

代谢指纹谱用于丹参活性成分的分析与筛选*

□吴 曦 罗碧容 (大连海洋大学 大连 116023)

袁文杰 (大连理工大学 大连 116024)

于凤娇 (大连海洋大学 大连 116023)

孔 亮** (大连海洋大学 大连 116023)

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

李 伟 李 微 (大连海洋大学 大连 116023)

雷小元 邹汉法 (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要:建立了以 SD 大鼠肝匀浆作为体外代谢方法,并结合 HPLC-DAD-MS 分析手段作为代谢指纹谱平台,在此基础上,对单味中药丹参进行体外代谢,采用 HPLC-DAD-MS 辅以 MALDI-TOF-MS 对代谢前后的指纹谱差异与相似性进行比较,结合抑菌、血凝体外药理实验测定丹参提取物及其代谢物、3 种主要成分的活性。抑制大肠杆菌活性和血凝活性药理实验结果表明,丹参代谢物活性均高于其提取物。通过考察隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的抑菌活性与血凝活性,并结合体外肝匀浆代谢实验,解释了其中的原因:丹参抑制大肠杆菌活性增高是因为隐丹参酮代谢转化为抑制率高的丹参酮 II_A 引起的;丹参提取物血凝活性在代谢后升高的原因是由于隐丹参酮代谢转化为血凝活性更高的丹参酮 II_A 引起的。

关键词:代谢指纹谱 丹参 肝匀浆 总差异率 抑菌活性 血凝活性

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.034

丹参(*Radix Salviae miltiorrhizae*)为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。中医用于月经不调、癥瘕积聚、胸腹刺痛、神经衰弱、冠心病心绞痛、肝脾肿大、痈肿丹毒等治疗^[1]。有关丹参

的研究始于 1934 年,其主要化学成分有菲醌类化合物:丹参酮 I (Tanshinone I)、丹参酮 II_A (Tanshinone II_A)、丹参酮 II_B (Tanshinone II_B)、隐丹参酮 (Cryptotanshinone)、二氢异丹参酮 I (Dihydroisotanshinone I)、丹参醌 A、B、C (Tanshinquinone A, B, C),丹参新醌甲、乙、丙 (Neotanshinone A, B, C); 酚

收稿日期: 2010-11-19

修回日期: 2011-01-30

* 国家自然科学基金(21075012): 线粒体能量代谢指纹谱用于中药活性成分筛选与分析的研究, 负责人: 孔亮; 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(2009R13): 基于生物指纹谱原理的天然海洋药物活性物质筛选技术平台的研究, 负责人: 孔亮; 辽宁省教育厅实验室专项(2008S066): 基于生物指纹谱原理的天然海洋药物活性物质筛选, 负责人: 孔亮; 国家自然科学基金(31071612): 贝类凝集素对水产品中常见致病菌的抑菌效应及作用机制的研究, 负责人: 李伟。

** 通讯作者: 孔亮, 教授, 主要研究方向: 天然药物的生物指纹谱研究, Tel: 0411-84762033, E-mail: liangkong@dlou.edu.cn。

酸类化合物: 丹参素 (β -3,4-二羟基苯基乳酸, β -3,4-dihydroxyphenyl lactic acid/danshensu)、丹参酸甲、乙、丙 (Danshensuan A, B, C), 其它还有原儿茶酸 (Protocatechuic acid)、原儿茶醛 (Protocatechuic aldehyde) 等^[2-5]。

药物在体外具有较好的活性并不代表其在体内也具有同样的活性, 这是因为与生物体内靶组织起药效作用的既可能是药物的原形活性成分, 也可能是经体内代谢后的代谢产物, 所以在西药筛选的初级阶段, 药物的体外代谢已成为筛选过程中的重要环节^[6]。姚新生曾指出中药在体内发挥药效的物质基础研究是中药药理研究上升到分子水平的必要条件, 是全面揭示中药药效的必由之路, 因此, 用基于分子识别的体外模型筛选和分析中药活性成分时, 不仅要考虑中药原形成分, 还要考虑其体内代谢物^[7]。近年来, 针对中药多成分、多靶点、多途径的作用特点, 我们提出了中药生物指纹图谱筛选中药活性成分的概念, 它不仅较好地保持了中药整体性作用机理研究的特点和引入了体内模拟过程, 而且还可以达到中药中多种成分药理参数评价、活性成分和活性代谢产物筛选、发现反映中药不同药性特征的生物与化学标记物的目的^[8-11]。作为其中的一个重要环节——代谢指纹谱以体外代谢研究和发现中药的活性代谢物与活性的代谢消除对中药活性成分筛选及改造具有重要意义^[11-13]。该方法通过对代谢前中药的指纹图谱与代谢后生物指纹图谱的分析和比较, 揭示中药中具有代谢活性的化合物的生物转化规律, 并对具有代谢活性的化合物和新生成的代谢产物进行结构鉴定, 最终达到筛选和分析中药活性成分的目的。

目前关于丹参中有效成分分离分析与药理活性的国内外研究报道较多, 但是有关丹参的代谢研究的报道比较少。自 1983 年以来, 有学者先后通过动物体内代谢或体外代谢研究了隐丹参酮、丹参酮 II_A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I 等活性化合物的代谢途径, 以及代谢物的活性^[14-17]。迄今为止, 丹参提取物的代谢研究仅限于代谢途径与代谢物的分析, 忽略了中药多成分、整体组合作用以及代谢前后活性变化的特点。因此, 本文以 SD 大鼠肝匀浆体外代谢方法结合 HPLC-DAD-MS 分析手段作为代谢指纹谱平台, 采用抑菌活性、血凝活性药理实验分析和筛选了丹参中的活性成分。

一、材料与方法

1. 试剂与材料

单味中药丹参购自当地药店; 隐丹参酮 (Cryptotanshinone, 纯度>99%)、丹参酮 II_A (Tanshinone II_A, 纯度>99%)、丹参酮 I (Tanshinone I, 纯度>99%) 购自中国药品生物制品检定所; 乙腈 (色谱纯), 购自德国 Merck 公司; 其它试剂均为分析纯; 实验用水经 Mill-Q 水处理系统 (Millipore, USA) 纯化。

2. 仪器设备

LCMS-2010 型液相色谱 2 质谱联用仪由两台 LC-10ADvp 泵及一台 SCL-10Avp 控制器、SPD-M10Avp DAD、SIL-10ADvp 自动进样器、LCMS-2010A MS 组成 (日本 Shimadzu); MALDI-TOF-MS autoflex (德国 Bruker); 分析型 C₁₈ 色谱柱 (150mm×4.0mm I.D., 5 μ m, 色谱填料均为 Kromasil, 国家色谱研究与分析中心); 低压 C₁₈ 液相色谱制备柱 (200mm×25mm I.D., 40 μ m, 固定相为 Zeochem, 国家色谱研究与分析中心); C₁₈ SPE 柱 (制备型 10g/50 mL, 25g/50mL, 分析型 500mg/5mL, 40 μ m, 固定相为 Zeochem, 国家色谱研究与分析中心, 大连, 中国); DL 型固相萃取器及萃取柱 (国家色谱研究与分析中心)。

3. 单味中药样品的制备

准确称取 20g 经粉碎 (35 目) 的丹参粉末置入烧瓶内, 加入 125mL 乙醇浸泡 30min, 回流煮沸计时, 1h 后将提取液经微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤得到提取液。将提取液分成两等份, 减压挥去溶剂, 将其中一份提取物加入 2.25mL 乙醇溶解得到用于体外代谢指纹分析的样品溶液。另一份也移入活化的 10g/50mL C₁₈ SPE 柱中, 先后用 20mL 水淋洗, 20mL 50% (v/v) 乙腈/水淋洗, 然后用 30mL 乙腈淋洗并收集, 减压蒸馏挥去溶剂, 加入 2.25mL 乙醇溶解得到代谢筛选样品溶液。

4. 大鼠肝匀浆的制备

制备与匀浆的性能表征见文献^[13]。

5. 丹参样品在肝匀浆的温孵

体外代谢温孵时, 先后准确移取 1mL 肝匀浆、1mL Krebs-Henseleit 缓冲液^[18]、75 μ L 丹参样品溶液混合, 使反应体积为 2.075mL。加入辅助因子 NADPH, 使之在反应体系中的浓度为 1mM。混匀后, 放入水浴摇床中 37°C 下温孵。反应 60min 后, 加入

1.04mL 乙腈终止反应。空白实验中,以 1mL Krebs-Henseleit 缓冲液替代肝匀浆。

制备代谢物时,按比例放大肝匀浆代谢体系。

6. 代谢后的丹参样品的制备

常温下,将上述温孵物在 9500g 离心 15min 后取上清。得到各上清溶液后,加入纯水稀释 10 倍,再转至活化的分析型 C_{18} SPE 柱中进行预处理。

SPE 处理步骤:上样后加入 1mL 水淋洗,加入 1.2mL 乙腈淋洗收集。预处理后的样品在 35°C 下减压蒸馏挥发去溶剂,再加入 1.5mL 乙醇溶解得到分析样品溶液。

对照实验的样品预处理过程与上相同。

7. 丹参样品代谢前后的分析

色谱指纹色谱条件:流动相为 32%~87% 乙腈/水(v/v),0~90min,流速 $0.76\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,二极管阵列检测器检测。

8. 丹参新酮的制备

称取 150g 丹参粉末置于烧瓶内,加入 750mL 乙醇,回流煮沸计时,1h 后将提取液经微孔滤膜($0.45\mu\text{m}$)过滤得到提取液。40°C 下,减压蒸馏挥发去溶剂得到提取物,将提取物移至活化的 25g/50mL SPE 柱中,分别用 50mL 的 55%、90%、100%(v/v)乙腈/水溶液淋洗并收集,收集液经 HPLC 分析,丹参新酮在 90%的淋洗馏分中。40°C 下,减压蒸馏挥发去 90%馏分中的溶剂得到含有丹参新酮的提取物。以 75%(v/v)乙腈/水为流动相,用低压制备色谱柱进一步纯化上述提取物,流速 $2.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,以 20min 为间隔分段收集馏分,经 HPLC 分析,丹参新酮在第 10、11 段馏分中,合并两个馏分,减压蒸馏挥发去溶剂得到丹参新酮粗提物。再以分析型 C_{18} 色谱柱精制丹参新酮,流动相为 65%(v/v)乙腈/水,流速 $0.76\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,260nm 波长检测,收集 23min 的色谱峰,多次进样后合并收集液,挥发掉溶剂得到丹参新酮。用 UV-Vis 光谱、质谱鉴定丹参新酮。

9. 丹参乙醇提取物及其代谢物、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的抑菌实验

(1) 对照品溶液制备。

精确称量 2.2mg 隐丹参酮对照品置于 25mL 容量瓶中,加入乙醇溶解定容;精确称量 2.2mg 丹参酮 II_A 对照品置于 25mL 容量瓶中,加入乙醇溶解定容;精确称量 1.2mg 丹参酮对照品置于 50mL 容量瓶中,加入乙醇溶解定容。

(2) 丹参代谢物溶液制备。

按照上述方法制备丹参乙醇提取液后,移取 750 μL 至肝匀浆温孵体系中(肝匀浆与缓冲液加入量按比例放大)进行代谢反应,1h 后加入乙腈终止反应,以上述方法处理丹参代谢物,得到代谢后样品并减压蒸馏挥发去溶剂,精确称量获得的代谢提取物配制成浓度为 $4.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丹参代谢后样品乙醇溶液。

鉴于丹参中成分与肝匀浆中蛋白质有较强的吸附,为消除相互作用的影响,因此对照样品制备时,首先将适量丹参乙醇提取液与肝匀浆混匀,然后立即加入乙腈终止反应,按照上述同样的预处理方法得到浓度为 $4.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照样品乙醇溶液。

(3) 菌种。

大肠杆菌(E.coli,革兰氏阴性菌),枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis 7658,革兰氏阳性菌)。

(4) LB 培养基。

酵母提取物 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g,琼脂 15g,蒸馏水 1L,pH7.0。

(5) 实验步骤。

①菌液制备 取活化好的菌种,用无菌生理盐水洗下,混入冷却的 LB 培养基中,使其菌液浓度为 $10^8/\text{mL}$,制成带菌平板。

②抑菌实验 新华 1 号滤纸用打孔器打成直径为 6mm 圆片,高压蒸汽灭菌后烘干备用。然后将滤纸片用无菌镊子夹取放入带菌平板上,用微量取液器定量加入测试样品,置于 36°C 培养 24h,测量抑菌圈直径。

10. 丹参乙醇提取物与其代谢物、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的血凝集活性试验

(1) 血浆采集。

新鲜 A 型、B 型血浆均采自健康男性(35 岁)。

(2) 红细胞的消化。

将红细胞悬浮于 10mL $0.15\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液(pH7.4)中,加入 2mg 胰蛋白酶,37°C 下消化 3h,然后用 Tris 缓冲液洗 3 次,用 Tris 缓冲液配成 2%红细胞悬浮液。

(3) 血凝集活性测试。

在微量滴定在 96 孔板上,将样品溶液 25 μL 连续 2 倍稀释于含有 $0.15\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液(pH7.4)中,然后在每个孔中加入等体积搅动后的 2%红细胞悬浮液。血凝结果在 30min 后在显微镜下目测记录。

二、结果与讨论

1. 丹参的体外代谢指纹谱分析

首先,对丹参粗提物的体外代谢前后进行指纹分析,寻找丹参成分的代谢指纹谱中的主要变化。经SD大鼠肝匀浆体外代谢后,丹参提取物的代谢前后的色谱指纹谱见图1。

如图1所示,丹参粗提物代谢之前的色谱指纹谱中可以检测到40个指纹峰,代谢后的代谢指纹谱中可检测到24个指纹峰。经谱图比较可以看出,未见新的色谱峰出现,没有检测到丹参粗提物中的8、12、13等其它16个指纹峰。其中色谱峰10、19、29、38、40等峰面积改变明显或完全消失(见表1)。以公式1^[19]计算两谱图之间的总差异率为0.929,差异较大。而代谢指纹峰的重叠率为75.0%,代谢谱图与提取物谱图的相似性较高。从总差异率与重叠率可以说明代谢前后的指纹谱差异主要是由峰面积的改变或色谱峰的消除而引起的,形成这样的原因有两种可能性:一是在肝匀浆的作用下,丹参中的化学成分发生了代谢转化,形成的代谢物本身是丹参中的成分;二是丹参中的活性成分如丹参酮II_A等易与蛋白结合,且结合力较强,因此不排除丹参代谢指纹谱中峰面积减小或指纹峰消除是因与肝匀浆中蛋白结合而引起的。

$$\text{指纹峰总差异率} = \frac{\sum (|A_i^b - A_i^a| / A_i^b)}{n} \quad (1)$$

其中 A_i^b —代谢前归一化峰面积; A_i^a —代谢后归一化峰面积; n —色谱峰个数。

2. 丹参中成分丹参新酮的鉴定及其在肝匀浆体系中的变化

在丹参的SD大鼠肝匀浆体外代谢的色谱指纹谱中,色谱峰40在代谢指纹谱中完全消失。为验证该化合物在体外代谢中是否发生生物转化,因此从丹参中制备出纯品(见实验部分),经RP-HPLC归一化法测定其纯度>99%。该化合物的UV-Vis光谱图(见图2A)与文献中报道的丹参新酮一致^[20-21],吸收峰分别为(nm):215、258、362、434。在质谱分析(APCI)时,其负离子模式下检测到的分子离子峰分子量为282[M]⁻,正离子模式

为283[M+H]⁺,与文献中报道的丹参新酮数据一致,因此确定该化合物是丹参新酮。

将适量的丹参新酮乙醇溶液加入SD大鼠肝匀浆体外代谢反应液中(其它条件见实验部分),混匀后立加入乙腈终止反应,按照实验部分中的方法对样品预处理得到分析样品溶液,对照实验时以等体积的乙醇替代丹参新酮溶液。反应前后的色谱图比较见图2。在与肝匀浆溶液混合后,谱图中的丹参新酮峰消失,而且谱图中也没有新的色谱峰出现,因此可以推断丹参新酮与肝匀浆中的蛋白或其它分子发生了较强的吸附,预处理时与蛋白质等大分子同时被排除。鉴于此,可以认为在丹参提取物的代谢指纹

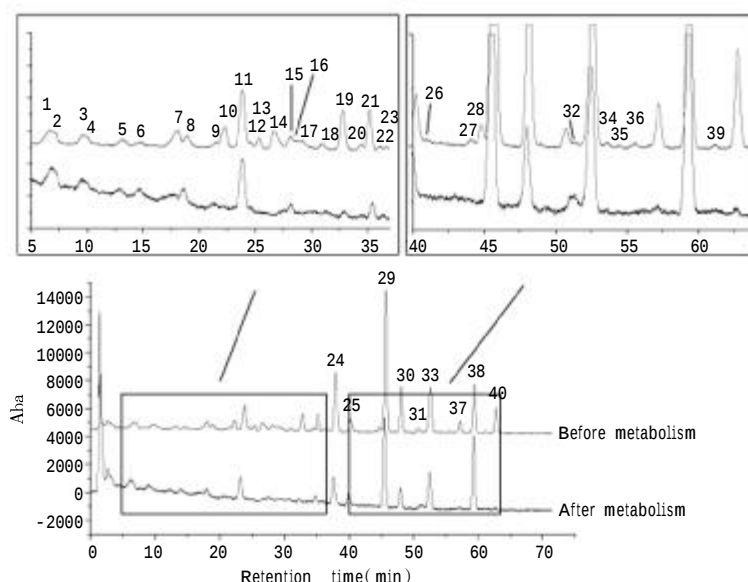


图1 丹参提取物的体外代谢前后的色谱指纹图

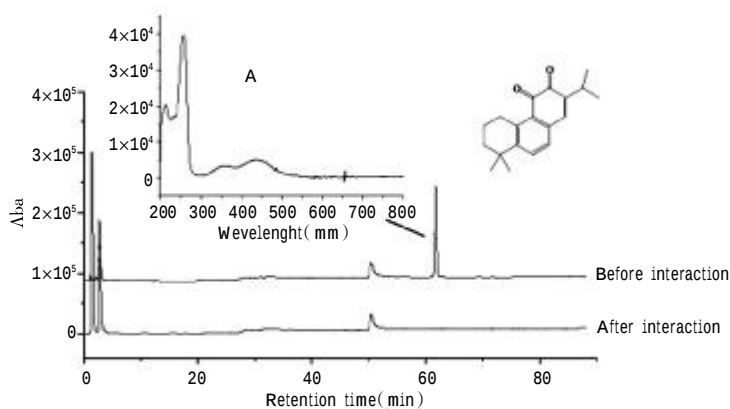


图2 丹参新酮与SD大鼠肝匀浆相互作用前后的色谱图与丹参新酮的紫外光谱图(A)及分子结构

表 1 丹参提取物经体外代谢前后的峰面积比较

色谱峰 序号	保留时间 (min)	峰面积		归一化峰面积		差异率*
		代谢前	代谢后	代谢前	代谢后	
1	6.77	37214	10544	0.01729	0.03207	0.8548
2	7.02	14181	4420	0.006589	0.01344	1.040
3	9.58	14684	3311	0.006822	0.01007	0.4761
4	9.84	8690	2572	0.004038	0.007823	0.9375
5	13.23	13990	4079	0.0065	0.01241	0.9087
6	14.82	7883	4105	0.003663	0.01249	2.409
7	18.09	50800	6054	0.02360	0.01841	0.2199
8	18.92	25171	0	0.0117	0	1
9	21.45	8477	1689	0.003939	0.005137	0.3043
10	22.32	41036	345	0.01907	0.001049	0.945
11	23.86	112255	22025	0.05216	0.06699	0.2844
12	24.53	4149	0	0.001928	0	1
13	25.33	14685	0	0.006823	0	1
14	26.62	41738	1680	0.01939	0.00511	0.7365
15	28.17	17794	2812	0.008267	0.008553	0.03453
16	28.57	5258	0	0.002443	0	1
17	29.16	10955	0	0.00509	0	1
18	31.00	8801	1734	0.004089	0.005274	0.2898
19	32.82	69869	2471	0.03246	0.007516	0.7685
20	34.46	8386	0	0.003896	0	1
21	35.18	65010	4921	0.0302	0.01497	0.5045
22	36.14	5261	1347	0.002444	0.004097	0.6761
23	36.78	3894	0	0.001809	0	1
24	37.90	265235	31166	0.1232	0.9479	0.2308
25	40.2	49339	11733	0.02292	0.03569	0.5567
26	41.00	2639	0	0.001226	0	1
27	44.21	6753	0	0.003138	0	1
28	44.81	17819	0	0.008279	0	1
29	45.7	511594	83830	0.2377	0.255	0.07269
30	48.12	163715	16630	0.07606	0.05058	0.335
31	50.69	17986	0	0.008357	0	1
32	51.48	2932	3173	0.001362	0.009651	6.084
33	52.61	197995	36878	0.09199	0.1122	0.2193
34	53.63	2542	0	0.001181	0	1
35	54.46	1208	0	0.000561	0	1
36	55.61	3868	0	0.001797	0	1
37	57.20	39254	1352	0.01824	0.004112	0.7745
38	59.36	183422	69910	0.08522	0.2126	1.495
39	61.05	3006	0	0.001397	0	1
40	62.74	92829	0	0.04313	0	1

* 差异率: $|A_i^0 - A_i^1|/A_i^0$

谱中的色谱峰 40(丹参新酮)并不是因为体外代谢而消除,而是由于与蛋白等大分子之间存在强的相互作用,使大部分游离的丹参新酮减少引起代谢指纹谱峰的减小。

3. 丹参中主要活性成分的 SD 大鼠肝匀浆体外代谢

在图 1 中,色谱峰 29、30、38 的保留值、UV-Vis 光谱图及质谱图与对照品隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的数据一致(见图 3),因此色谱峰 29、30、38 分别鉴定为隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A。

将上述 3 种单体化合物为原形成分进行肝匀浆体外代谢,其代谢反应后的色谱图比较如图 4、5 所示。

从图 4、5 中可以看到丹参酮 II_A 与丹参酮 I 与大鼠肝匀浆温孵后,均没有新的色谱峰出现,其中丹参酮 I 的峰面积的减少可能与肝匀浆中的蛋白等大分子之间的相互作用有关。隐丹参酮经体外代谢后,产生了一个新的色谱峰(图 5),其保留值、紫外光谱及质谱数据与丹参酮 II_A 一致,所以隐丹参酮的代谢产物为丹参酮 II_A,这与文献中的报道是一致的^[14-16]。进一步说明在丹参粗提物的代谢指纹谱中,隐丹参酮发生了同样的代谢过程,其峰面积因生物转化而减小,代谢产物丹参酮 II_A 的生成使色谱峰 38 面积有所增加。

在本文采用的 SD 大鼠肝匀浆体外代谢体系下,隐丹参酮及其代谢产物丹参酮 II_A 随代谢时间的变化曲线见图 6。隐丹参酮在 100min 时,其色谱峰面积减小的趋势减缓,120min 时峰面积减小了 7.1%。丹参酮 II_A 峰面积在 60~90min 之间增加的趋势减缓,在 120min 时峰面积增加了 62.6%。

在体外代谢中,肝匀浆含量的改变有可能引起代谢产物结构或浓度的变化,因此有必要对肝匀浆含量对代谢产物的影响进行考察。随着肝匀浆浓度的增加,在代谢物的分离谱图中除了丹参酮 II_A 以外无新代谢产物的色谱峰出现。隐丹参酮及其代谢物随肝匀浆含量的变化曲线见图 7,在 45mg·mL⁻¹ 时,隐丹参酮峰面积的减小趋势

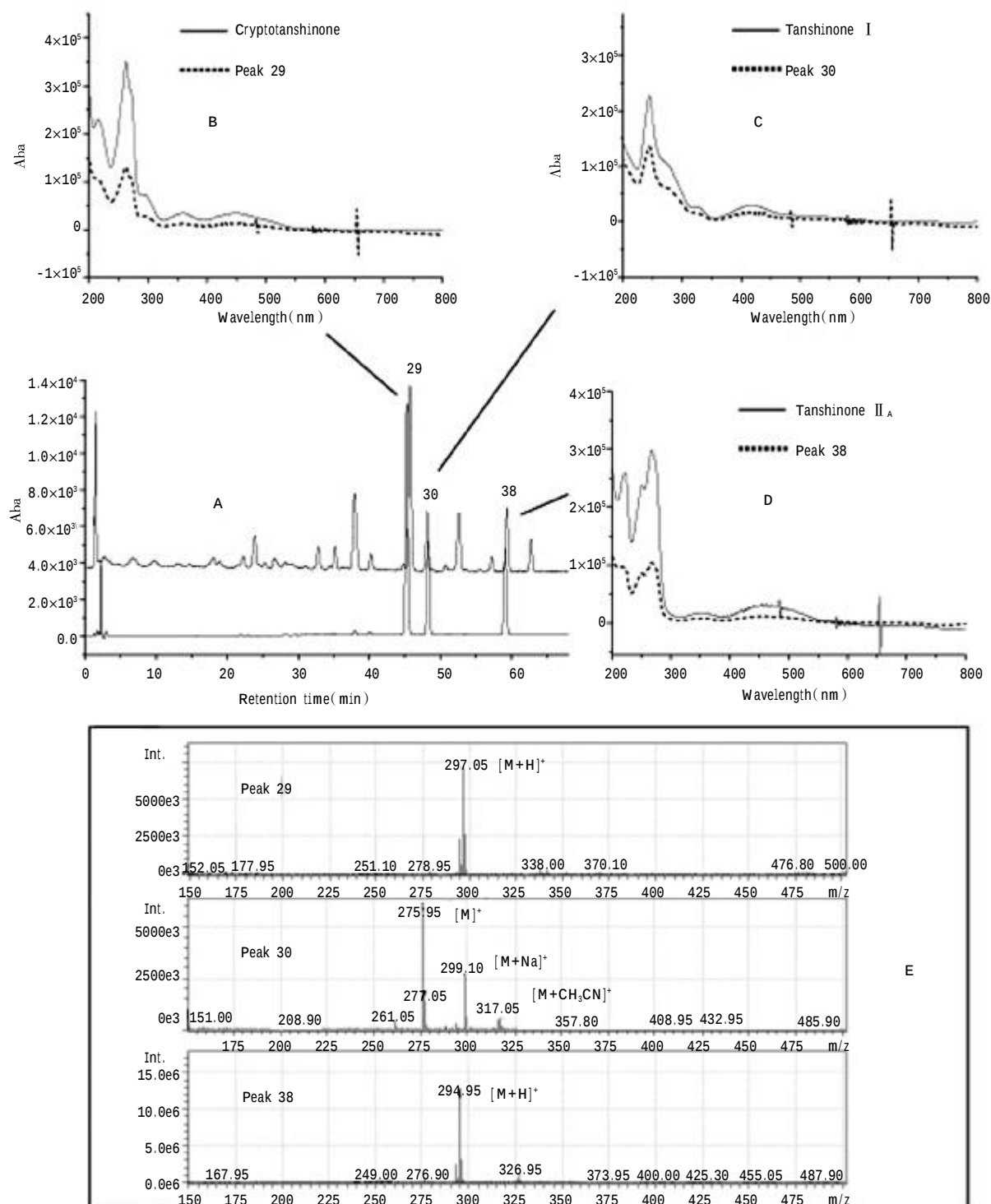


图3 丹参提取物、对照品隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的色谱分离谱图(A)与紫外光谱图(B,C,D)以及 Peak 29、30、38 的质谱图(E)

减缓,而丹参酮 II_A 的则一直缓慢增加。

4. 丹参乙醇提取物与其代谢物、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的抗菌活性

文献中关于丹参煎剂具有抗菌活性已有报道,

国内学者对丹参中的隐丹参酮、丹参酮 II_A 等单体化合物的抗菌活性也有所研究^[14-16,22],但是对于丹参提取物代谢前后抗菌活性的变化,以及这种变化是否与其中单体化合物的代谢转化直接相关尚未见报

道。

试验采用大肠杆菌和枯草芽孢杆菌作为抑菌试验的菌种,丹参提取物与其代谢物、隐丹参酮、丹参

酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A的抑菌测试结果如图8所示,抑菌环测定结果见表2。

从图8与表2可以看出,在相同的药物加入量时,丹参提取物的在大肠杆菌平板上的抑菌环直径小于其代谢物抑菌环直径,说明代谢物抑制大肠杆菌的活性高于丹参提取物。这是因为丹参经过SD大鼠肝匀浆体外代谢后,其中抑菌活性成分因生物转化而使组构成发生改变,导致抗菌活性的改变。同时,3种活性成分的抑菌实验结果表明丹参酮Ⅰ没有抑制大肠杆菌的活性。在相同药物加入量下,丹参酮Ⅱ_A在带菌平板上的抑菌环直径大于隐丹参酮,表明丹参酮Ⅱ_A抑制大肠杆菌的活性要高于隐丹参酮。

在上述丹参及其活性成分的代谢研究中已经阐述了隐丹参酮与丹参酮Ⅱ_A之间的生物转化关系,二者之间的转化可能与丹参提取物的代谢前后抑菌活性的变化相关。以HPLC分析丹参的代谢提取物与其对照样品进行比较发现(见实验部分),对照样品中的峰面积比为58:42(260nm),经过1h体外代谢反应后,二者之间的峰面积比变为53:47(260nm),因此可以推断隐丹参酮生成更高抑菌活性活性的代谢产物——丹参酮Ⅱ_A是丹参提取物经过肝匀浆体外代谢后抑制大肠杆菌活性提高的主要原因。

在枯草芽孢杆菌作为抑菌试验中,丹参提取物与其代谢物、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A均没有抑制活性。

5. 丹参乙醇提取物与其代谢物、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A的血凝集活性

丹参在药理活性的研究中表现出较强的抗炎免疫活性,凝集反应是免疫反应中的一个过程,血凝集活性试验是测试凝集发应的常用方法。丹参提取物等样品血凝集活性试验的结果见表3和4。

在A型血的血凝测试中,没有观察到空白样品、丹参提取物、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ的红细胞凝集现象,均为阴性,表明这些化合物没有血凝集活性。高浓度的丹参酮Ⅱ_A表现出一定的阳性,即有血凝集活性,但在浓度小于 $0.022\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时未观察到活性。

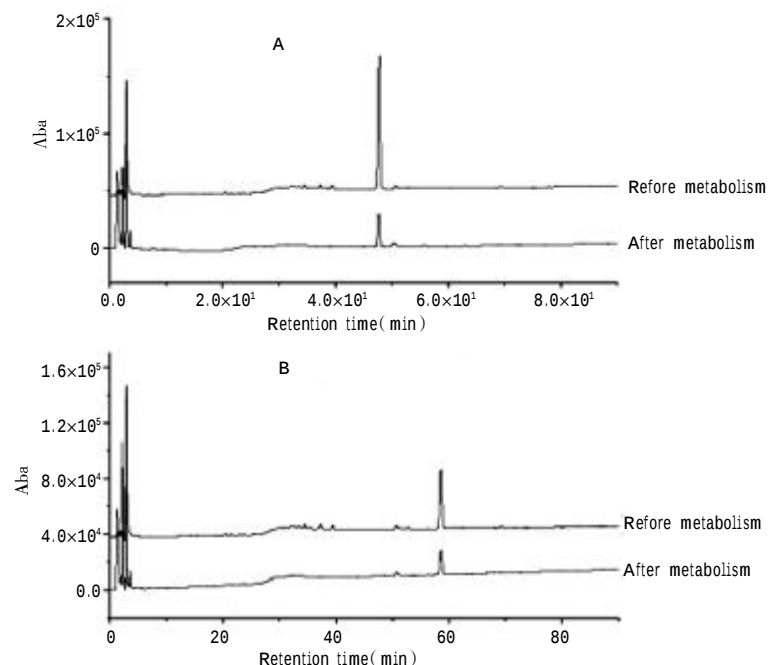


图4 丹参酮Ⅰ(A)与丹参酮Ⅱ_A(B)的肝匀浆温孵前后色谱图

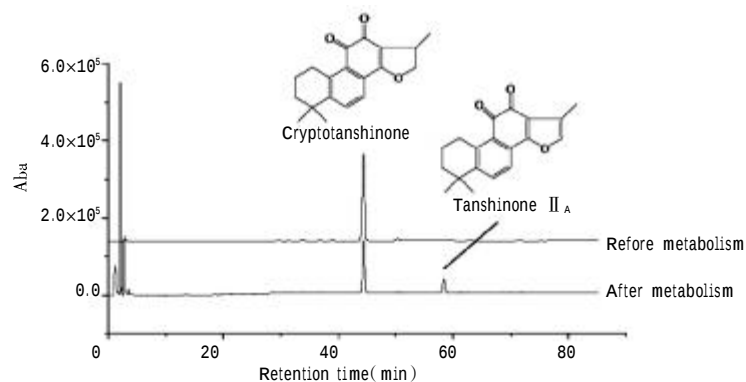


图5 隐丹参酮代谢前后色谱图以及隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A分子结构式

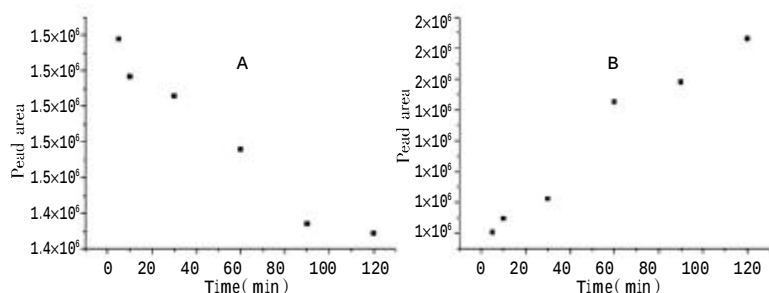


图6 代谢时间对隐丹参酮(A)及其代谢产物丹参酮Ⅱ_A(B)的影响

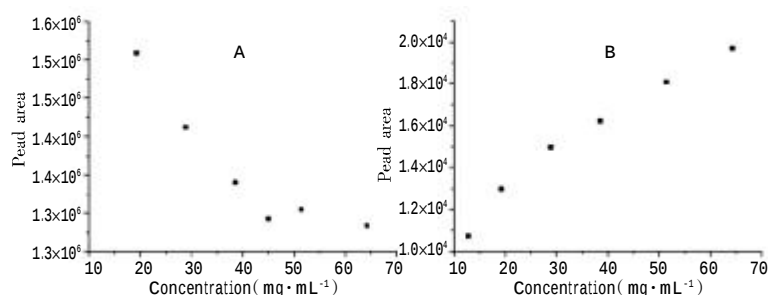


图 7 SD 大鼠肝匀浆浓度对隐丹参酮(A)及其代谢产物丹参酮 II_A(B)的影响

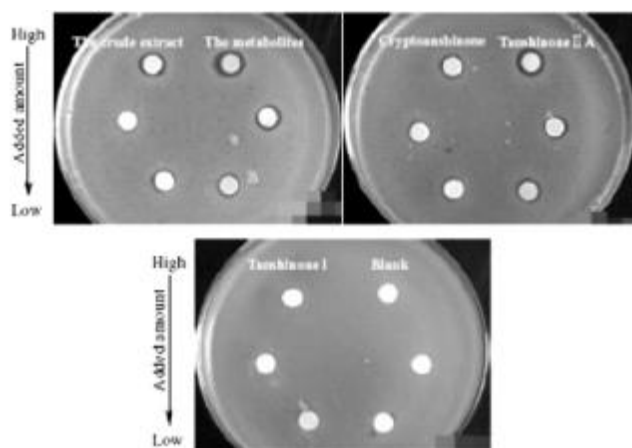


图 8 丹参提取物及其代谢物、丹参中成分的抑菌环试验

表 2 丹参提取物及其代谢物、丹参中成分的体外抑菌活性

样品	样品量 (μg)	抑菌环直径 (mm)			平均值 (mm)	RSD (%)
丹参提取物	16	8.5	9.0	8.0	8.5	5.88
	8	6.9	7.0	6.9	6.9	0.832
	4	6.2	6.5	6.1	6.3	3.32
丹参代谢物	16	9.2	10.0	11.2	10.1	9.93
	8	8.0	8.9	9.0	8.6	6.38
	4	7.0	7.0	6.2	6.7	6.86
隐丹参酮	0.352	7	7.5	7.7	7.4	4.87
	0.176	6.5	6.1	6.7	6.4	4.75
	0.088	6.2	-	6.2	6.2	0
丹参酮 I	0.352	-	-	-	-	-
	0.176	-	-	-	-	-
	0.088	-	-	-	-	-
丹参酮 II _A	0.352	9	8.9	8.7	8.9	1.72
	0.176	7	6.9	6.9	6.9	0.833
	0.088	6.1	6.5	6.4	6.3	3.29

与丹参提取物相比,其代谢物的浓度为 $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时也有微弱的血凝活性,这与隐丹参酮代谢生成丹参酮 II_A 后,代谢物中的丹参酮浓度增加有关。

丹参提取物等样品对 B 型血的血凝活性测定也具有相似的结果,空白样品、丹参提取物、隐丹参酮、丹参酮 I 均为阴性,红细胞未发生凝集,没有血凝活性。丹参酮 II_A 从高浓度到低浓度均表现出阳性,有较强的血凝活性。与丹参提取物相比较,代谢物在高浓度时显示出一定的血凝活性,浓度低于 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时则没有血凝活性,这是丹参酮 II_A 因代谢浓度升高所致。

从代谢角度来看,丹参提取物体外代谢产物血凝活性的提高与其中隐丹参酮转化为高凝集活性的丹参酮 II_A 有直接关系。通常药物的凝集活性在一定程度上与其免疫活性有关,因此上述结果与临床上关于丹参具有抗炎免疫活性是相符的。

三、结 论

以 SD 大鼠肝匀浆体外代谢方法为代谢指纹谱平台,对单味中药丹参及其主要活性成分隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参新酮进行体外代谢,采用指纹谱分析手段对丹参的体外代谢谱图之间的差异与相似性进行比较分析,以抑菌试验、血凝试验测定丹参提取物及其代谢物、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的活性。从代谢的角度解释了丹参抗菌活性与血凝活性在代谢前后变化的主要原因。其中大肠杆菌的抑菌试验结果显示,丹参代谢物活性高于丹参提取物,通过比较隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的抑菌活性,解释了丹参代谢物的活性提高的主要原因——隐丹参酮因代谢转化为抑制大肠杆菌活性高的丹参酮 II_A。在枯草芽孢杆菌抑菌试验中,丹参提取物及其代谢物、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 均没有显示活性。血凝试验表明,对于人 A 型、B 型血的红细胞,丹参代谢物的凝集活性均高于丹参提取物,并且丹参代谢物对 B 型血红细胞凝集活性高于其对 A 型血红细胞的

表3 丹参提取物及其代谢物、丹参中成分的
A型血红细胞血凝测试

样品 \ 稀释倍数	1	2	4	8	10
隐丹参酮	-	-	-	-	-
丹参酮 I	-	-	-	-	-
丹参酮 II A	+	+	-	-	-
丹参代谢物	+	-	-	-	-
丹参提取物	-	-	-	-	-
空白	-	-	-	-	-

表4 丹参提取物及其代谢物、丹参中成分的
B型血红细胞血凝测试

样品 \ 稀释倍数	1	2	4	8	10
隐丹参酮	-	-	-	-	-
丹参酮 I	-	-	-	-	-
丹参酮 II A	+	+	+	+	+
丹参代谢物	+	+	-	-	-
丹参提取物	-	-	-	-	-
空白	-	-	-	-	-

活性。同时也考察了隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 的血凝活性,只有丹参酮 II A 具有活性,这也是丹参代谢物的凝集活性均高于丹参提取物的原因。

参考文献

- 1 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用 I. 第1版. 北京:学苑出版社,1993:171~189.
- 2 Hayashi T, Kakisawa H. The structure of miltirone, a new diterpenoid quinone. Chem. Commun, 1970, 5:299.
- 3 房其年,张佩玲,徐宗沛. 丹参抗菌有效成分的研究. 化学学报, 1976,34(3):197~209.
- 4 钱名堃,杨保津,顾文华,等. 丹参有效成分的研究. 化学学报, 1978,36(3):199~206.
- 5 Chang H, Cheng K, Choang T, et al. Structure elucidation and total synthesis of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). J. Org. Chem, 1990, 55:3537~3543.
- 6 Lin J H, Lu A Y H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. Pharmacol. Rev, 1997, 49(4):403~449.
- 7 邱峰,姚新生. 中药体内直接物质基础研究的新思路. 中药药理与临床,1999,15(3):1~2.
- 8 Su X, Kong L, Li X, et al. Screening and analysis of bioactive compounds with biofingerprinting chromatogram analysis of traditional Chinese medicines targeting DNA by microdialysis/HPLC. J. Chromatogr. A, 2005, 1076:118~126.
- 9 Wang C, Wang S, Fan G, et al. Screening of antinociceptive components in *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by comprehensive two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem, 2010, 396:1731~1740.
- 10 Wang C, Zhou J, Wang S, et al. Combined Comparative and Chemical Proteomics on the Mechanisms of *levo*-Tetrahydropalmatine-Induced Antinociception in the Formalin Test. J. Proteome. Res, 2010, 9: 3225~3234.
- 11 Yu F, Kong L, Zou H, et al. Progress on the screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines by biological fingerprinting analysis. Comb. Chem. High T. Scr, 2010, In press.
- 12 孔亮,包永明,于志远,等. 色谱指纹谱用于中药大黄抗肿瘤活性成分的筛选. 色谱,2005,23:470~476.
- 13 Kong L, Yu Z, Bao Y, et al. Screening and analysis of an antineoplastic compound in *Rhizoma chuanxiong* by means of in vitro metabolism and HPLC-MS. Anal. Bioanal. Chem, 2006, 386:264~274.
- 14 罗厚蔚,盛龙生,张胜强,等. 抗分枝杆菌活性成分——丹参酮的胆汁排泄与肝内转化. 药理学报,1983,18(1):1~6.
- 15 谢明智,申竹芳. 隐丹参酮的吸收、分布、排泄和代谢. 药理学报, 1983,18(2):90~96.
- 16 薛明,崔颖,张彬,等. 隐丹参酮在猪体内外的代谢转化与抗菌活性. 中国兽医学报,1999,19(1):49~51.
- 17 Zhang J, Cui M, He Y, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC UV and HPLC MS methods. J. Pharmaceut. Biomed. Anal, 2005, 36: 1029~1035.
- 18 Dogterom P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. Drug Metab. Dispos, 1993, 21(4):699~704.
- 19 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 第1版. 上海:上海科学技术出版社,2003,66~108.
- 20 Hayashi T, Kakisawa H. The structure of miltirone, a new diterpenoid quinone. Chem. Commun, 1970, 5: 299.
- 21 罗厚蔚,胡晓洁,王宁,等. 丹参中抑制血小板聚集的活性成分. 药理学报,1988,23(11): 830~834.
- 22 房其年,张佩玲,徐宗沛. 丹参抗菌有效成分的研究. 化学学报, 1976,34(3):197~209.

Screen and Analysis of Bioactive Compounds in *Radix Salviae Miltiorrhizae*
by Metabolic Fingerprinting AnalysisWu Xi¹, Luo Birong¹, Yuan Wenjie³, Yu Fengjiao¹, Kong Liang^{1,2},Li Wei¹, Li Wei¹, Lei Xiaoyuan², Zou Hanfa²

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. National Chromatographic R & A Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences,
Dalian 116023, China;

3. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: A new strategy for the screen and analysis of bioactive compounds in *Radix Salviae Miltiorrhizae* of traditional Chinese medicine has been developed using metabolic fingerprinting analysis. The metabolizing method was established based on the in vitro metabolism of the SD rat liver homogenate. By means of metabolism methods in vitro, antimicrobial and agglutination activities were determined from the extracts. Metabolites and compounds of *Radix Salviae Miltiorrhizae* were processed by pharmacological assays in vitro. The changes of activities about the *Radix Salviae Miltiorrhizae* extract were observed that the antimicrobial activity against *E. coli* and agglutination activity of blood cells were increased after metabolism. The results indicated that Tanshinone II_A, the metabolite of Cryptoanshinone from *Radix Salviae Miltiorrhizae*, showed higher activities than Cryptoanshinone.

Keywords: Metabolic fingerprinting analysis, *Radix Salviae Miltiorrhizae*, Liver homogenate, Total variance, Antimicrobial activity, Agglutination activity

(责任编辑: 李沙沙 张志华, 责任译审: 王 晶)