以丹参为研究载体，靶向凝血酶，探索中药中多个成分作用于单一靶点的显效形式。将超滤亲和-液质联用技术（ultra-filtration affinity-liquid chromatography-mass spectrometry，UF-LC-MS）与体外凝血酶活性测定相结合，在丹参总酚酸提取物和丹参酮提取物等复杂物质体系中发现直接凝血酶抑制剂；结合灰色关联分析（gray relational analysis，GRA）表征谱效关系，明确不同活性成分对丹参提取物抗凝活性的贡献，探讨不同成分间的相互作用；进一步通过分子对接虚拟筛选阐明主要活性成分作用于凝血酶的分子机制，揭示丹参发挥活血化瘀功效的物质基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS（美国赛默飞世尔科技公司）；Spark 多功能微孔板检测系统（瑞士 Tecan 公司）；KQE-300DE 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；MTC-100 型恒温混匀仪（杭州米欧仪器有限公司）；SQP 型十万分之一电子天平（德国赛多利斯科学仪器有限公司）；BMB Free-17 型台式高速冷冻离心机（广州博美科学仪器有限公司）；Research plus 移液枪（德国 Eppendorf 公司）。

1.2 药品与试剂

人 α-凝血酶冻干粉（批号 20408ES80）购自上海翊圣生物科技有限公司；人 α-凝血酶冻干粉（批号 EZ006K）购自法国 Hyphen-BioMed 公司；S-2238 生色底物（批号 AS00-0101）购自北京阿斯雷尔生物技术有限公司，质量分数≥99%；阿加曲班（批号 A822301）购自上海麦克林生化科技股份有限公司，质量分数≥99%；1×PBS 缓冲液液（pH 7.2～7.4）（批号 P1020）购自北京索莱宝科技有限公司；丹参素（批号 ST78460120）、原儿茶醛（批号 ST03300120）、丹酚酸 B（批号 RS00051020）、丹酚酸 A（批号 ST05570120）、丹酚酸 C（批号 ST14750120）紫草酸（批号 ST13620120）、丹参酮 I（批号 ST01450220）、15,16-二氢丹参酮 I（批号 ST03930120）和隐丹参酮（批号 ST03260120）对照品购自上海诗丹德生物技术有限公司；迷迭香酸（批号 CHB180121）和丹参酮 II_A（批号 CHB190305）对照品购自成都克洛玛生物科技有限公司，本研究所用对照品质量分数均大于 95%。质谱甲酸（批号 A117-50）购自赛默飞世尔仪器有限公司；质谱乙腈（批号 A801556）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；色谱甲酸（批号 F112034）购自上海 Aladdin 公司；色谱甲醇（批号 Me-00040203）、色谱乙腈（批号 Ac-00030281）购自瑞典 Oceanpak 公司；屈臣氏水（批号 GB19298）购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。

1.3 药材

本研究所用 17 批丹参药材（表 1）均来源于河北、陕西等丹参药材种植基地或生产企业，由上海市食品药品检验研究院提供，经上海市食品药品检验研究院季申教授鉴定均为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根，凭证标本储存于广东药科大学中药学院。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 丹参总酚酸提取物和丹参酮提取物的制备参照《中国药典》2020 年版“丹参总酚酸提取物”

表 1 17 批丹参药材相关信息

Table 1 Related information of 17 batches of *S. miltiorrhiza*

编号	批号	产地或来源
D1	18-ds-tsl-001	河北
D2	18-ds-tsl-002	河北
D3	18-ds-tsl-003	河北
D4	18-ds-tsl-004	河北
D5	18-ds-tsl-005	河北
D6	19-ds-tsl-006	河北
D7	19-ds-tsl-007	河北
D8	19-ds-tsl-008	河北
D9	19-ds-tsl-009	河北
D10	19-ds-tsl-010	河北
D11	19-ds-tsl-011	河北
D12	19-ds-tsl-012	河北
D13	1910-ds-sxhz-01	陕西
D14	1910-ds-sxhz-02	陕西
D15	1910-ds-sxhz-03	陕西
D16	190700231	康美药业有限公司
D17	190703651	康美药业有限公司

和“丹参酮提取物”项下方法制备[36]。

2.1.2 生物亲和超滤质谱样品溶液的制备 精密称定 D13 批次丹参总酚酸提取物，采用 Tris-HCl 溶液中溶解定容使终浓度约为 5 mg/mL，离心取上清液，制得丹参总酚酸提取物供试品溶液；精密称定 D13 批次丹参酮提取物，将其溶解含 1.2%DMSO 的 Tris-HCl 溶液中，终质量浓度约为 2.5 mg/mL，室温下超声 30 min，离心取上清液，制得丹参酮提取物供试品溶液。

2.1.3 多指标成分含量测定样品溶液的制备 精密称定 17 批丹参总酚酸提取物适量，加水溶解，定容，使终质量浓度为 1 mg/mL，摇匀，滤过，取续滤液。精密称定 17 批丹参酮提取物，加甲醇使溶解，定容，使终质量浓度为 0.5 mg/mL，摇匀，滤过，取续滤液。精密称定 17 批丹参酮提取物，加 1.2% DMSO 使溶解，定容，终质量浓度为 2 mg/mL，室温下超声 30 min，离心取上清液，滤过，取续滤液。

2.1.4 凝血酶抑制活性样品溶液的制备 精密称定 17 批丹参总酚酸提取物，将其溶解在 PBS 缓冲液中，终质量浓度约为 4 mg/mL，并用 PBS 缓冲液梯度稀释，制得各质量浓度梯度的丹参总酚酸提取物供试品溶液，以 PBS 缓冲液作为空白溶液；精密称定 17 批丹参酮提取物，将其溶解在含 1.2% DMSO 的 PBS 缓冲液中，使终质量浓度为 1 mg/mL，室温下超声 30 min，离心取上清液，并用含 1.2% DMSO 的 PBS 缓冲液稀释，制得各质量浓度梯度的丹参酮提取物供试品溶液，以含 1.2%DMSO 的的 PBS 缓冲溶液作为空白溶液。

2.2 UF-LC-MS 技术筛选潜在的凝血酶配体

UF-LC-MS 程序参考文献报道[37]并对方法进行了细微的调整。实验分为活性凝血酶组、灭活凝血酶组和空白对照组。将凝血酶在沸水中变性 10 min 以获得灭活的凝血酶。活性凝血酶组：100 μL 丹参提取物样品溶液＋100 μL 凝血酶溶液（5 U/mL）；灭活凝血酶组：100 μL 丹参提取物样品溶液＋100 μL 灭活凝血酶溶液（5 U/mL）；空白对照组：100 μL 丹参提取物样品溶液＋100 μL Tris-HCl 缓冲液（pH 8.4）。3 组样品在 37 ℃、300 r/min 条件下孵育 30 min，将混合溶液转移至分子截留量 1×10^4 超滤离心管中，室温下离心 15 min（×10 000 *g*），取离心液，标记为离心液①；向超滤管中加入 200 μL Tris-HCl（pH 8.4）缓冲溶液，室温下离心 10 min（×10 000 *g*），重复清洗 3 次，弃去洗脱液；将超滤内管倒扣至干净外管，室温下离心 10 min（×10 000 *g*），取离心液，加入 200 μL 甲醇，使凝血酶变性并释放活性化合物，室温下离心 10 min（×10 000 *g*），取上清液，标记为离心液②；取离心液①和离心液②，真空浓缩至干，向残渣中加入 200 μL 甲醇复溶，室温下超声 15 min，离心取上清液，按照既定色谱、质谱条件进行 UHPLC 多指标含量测定和 UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS 分析。通过结合率评估分子配体和凝血酶之间的结合程度，按照公式计算结合率。

$$结合率=(A_{空白}-A_{样品})/A_{空白}$$

$A_{空白}$表示空白组离心液①的峰面积；$A_{样品}$表示活性凝血酶组离心液①的峰面积

2.3 UHPLC 多指标成分含量测定条件[36]

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈（A）-0.4%甲酸-水（B），梯度洗脱：0～1 min，5% A；1～10 min，5%→19% A；10～14 min，19% A；14～18 min，19%→25% A；18～20 min，25%→28% A；20～22 min，28% A；22～26 min，28%→45% A；26～29 min，45% A；29～33 min，45%→58% A；33～40 min，58%→63% A；40～41 min, 63%→80% A；41～42 min，80%→5% A；42～45 min，5% A。体积流量 0.4 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 285 nm；进样量 2 μL。

2.4 UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS/MS 分析

加热电喷雾离子源（heated electrospray ionization，HESI），正、负离子检测模式；一级质量扫描范围 *m/z* 设置为 100.0～1 500.0；干燥气和鞘气体积流量分别设置为 10、45 L/min；离子传输管温度 350 ℃；辅助气温度 200 ℃；喷雾电压分别为＋3.5 kV（正离子模式）和−3.0 kV（负离子模式）；扫描模式为 FullMs/dd-Ms^2，FullMs 分辨率 70 000 Hz，dd-Ms^2 分辨率 17 500 Hz，碰撞能量 NCE 设为 20、30、45。

2.5 凝血酶抑制活性测定

凝血酶活性评价试验方法采用 Lottenberg 等的测定方法改良而得[38]：将各浓度样品溶液 100 μL 与凝血酶溶液（1 U/mL）100 μL 在 37.5 ℃、300 r/min 条件下恒温振荡孵育 20 min 后，每孔同时加入 S-2238 生色底物（2.5 mg/mL）50 μL，立即用酶标仪分析，每分钟读取 1 次吸光度（*A*）值，共测定 50 min，考察酶促反应发生时间，同时设置空白对照组和阳性对照组（阿加曲班）。按照公式计算各丹参提

取物和对照品凝血酶抑制率。

$$抑制率=1-\alpha/\beta$$

α、β 分别表示样品对照组、空白对照组每分钟 A 的线性变化。丹参提取物及对照品的 IC_{50} 值是在 6 个质量浓度的 3 个重复实验中测定的，抑制率取 3 次实验的平均值

2.6 谱效关系分析[39]

2.6.1 原始数据的无量纲化处理 原始数据的变换采用均值法，将 IC_{50} 值标记为母序列，记为 $x_0(k)$，将丹参提取物的 10 种成分质量分数（mg/g）作为子序列，记为 $x_i(k)$。首先对数据进行归一化。

$$f(x(k))=x(k)/\bar{x}=y(k)$$

2.6.2 绝对差序列及关联系数的计算 母序列与子序列的绝对差序列 $\Delta_{0i}(k)=|x_0(k)-x_i(k)|$。计算母序列与子序列的关联系数 $y(x_0(k), x_i(k))$。

$$y(x_0(k), x_i(k))=(\Delta\min+\rho\Delta\max)/(\Delta_{0i}k+\rho\Delta\max)$$

ρ 为分辨系数，$\rho\in(0,1)$，本实验中 ρ 取 0.5；$\Delta\max$ 为母序列与子序列的绝对差值的最大值；$\Delta\min$ 为母序列与子序列的绝对差值的最小值。

2.6.3 关联度的计算 以反映每个评价对象与参考序列之间的相关性。计算关联度 $y(x_0, x_i)$。

$$y(x_0, x_i)=\frac{1}{n}\sum_1^n y(x_0(k), x_i(k))$$

2.6.4 关联极性的计算 母序列与子序列之间的关联极性，计算关联极性 σ_i。

$$\sigma_i=\sum_{k=1}^{17} k\cdot x_i(k)-\frac{\sum_{k=1}^{17} x_i(k)\cdot\sum_{k=1}^{17} k}{n}$$

若 $\mathrm{sgn}(\sigma_i)=\mathrm{sgn}(\sigma_0)$，则 y_i 与 y_0 呈正相关，说明 y_i 与 y_0 起到增强作用；反之则起到削弱作用。

2.7 分子对接

从 RSCB PDB 蛋白数据库（rcsb.org/）下载凝血酶的蛋白结构（PDB：1DWC）；从 pubchem 网站（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）下载目标化合物的 2D/3D 结构，使用 Chem 3D 软件对化合物进行能量优化，转化为 mol2 格式，保存为 ligand.Mol2。然后，采用 AutoDock 4.2.6 软件（The Scripps Research Institute，La Jolla，CA，美国）进行分子对接。首先对蛋白质结构进行如下处理：去除原配体、水分子、钙离子等与对接无关的物质，分析蛋白质结构，并进行加氢处理；然后进行配体化合物结构能量优化和分析；网格尺寸设置为（x, y, z）=（60, 60, 60），网格催化位点设置为（x, y, z）=（35.887, 19.178, 18.856），使用拉马克遗传算法（Lamarckian genetic algorithm，LGA）确定最优配体结合方向，根据生成的每个构象的坐标，相互作用能量和聚类信息评估小分子与凝血酶活性口袋的对接结果。通过 Discovery Studio Visualizer 4.5、Pymol 2.4.1 软件获得 2D、3D 相互作用图。

2.8 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行分析，数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 UF-LC-MS 技术筛选潜在的直接凝血酶抑制剂

采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用方法（UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS）分别对丹参总酚酸和丹参酮提取物与活性凝血酶孵育后的离心液②进行定性分析，根据 LC-MS/MS 数据信息，结合相关文献报道[40-45]，鉴定结果见表 2。采用亲和超滤法从丹参总酚酸提取物中筛选鉴定出 10 种潜在活性成分，包括丹参素（**1**）、原儿茶醛（**2**）、迷迭香酸（**5**）、紫草酸（**6**）、丹酚酸 B（**7**）、丹酚酸 A（**8**）和丹酚酸 C（**10**）等常见丹参酚酸类成分；从丹参酮提取物中筛选出 10 种潜在活性物质，主要包括 15,16-二氢丹参酮 I（**13**）、隐丹参酮（**16**）、丹参酮 I（**17**）、二氢丹参酮 I（**19**）和丹参酮 II_A（**20**）等二萜类成分。

UHPLC 分析结果显示，与丹参酮提取物的色谱图（图 1-A）和丹参总酚酸提取物（图 2-A）相比，发现在超滤筛选实验条件下，丹参酮提取物和丹参总酚酸提取物中只有部分化合物能够与凝血酶结合（图 1-B、2-B）；色谱峰面积部分高于灭活酶组（图 2-C）。当活性成分与凝血酶发生特异性结合后，活性酶组捕获的配体所对应的峰强度和峰面积均应大于灭活酶组，因此可根据峰面积的变化情况来反映化合物与凝血酶的结合率。进一步比较分析丹参提取物中含量较高的活性成分与凝血酶的结合情况，其中丹参酮提取物中（图 1-B）8 个主要成分，迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 与凝血酶结合率分别为 81.62%、100%、99.27%、44.72%、37.02%、100%、100%、100%；丹参总酚酸提取物中（图 2-B）5 个主要成分，丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 与凝血酶结合率分别为 70.24%、61.28%、98.66%、98.58%、83.18%。与空白对照的色谱图（图 1-D、2-C）相比，本方法可有效避免小分子化合物吸附到超滤膜而造成的假阳性结果。值得注意的是，在丹参总酚酸提取物中的丹酚酸 A 与凝血酶结合率（83.18%）约是丹参酮提取

表 2　丹参亲和超滤质谱结果

Table 2　*S. miltiorrhiza* extracts affinity ultra-filtration mass spectrometry results

序号	化合物名称	分子式	t_R/min	m/z	加合离子	误差 (×10^{-6})	MS/MS
1	丹参素	$C_9H_{10}O_5$	2.74	197.045 2	$[M-H]^-$	−1.607	179.034 6, 135.044 3
2	原儿茶醛	$C_7H_6O_3$	4.65	137.023 5	$[M-H]^-$	−6.695	108.020 7, 93.033 5
3	3-醛基水杨酸	$C_8H_6O_4$	5.80	165.018 8	$[M-H]^-$	−3.163	121.028 5
4	丹酚酸 H/I	$C_{27}H_{22}O_{12}$	12.73	537.105 0	$[M-H]^-$	2.105	339.051 6, 321.040 6
5	迷迭香酸	$C_{18}H_{16}O_8$	14.95	359.078 5	$[M-H]^-$	3.396	197.045 3, 179.034 5, 161.023 7
6	紫草酸	$C_{27}H_{22}O_{12}$	16.57	537.104 9	$[M-H]^-$	1.994	493.114 6, 313.072 1, 295.061 6
7	丹酚酸 B	$C_{36}H_{30}O_{16}$	18.50	717.147 7	$[M-H]^-$	2.234	519.093 8, 339.051 7, 321.041 0, 295.061 4
8	丹酚酸 A	$C_{26}H_{22}O_{10}$	19.95	493.116 8	$[M-H]^-$	5.617	295.061 6, 185.024 0, 109.028 4
9	紫草酸甲酯	$C_{28}H_{24}O_{12}$	20.46	551.121 8	$[M-H]^-$	4.120	353.067 6
10	丹酚酸 C	$C_{26}H_{20}O_{10}$	21.70	491.099 0	$[M-H]^-$	1.344	311.056 7, 293.046 1, 267.066 5
11	丹参醌 IIB	$C_{19}H_{18}O_4$	27.89	311.129 2	$[M+H]^+$	4.578	293.117 5, 275.106 7, 265.122 4
12	丹参新醌 A	$C_{18}H_{16}O_4$	29.16	297.112 6	$[M+H]^+$	1.597	279.102 0, 233.096 6, 205.101 5
13	15,16-二氢丹参酮 I	$C_{18}H_{14}O_3$	31.23	279.101 8	$[M+H]^+$	0.749	261.091 2, 233.096 2, 205.101 6, 190.077 6
14	四氢丹参酮 I	$C_{18}H_{16}O_3$	32.12	281.117 8	$[M+H]^+$	2.060	263.107 1, 235.112 0
15	丹参酮 V	$C_{19}H_{22}O_4$	32.50	315.159 3	$[M+H]^+$	0.585	297.148 9, 279.138 6, 254.094 5, 251.143 5
16	隐丹参酮	$C_{19}H_{20}O_3$	34.34	297.148 9	$[M+H]^+$	1.141	282.125 9, 279.137 5, 251.143 2
17	丹参酮 I	$C_{18}H_{12}O_3$	34.76	277.086 3	$[M+H]^+$	1.477	262.062 1, 249.091 3, 234.068 1, 221.095 9, 193.101 4, 178.078 0
18	柳杉酚	$C_{20}H_{28}O_2$	35.09	301.216 1	$[M+H]^+$	−0.487	271.169 8, 213.127 4
19	二氢丹参酮 I	$C_{18}H_{14}O_3$	36.01	279.102 8	$[M+H]^+$	4.547	261.091 1, 233.093 6
20	丹参酮II_A	$C_{19}H_{18}O_3$	38.56	295.133 3	$[M+H]^+$	1.555	277.122 7, 249.127 9, 234.103 8

物中的丹酚酸 A 与凝血酶结合率（44.72%）的 1 倍，推测结合率的差异可能是由于多个成分同时作用于凝血酶时存在竞争性结合相互作用。

3.2　活性成分凝血酶抑制活性验证

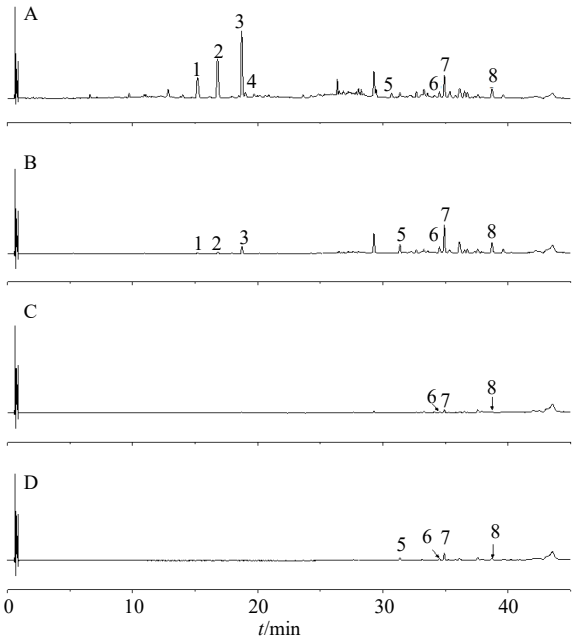
采用生色底物法测定了亲和超滤法筛选得到的丹参中潜在活性成分对凝血酶的抑制作用，并以直接凝血酶抑制剂阿加曲班为阳性对照药。结果如表 3 所示，阳性药阿加曲班抑制凝血酶活性的 IC_{50} 值为（0.80±0.05）μmol/L，与文献报道相符，说明本研究所建立的凝血酶活性测定方法结果稳定可靠。丹酚酸 A、丹酚酸 C、紫草酸、15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 和丹参酮 I 等均对凝血酶有明显的抑制作用。丹参酮 I 由于其水溶性差故未测得具体的 IC_{50} 值（≥25.39 μmol/L），而丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参素和原儿茶醛等均未检测到明显的直接凝血酶抑制活性。

3.3　丹参提取物中多指标成分含量和凝血酶抑制活性测定

采用前期建立的 UHPLC 分析方法[36]测定了 17 批丹参总酚酸提取物和 17 批丹参酮提取物中 10 个指标成分的含量；同时采用生色底物法测定了这些提取物的凝血酶抑制活性，以 IC_{50} 作为其凝血酶抑制活性评价指标。不同批次丹参总酚酸提物和丹参酮提取物的凝血酶抑制活性差异显著，其中丹参总酚酸提取物抑制凝血酶活性的 IC_{50} 值在 333.34～2 329.89 μg/mL，丹参酮提取物抑制凝血酶活性的 IC_{50} 值在 16.94～609.81 μg/mL，丹参酮提取物的抗凝活性高于丹参总酚酸提取物。

3.4　谱效关系分析

将 17 批丹参总酚酸提取物和 17 批丹参酮提取物中 10 个指标成分含量与提取物的直接凝血酶抑制活性进行灰色关联分析，结果见图 3。相关性结果显示，在丹参总酚酸提取物中，紫草酸和丹酚酸 A 与 IC_{50} 值呈负相关，关联度分别为−0.738 1、−0.727 5，是丹参总酚酸提取物发挥抗凝活性的主要贡献成分；在丹参酮提取物中，15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 与 IC_{50} 值呈负相关，关联度分别为−0.776 6、−0.777 4、−0.776 1 和−0.764 4，对凝血酶抑制作用药效贡献由大到小为隐丹参酮＞15,16-二氢丹参酮 I＞丹参酮 I＞丹参酮



A-丹参酮提取物；B-丹参酮提取物与活性凝血酶溶液组；C-丹参酮提取物与灭活凝血酶溶液组；D-丹参酮提取物与空白溶液组；1-迷迭香酸；2-紫草酸；3-丹酚酸 B；4-丹酚酸 A；5-15,16-二氢丹参酮 I；6-隐丹参酮；7-丹参酮 I；8-丹参酮 II_A。

A-tanshinone extract; B-tanshinone extract with active thrombin solution group; C-tanshinone extract with inactivated thrombin solution group; D-tanshinone extract with blank solution group; 1-rosmarinic acid; 2-lithospermic acid; 3-salvianolic acid B; 4-salvianolic acid A; 5-15,16-dihydrotanshinone I; 6-cryptotanshinone; 7-tanshinone I; 8-tanshinone II_A.

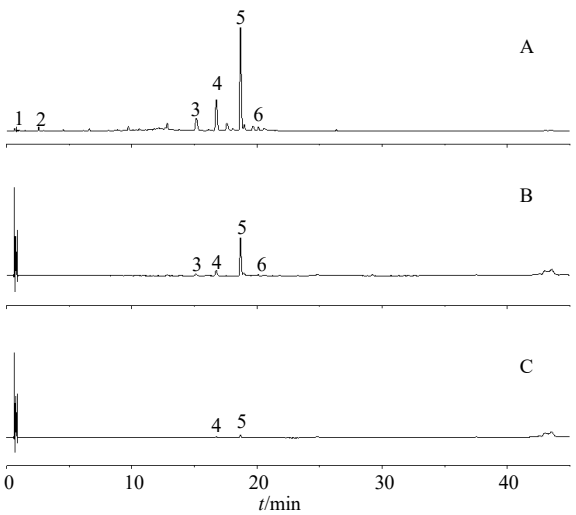
图 1 D13 批丹参酮提取物中抑制凝血酶的活性成分色谱图（离心液②）

Fig. 1 Chromatograms of active ingredients that inhibit thrombin in tanshinone extract in batch D13 (centrifuge solution②)

II_A，但丹酚酸 A 和紫草酸则对提取物整体抗凝活性无贡献（关联度分别为 0.808 2 和 0.781 5），推测在丹参酮提取物中，丹参酚酸类成分与丹参酮类成分共存，作用于凝血酶时存在竞争性抑制作用有关。

3.5 多组分同时作用于凝血酶的“共同效应”考察

通过改变不同化合物含量比例考察了多组分同时作用于凝血酶的“共同效应”。首先，在 100 μmol/L 的丹酚酸 A 中分别添加 5、12.5 μmol/L 的 15,16-二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II_A，考察丹参酮类成分对丹酚酸 A 凝血酶抑制活性的影响，结果见图 4。100 μmol/L 的丹酚酸 A 和 5 μmol/L 的 15,16-二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II_A 对凝血酶活性的抑制率分别为（91.10±0.45）%、（31.03±2.38）%、（18.97±2.25）%、（8.53±3.33）%和（31.83±4.93）%；而当同样浓度的丹酚酸 A 与各个丹参酮类活性成分混合后，其凝血酶抑制活性均有不同程度的降低，提示当丹参酮类成分与丹酚酸 A 共同作用于凝血酶时，可能存在竞争性抑制作用。



A-丹参总酚酸提取物；B-丹参总酚酸提取物与活性凝血酶溶液组；C-丹参总酚酸提取物与空白溶液组；1-丹参素；2-原儿茶醛；3-迷迭香酸；4-紫草酸；5-丹酚酸 B；6-丹酚酸 A。

A-total phenolic extract of *S. miltiorrhiza*; B-total phenolic extract of *S. miltiorrhiza* with active thrombin solution group; C-total phenolic extract of *S. miltiorrhiza* with blank solution group; 1-danshensu; 2-protocatechualdehyde; 3-rosmarinic acid; 4-lithospermic acid; 5-salvianolic acid B; 6-salvianolic acid A.

图 2 D13 批丹参总酚酸提取物中抑制凝血酶的活性成分色谱图（离心液②）

Fig. 2 Chromatograms of active ingredients that inhibit thrombin in total phenolic extract of *S. miltiorrhiza* in batch D13 (centrifuge solution②)

表 3 丹参活性成分对照品及阿加曲班对凝血酶的抑制活性 ($n = 3$)

Table 3 Inhibitory activity of *S. miltiorrhiza* standard and argatroban on thrombin ($n = 3$)

活性化合物	IC_{50}/(μmol·L^{-1})
阿加曲班	0.80±0.05
丹酚酸 A	26.29±0.24
丹酚酸 C	9.95±0.54
紫草酸	286.50±15.19
15,16-二氢丹参酮 I	1.11±0.03
隐丹参酮	7.78±3.46
丹参酮 II_A	5.13±0.96
丹参酮 I	≥25.39

为进一步探讨丹参各活性成分同时作用于凝血酶的“共同效应”，结合灰色关联分析结果将 7 个

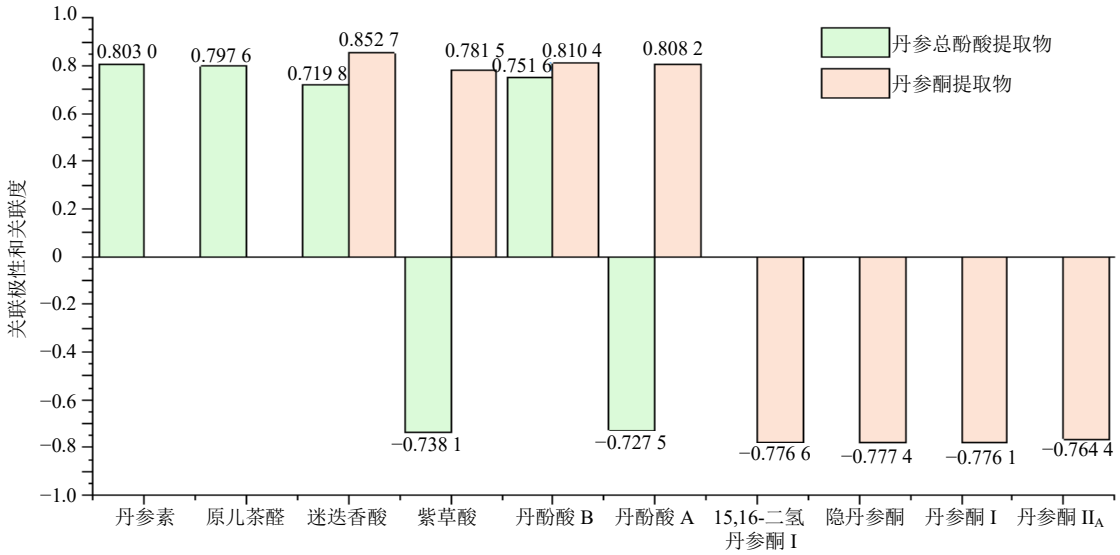
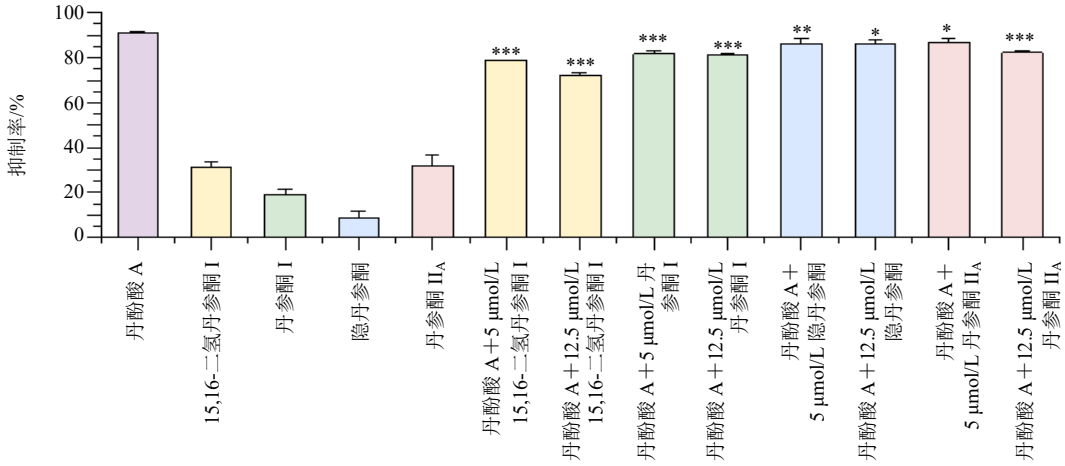


图 3　灰色关联分析结果

Fig. 3　Result of grey correlation analysis



与丹酚酸 A 组（SAA）比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* SAA group.

图 4　丹酚酸 A 与丹参酮类物质共存的凝血酶抑制结果 ($n = 3$)

Fig. 4　Thrombin inhibition results of coexistence of salvianolic acid A and tanshinones ($n = 3$)

具有凝血酶抑制活性的化合物分为 2 组，其中紫草酸、丹酚酸 A 为 a 组，丹酚酸 C 与 15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 为 b 组，c 组为相应 a 组和 b 组的混合物。试验组 1～4 分别考察了不同浓度的 a、b 2 组化合物组合物以及它们的混合物（c 组）的凝血酶抑制活性。试验组 1～4 中各成分浓度分布情况如表 4 所示。采用生色底物法测定它们的凝血酶抑制活性（图 5）。

结果发现，当各成分浓度均为 1/2 IC_{50} 对应的浓度时，凝血酶结合位点充足，丹参酚酸和丹参酮类成分发挥出很强的协同增效作用（试验 4，图 5-D 所示）；而随着各成分浓度增加到 IC_{50} 对应的浓度时，2 类成分混合组呈现出微弱的协同增效作用（试验 4，图 5-A 所示）。值得注意的是，表 4 中试验 2 和试验 3 的混合物组（c2、c3）发挥出了与试验 1 中混合物组（c1）相当的抗凝作用，可见当凝血酶的活性位点饱和时，各组分的含量升高对混合物活性影响不大。

3.6　分子对接模拟

将 7 个具有凝血酶抑制活性的化合物与凝血酶进行分子对接，其对接结合能和结合的凝血酶氨基酸残基如表 5 所示。它们与凝血酶残基的 2D 相互

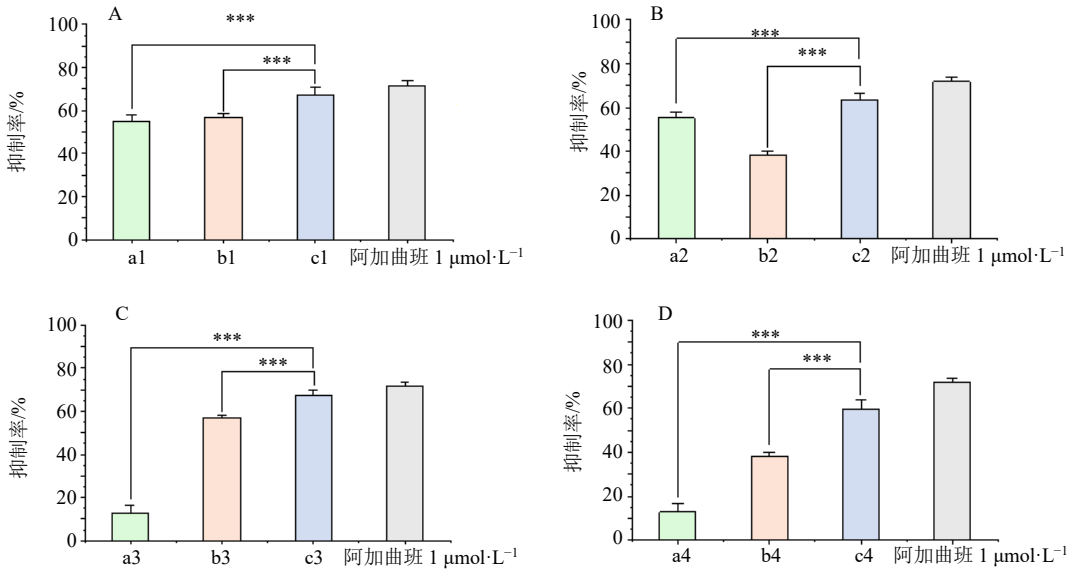
表 4 试验 1～4 各物质浓度分布情况 (n = 6)

Table 4 Concentration distribution of substances in experiments 1—4 (n = 6)

试验*	a*i*		b*i*					c*i*
	紫草酸/(μmol·L^{-1})	丹酚酸 A/(μmol·L^{-1})	丹酚酸 C/(μmol·L^{-1})	15,16-二氢丹参酮 I/(μmol·L^{-1})	隐丹参酮/(μmol·L^{-1})	丹参酮 I/(μmol·L^{-1})	丹参酮 II_A/(μmol·L^{-1})	混合物
1	321.08	26.74	10.70	1.34	8.02	26.6	5.36	a1＋b1
2	321.08	26.74	5.35	0.67	4.01	13.3	2.68	a2＋b2
3	160.54	13.37	10.70	1.34	8.02	26.6	5.36	a3＋b3
4	160.54	13.37	5.35	0.67	4.01	13.3	2.68	a4＋b4

*试验组 1～4 供试溶液参照表 3 相应化合物 IC_{50} 值配制，各化合物浓度分别对应 IC_{50} 值和 1/2 IC_{50} 值 2 个水平；i=1、2、3、4，对应不同试验组。

*The test solution of experimental groups 1—4 was prepared according to IC_{50} of corresponding compound in Table 3, concentration of each compound corresponded to IC_{50} value and 1/2 IC_{50} value respectively; i = 1,2,3,4, corresponding to different experimental groups.



A-试验 1；B-试验 2；C-试验 3；D-试验 4；与 c*i* 组比较：$^{***}P$<0.001，其中 i=1,2,3,4；阿加曲班浓度为 1 μmol/L。

A-test 1; B-test 2; C-test 3; D-test 4; $^{***}P$ < 0.001 *vs* c*i* group, where i=1, 2, 3, 4; concentration of agatroban is 1 μmol/L.

图 5 不同组别丹参混合对照品抗凝活性结果 (n = 6)

Fig. 5 Anticoagulant activity results of different groups of *S. miltiorrhiza* mixed standard samples (n = 6)

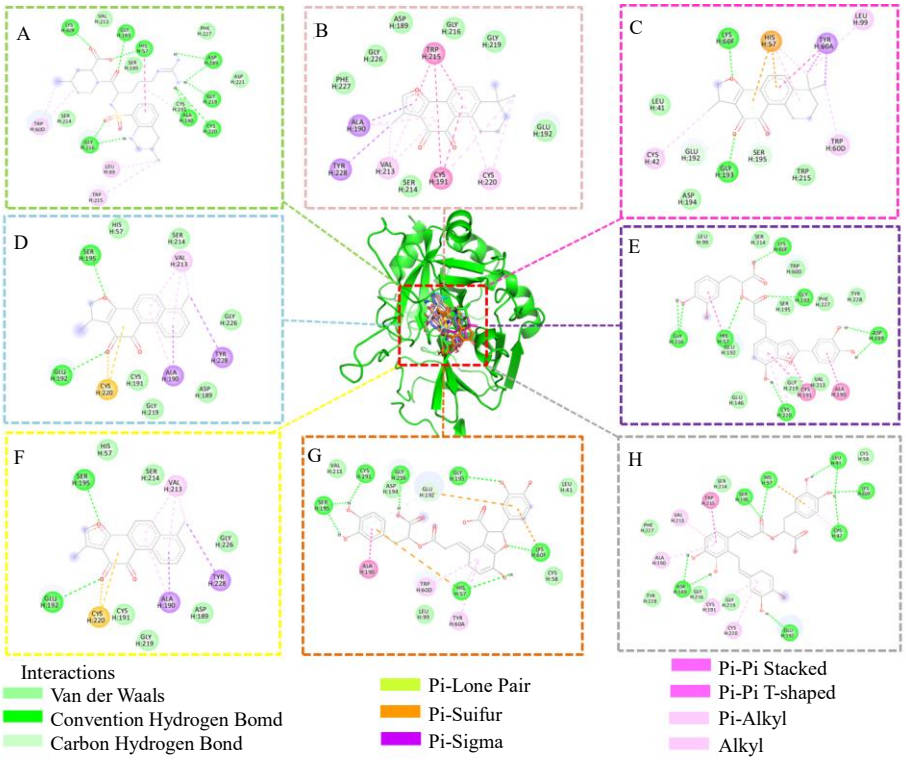
作用图如图 6 所示。通常认为结合能在−5.0 kcal/mol 以下的区域可被视为潜在靶点[31]。结果表明，通过亲和超滤质谱分析筛选得到的 7 个活性化合物与凝血酶进行分子对接的结合能均小于−7.0 kcal/mol，且都能像原始配体一样插入到凝血酶的催化活性口袋中，并通过氢键、范德华力或静电相互作用多种相互作用与凝血酶结合。α-凝血酶在切割位点有 3 个主要的结合口袋，特异性（S）口袋，近端（P）口袋和远端（D）口袋，S 口袋的侧面主要是疏水性的，在该位点的底部有 1 个羧酸（Asp189）和 2 个骨架羰基。P 口袋是疏水性的，比 S 口袋小；D 口袋也是疏水的，比 P 口袋大，该口袋也称为芳基结合位点[46]。

丹参酚酸活性成分主要是靠其结构中的羟基等与凝血酶氨基酸残基结合而发挥其凝血酶抑制活性。丹参酮类化合物分子结构中的羟基数目少于丹参酚酸，但其凝血酶抑制活性较强，推测与丹参酮类成分的多苯环结构导致其双键数目增加，双键是 1 个重要的疏水基团[47]，而凝血酶的 3 个活性口袋也是疏水性的，因此，可与丹参酮类化合物形成稳定的配体-酶复合物从而抑制凝血酶活性。紫草酸、丹酚酸 A 和丹酚酸 C 等酚酸类成分可与 15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 竞争性结合凝血酶 S 口袋中的 GLY219、ALA190、ASP189、

表 5　10 种指标成分与凝血酶的对接结果及残基相互作用

Table 5　Docking results and residue interactions of ten index components with thrombin

化合物	对接结合能/(kcal·mol^{-1})	氢键	范德华力	静电相互作用
阿加曲班	−9.76	HIS57, LYS60F, ASP189, ALA190, GLY193, GLY216, GLY219, CYS220	CYS191, SER195, VAL213, SER214, ASP221, PHE227	TRP60D, LEU99, TRP215
紫草酸	−7.43	HIS57, LYS60F, CYS191, GLY193, SER195, GLY216	LEU41, CYS58, LEU99, ASP194, GLU192, VAL213	TRP60D, TYR60A, ALA190
丹酚酸 A	−7.55	LEU41, CYS42, HIS57, LYS60F, ASP189, GLU192, SER195	CYS58, SER214, GLY216, GLY219, PHE227, TYR228	ALA190, CYS191, VAL213, TRP215, CYS220
丹酚酸 C	−9.11	HIS57, LYS60F, ASP189, GLY193, GLY216, CYS220	TRP60D, LEU99, GLU146, GLU192, SER195, VAL213, SER214, GLY219, PHE227, TYR228	ALA190, CYS191
丹参酮 II_A	−7.94	—	ASP189, GLU192, SER214, GLY216, GLY219, GLY226, PHE227	ALA190, CYS191, VAL213, TRP215, CYS220, TYR228
隐丹参酮	−7.64	LYS60F, GLY193, GLU192, SER195	LEU41, ASP194, TRP215	CYS42, HIS57, TYR60A, TRP60D, LEU99
15,16-二氢丹参酮I	−8.19	GLU192, SER195	HIS57, ASP189, CYS191, SER214, GLY219, GLY226	ALA190, VAL213, CYS220, TYR228
丹参酮 I	−8.08	GLU192, SER195	HIS57, ASP189, CYS191, SER214, GLY219, GLY226	ALA190, VAL213, CYS220, TYR228



A-阿加曲班；B-丹参酮II_A；C-隐丹参酮；D-15,16-二氢丹参酮I；E-丹酚酸 C；F-丹参酮I；G-紫草酸；H-丹酚酸 A。

A-argatroban; B-tanshinone II_A; C-cryptotanshinone; D-15,16-dihydrotanshinone I; E-salvianolic acid C; F-tanshinone I; G-lithospermic acid; H-salvianolic acid A.

图 6　筛选的活性成分与凝血酶催化位点对接的 3D 结构比较

Fig. 6　Comparison of 3D structures of screened active components docked with thrombin catalytic sites

GLU192、TRP215，P 口袋中的 HIS57、TRP60D、TYR60A 和 D 口袋中的 GLY216、LEU99 等氨基酸残基，可能是它们存在竞争性拮抗作用的分子机制。

4 讨论

本研究前期采用 UHPLC 测定了 17 批丹参总酚酸提取物和 17 批丹参酮提取物中 10 个指标成分的含量，其中陕西产的 D13、D15 批次丹参药材中丹参酚酸类和丹参酮类成分含量明显高于其他批次[36]；凝血酶抑制活性实验发现，D13 批次丹参酮提取物和丹参总酚酸提取物的抗凝活性均高于 D15 批次的相应提取物；为此，本研究选取 D13 批次丹参酮提取物和丹参总酚酸提取物进行生物亲和超滤质谱实验。

亲和超滤的主要原理是将含有潜在活性成分的复杂提取物溶液与酶溶液混合孵育后，通过超滤膜将未结合的小分子化合物与大分子成分（酶及化合物-酶结合体）分离，用有机溶剂处理化合物-酶结合体以释放小分子配体，最后采用液相色谱-质谱联用技术对未结合的小分子物质（间接筛选）或结合的小分子化合物（直接筛选）进行分析鉴定，以发现潜在活性化合物。谱效关系分析将药理活性测定结果与指纹图谱分析数据进行整合分析，可用于发现有效成分群可用于谱效关系分析[48]。统计学上计算关联性方法有回归分析、主成分分析等方法，但数据分布特征对其分析结果影响较大，而灰色关联分析法原理简单，适用于多因素非典型分布的数据，分析结果可用于定性研究[49]。本研究以凝血酶作为亲和超滤靶酶结合灰色关联分析可快速、灵敏、简便地发现丹参总酚酸提取物和丹参酮提取物中直接凝血酶抑制剂。

生物亲和超滤质谱结果显示，当有丹参酮类成分存在时，丹酚酸 A 与凝血酶的结合率显著降低；灰色关联分析结果显示，紫草酸和丹酚酸 A 是丹参总酚酸提取物凝血酶抑制活性的物质基础，然而，却对在丹参酮提取物的凝血酶抑制活性没有贡献；丹酚酸 A 与 4 种丹参酮类成分间的相互作用实验结果显示，在丹酚酸 A 和丹参酮共同存在的混合体系中，其凝血酶抑制活性显著下降，提示丹参酚酸与丹参酮类成分共存时，可能存在拮抗作用，且丹参酮类成分更容易与凝血酶活性口袋的结合位点结合，从而影响丹酚酸 A 的凝血酶抑制活性。

本研究采用超滤亲和质谱耦合分子对接虚拟筛选表征丹参活血化瘀功效成分群作用于凝血酶的“共同效应”，发现活性成分的种类、含量及不同成分的含量比例等均是影响其“显效”的关键因素，为中药功效机制的探索和质量控制提供了有价值的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ren J L, Yang L, Qiu S, *et al*. Efficacy evaluation, active ingredients, and multitarget exploration of herbal medicine [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(3): 146-157.

[2] 吴雪芬, 卫晓红, 武玉卓, 等. 中药活性成分靶点确定及作用机制研究方法进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4565-4573.

[3] 刘博文, 戴静, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1634-1644.

[4] 蔡少青, 王璇, 尚明英, 等. 中药“显效理论” 或有助于阐释并弘扬中药特色优势 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3435-3443.

[5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 77.

[6] 母伟林, 邵欣欣, 弭志成, 等. 丹参及其药对的药理研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊. (2024-03-28) [2024-06-28]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R. 20240326. 1813.018.html.

[7] Pang H Q, Wu L, Tang Y P, *et al*. Chemical analysis of the herbal medicine salviae miltiorrhizae *Radix* et *Rhizoma* (Danshen) [J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 51.

[8] Wu Y L, Xu S W, Tian X Y. The effect of salvianolic acid on vascular protection and possible mechanisms [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5472096.

[9] Du G H, Song J K, Du L D, *et al*. Chemical and pharmacological research on the polyphenol acids isolated from Danshen: A review of salvianolic acids [J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87: 1-41.

[10] Fan H Y, Fu F H, Yang M Y, *et al*. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. *Thromb Res*, 2010, 126(1): e17-e22.

[11] Huang Z S, Zeng C L, Zhu L J, *et al*. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(6): 1383-1393.

[12] Wu Y P, Zhao X M, Pan S D, *et al*. Salvianolic acid B inhibits platelet adhesion under conditions of flow by a mechanism involving the collagen receptor alpha2beta1 [J]. *Thromb Res*, 2008, 123(2): 298-305.

[13] Liu L, Li J, Zhang Y, *et al*. Salvianolic acid B inhibits platelets as a P2Y12 antagonist and PDE inhibitor: Evidence from clinic to laboratory [J]. *Thromb Res*, 2014,

134(4): 866-876.

[14] Moon C Y, Ku C R, Cho Y H, *et al*. Protocatechuic aldehyde inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and intravascular thrombosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(1): 116-121.

[15] Gao S, Liu Z P, Li H, *et al*. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II_A [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(1): 3-10.

[16] Maione F, de Feo V, Caiazzo E, *et al*. Tanshinone IIA, a major component of *Salvia milthorriza* Bunge, inhibits platelet activation via Erk-2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1236-1242.

[17] Liu J Q, Lee T F, Miedzyblocki M, *et al*. Effects of tanshinone IIA, a major component of *Salvia miltiorrhiza*, on platelet aggregation in healthy newborn piglets [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 44-49.

[18] Maione F, Cantone V, Chini M G, *et al*. Molecular mechanism of tanshinone IIA and cryptotanshinone in platelet anti-aggregating effects: An integrated study of pharmacology and computational analysis [J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 174-178.

[19] Park J W, Lee S H, Yang M K, *et al*. 15, 16-dihydrotanshinone I, a major component from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Dansham), inhibits rabbit platelet aggregation by suppressing intracellular calcium mobilization [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(1): 47-53.

[20] Kahn M L, Zheng Y W, Huang W, *et al*. A dual thrombin receptor system for platelet activation [J]. *Nature*, 1998, 394(6694): 690-694.

[21] Li Z Y, Delaney M K, O'Brien K A, *et al*. Signaling during platelet adhesion and activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2341-2349.

[22] Coughlin S R. Thrombin signalling and protease-activated receptors [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 258-264.

[23] Dahlbäck B. Blood coagulation [J]. *Lancet*, 2000, 355(9215): 1627-1632.

[24] Kirchhofer D, Nemerson Y. Initiation of blood coagulation: The tissue factor/factor VIIa complex [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, 7(4): 386-391.

[25] Lenich C, Liu J N, Gurewich V. Thrombin stimulation of platelets induces plasminogen activation mediated by endogenous urokinase-type plasminogen activator [J]. *Blood*, 1997, 90(9): 3579-3586.

[26] Rodriguez B A T, Bhan A, Beswick A, *et al*. A platelet function modulator of thrombin activation is causally linked to cardiovascular disease and affects PAR4 receptor signaling [J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 107(2): 211-221.

[27] Martorell L, Martínez-González J, Rodríguez C, *et al*. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99(2): 305-315.

[28] Murugappan S, Shankar H, Bhamidipati S, *et al*. Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets [J]. *Blood*, 2005, 106(2): 550-557.

[29] Di Nisio M, Middeldorp S, Büller H R. Direct thrombin inhibitors [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10): 1028-1040.

[30] Sun Z G, Yang-Liu, Zhang J M, *et al*. The research progress of direct thrombin inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(16): 1574-1585.

[31] Lu J, Song H P, Li P, *et al*. Screening of direct thrombin inhibitors from *Radix Salviae Miltiorrhizae* by a peak fractionation approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 85-90.

[32] Shi Y D, Sun W, Pan X Y, *et al*. Establishment of thrombin affinity column (TAC)-HPLC-MS/MS method for screening direct thrombin inhibitors from *Radix Salviae Miltiorrhiae* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1139: 121894.

[33] Zhai J Q, Zhao M H, Cao X J, *et al*. Metal-ion-responsive bionanocomposite for selective and reversible enzyme inhibition [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(49): 16925-16928.

[34] Hou X F, Sun M, Bao T, *et al*. Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1800-1813.

[35] Tao Y, Yan J Z, Cai B C. Label-free bio-affinity mass spectrometry for screening and locating bioactive molecules [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2021, 40(1): 53-71.

[36] 赖莉, 蒋正阳, 冯宇鹏, 等. 丹参活性成分生物可及性分析 [J]. 药学学报, 2022, 57(8): 2435-2444.

[37] Wang L, Liu Y F, Luo Y, *et al*. Quickly screening for potential α-glucosidase inhibitors from guava leaves tea by bioaffinity ultrafiltration coupled with HPLC-ESI-TOF/MS method [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1576-1582.

[38] Lottenberg R, Hall J A, Fenton J W 2nd, *et al*. The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates: Hydrolysis of Tos-Gly-Pro-Arg-pNA and D-Phe-Pip-Arg-pNA by human alpha and gamma and bovine alpha and beta-thrombins [J]. *Thromb Res*, 1982, 28(3): 313-332.

[39] 徐境荣, 于钦川, 赖莉, 等. 基于多指标成分含量测定探索黄芩药材质量综合评价模式 [J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3141-3152.

[40] 孙志, 赵灵灵, 左莉华, 等. UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定丹灯通脑软胶囊中多种化学成分 [J]. 中国现代应

用药学, 2019, 36(2): 191-199.

[41] 黄雅兰, 张艳玲, 向琴, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱快速鉴定左归降糖舒心方化学成分 [J]. 分析测试学报, 2022, 41(7): 963-977.

[42] 陈嘉慧, 张雅心, 刘孟华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(1): 1-9.

[43] Chen Y, Zhang N, Ma J, *et al*. A Platelet/CMC coupled with offline UPLC-QTOF-MS/MS for screening antiplatelet activity components from aqueous extract of Danshen [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 178-183.

[44] 刘丽伟, 周霖, 孙志, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的芪参益气滴丸中主要化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5761-5771.

[45] Zhu Z Y, Zhang H, Zhao L, *et al*. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhiza*e by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(12): 1855-1865.

[46] Song H P, Wu S Q, Hao H P, *et al*. A chemical family-based strategy for uncovering hidden bioactive molecules and multicomponent interactions in herbal medicines [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23840.

[47] Wong K K, Ngo J C, Liu S J, *et al*. Interaction study of two diterpenes, cryptotanshinone and dihydrotanshinone, to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by molecular docking and kinetic analysis [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 187(1/2/3): 335-339.

[48] Liu C Y, Ma C Y, Lu J, *et al*. A rapid method and mechanism to identify the active compounds in *Malus micromalus* Makino fruit with spectrum-effect relationship, components knock-out and molecular docking technology [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 150: 112086.

[49] Wubuli A, Abdulla R, Zang D, *et al*. Spectrum-effect relationship between UPLC fingerprints and melanogenic effect of *Ruta graveolens* L [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2023, 1221: 123683.

[责任编辑　王文倩]