

丹参中酚酸类化合物的化学和药理研究进展

王艳梅 曹俊岭

(北京中医药大学东直门医院药学部,北京,100700)

摘要 丹参是我国应用最广泛的中药之一,临床上广泛应用于治疗心血管系统疾病。近年来国内外研究者对丹参的研究取得了显著进展,本文就丹参所含酚酸类化合物的结构及性质、提取分离方法、质量控制手段、药理活性分别进行概述。

关键词 丹参;酚酸类化合物;化学研究;药理研究

Chemical and Pharmacological Studies of Phenolic Acids in Salvia Root

Wang Yanmei, Cao Junling

(Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Salvia Root is one of the most widely used Chinese medicine in our country. It is often adopted in the treatment of cardiovascular diseases. In recent years, remarkable progress has been made in the research of Salvia Root. In this passage, the structure and properties, the extraction and separation method, the method of quality control and the pharmacological activities of phenolic acids in Salvia Root were summarized.

Key Words Salvia Root; Phenolic acids; Chemical studies; Pharmacological studies

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.051

丹参药材(Radix Salvia Miltiorrhizae)取自唇形科鼠尾草属植物丹参(Salvia Miltiorrhiza Bunge)的干燥根及根茎,是我国应用最广泛的中药之一。丹参始载于《神农本草经》,居于上品。据中国药典记载,丹参具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦等功用,因此临床上广泛用于治疗心血管系统疾病,具有良好的药用价值。随着近年来科研水平不断进步,对丹参的研究不断深入和透彻,国内外研究者对丹参的研究取得了显著进展,本文现就丹参所含酚酸类的化合物的结构及性质、提取分离方法、质量控制手段、药理活性分别进行概述。

1 酚酸类化合物结构及其性质

丹参中所含的药用成分主要以水溶性的酚酸类化合物和脂溶性的醌类化合物为主,除此之外还有少量黄酮等其他种类化合物。自上世纪80年代以来,随着以Sephadex为代表的葡聚糖凝胶填料和以十八烷基硅烷键和硅胶为代表的反相填料的普及应用,我国科研工作者先后从丹参中分得丹参素(Danshensu)^[1]、丹酚酸(Salvianolic Acid)A^[2]、B^[3]、C^[4]、D^[5]、E^[6]、F^[7]、G^[8]、迷迭香酸^[9](Rosmarinic Acid)、紫草酸^[10](Lithospermic Acid)、原紫草酸^[11](Pro-Lithospermic Acid)等多种酚酸类化合物。之后经过各国科研工作者的共同努力,又从丹参同属植物中

得到丹酚酸H^[12]、I^[13]、J^[14]、K^[15]、L1、L2^[16]、鼠尾草香豆素(Sagecoumarin)^[17]等化合物。丹参中所含酚酸类化合物由于富含酚羟基,在提取分离过程中易发生水解反应氧化反应等化学变化。近年来,随着高分辨质谱和制备液相的应用,通过离子碎片的产生规律又陆续推导鉴别出多个酚酸的水解产物^[18]。

相应酚酸类化合物结构如下图1所示。这些酚酸化合物可以通聚合程度分为单体酚酸、二聚体酚酸、三聚体酚酸、四聚体酚酸。如咖啡酸、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛等属于单体酚酸;迷迭香酸、丹酚酸D、丹酚酸F等属于二聚体酚酸;紫草酸、丹酚酸A、丹酚酸C、丹酚酸H等属于三聚体;丹酚酸B和丹酚酸E等属于四聚体。

丹参中酚酸类化合物生成途径主要有2种,一是由若干丹参素和若干咖啡酸发生缩合反应生成缩合产物,二是缩合产物通过氧化、水解、周环等反应生成的转化产物。典型的生成过程如下图2所示。一分子丹参素首先和一分子咖啡酸通过缩合反应生成迷迭香酸,两分子迷迭香酸进一步通过周环反应生成丹酚酸B,丹酚酸B再通过周环反应脱去一分子丹参素生成丹酚酸A,丹酚酸A最终通过氧化反应生成丹酚酸D。

基金项目:国家科技支撑计划课题(编号:2013BAI06B04)——“安全合理用药评价和干预技术研究与应用”

作者简介:王艳梅(1973.01—),女,本科,主管药师,研究方向:药品评价与合理用药,E-mail:meiyan730128@163.com

通信作者:曹俊岭(1972.05—),男,中药学博士,主任药师,研究方向:中药药理毒理,中药安全性有效性评价,医院药学管理,E-mail:caojunling72@163.com

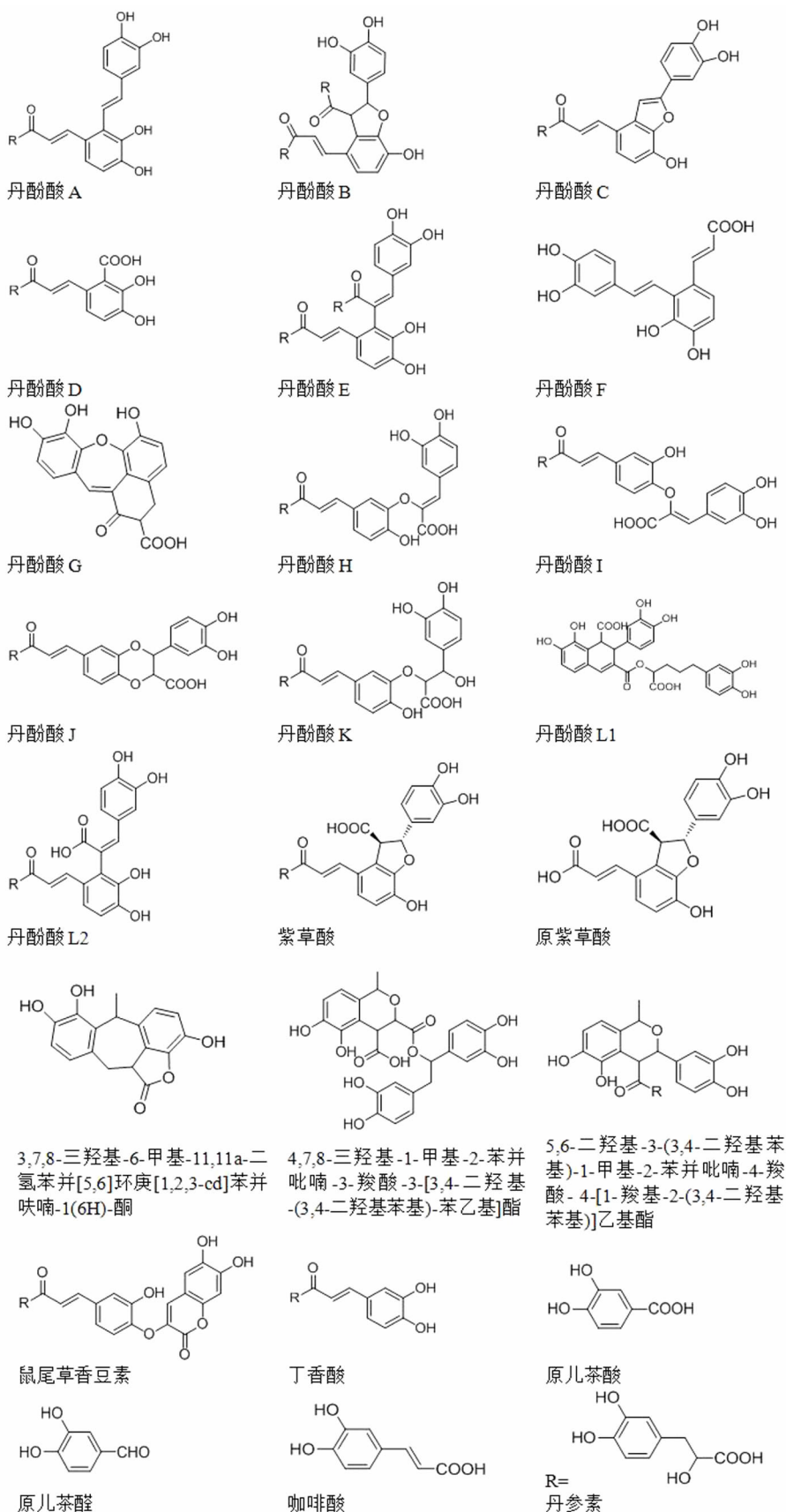


图 1 从丹参或同属植物中获得的酚酸类化合物及转化产物

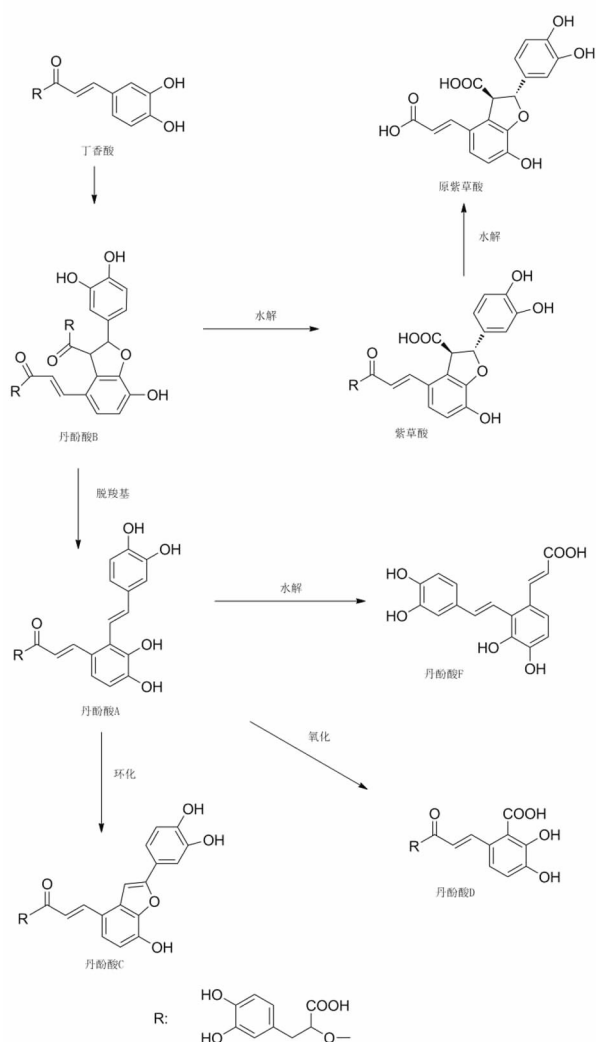


图2 部分酚酸类化合物的转化反应

丹参中酚酸由于转化反应复杂,吸引了大量研究者的深入研究。在转化反应的研究中,由于丹酚酸 B 在丹参中含量高且易大量制备,对其反应的动力学参数和转化产物的认识透彻深入。张军^[19-20]等人考察了温度、溶液 pH、溶液浓度、溶液类型等多种因素对丹酚酸 B 的影响,最终发现丹酚酸 B 和迷迭香酸在高温或碱性条件下不稳定,易发生转化。毛声俊^[21]等人进一步证明了丹酚酸 B 发生水解反应可以生成丹参素。林青^[22]等人又进一步证明丹酚酸 B 在溶液中降解符合一级动力学。Hyoung Jae Lee^[23]等人对丹酚酸 B 的转化反应进行了深入彻底的研究,透彻地理解了丹酚酸 B 的转换过程,并得到了多个转化产物,包括如图 1 中所示的 4,7,8-三羟基-1-甲基-2-苯并吡喃-3-羧酸-3-[3,4-二羟基-(3,4-二羟基苯基)-苯乙基]酯等。

2 酚酸类化合物提取精制方法

传统中药提取多采用水煎或者醇提的方法提取

有效成分,该方法具有简单易行、用料环保的优点,但是在后续浓缩回收溶剂过程中需要消耗大量能源。为克服这一缺点,近年来科研工作者开发了二氧化碳超临界流体提取法。超临界流体法具有消耗能源少的优点,同时又兼具环保和快速的优势。提取出的总酚酸可以用水提醇沉的方法除去多糖、蛋白质、叶绿素等大量无用物质^[23]。

对提取物进行进一步粗分和精制常需要使用柱层析,不同柱填料对酚酸的分离效果和吸附情况不同。丹参中的酚酸成分含有多个酚羟基,在最常用的硅胶填料上有很大的吸附,导致最终回收率不高;而在葡聚糖凝胶和反相填料上吸附较少,在实际应用时回收率高,因此可将上述填料用于精制分离。大孔吸附树脂是由苯乙烯和二苯乙烯发生聚合反应生成的高聚物,具有吸附量大、不需使用有机溶剂等优点,常用来分离中药的有效成分^[24]。近年来随着多种大孔吸附树脂的普及,其开始广泛地应用于丹参粗分精制过程^[25]。除以上提到的柱层析法外,近年来新兴的超滤、纳滤^[26]、高速逆流色谱等方法也可用于酚酸的粗分和精制,最终可以得到总酚酸提取物或者某一单体。

倪力军^[27]等人通过正交试验证明,丹酚酸类成分使用水为溶媒提取率高,丹参酮类成分用乙醇作为溶媒提取率高,这一结论同丹酚酸的溶解度相吻合。苗建武^[28]等人考察了聚酰胺填料对丹参总酚酸的分离效果,通过考察丹参总酚酸的吸附量以及洗脱率,最终确定了使用聚酰胺分离丹参总酚酸的工艺条件。初始上样液中所含丹酚酸的质量浓度为 3.5 g/L,采用梯度洗脱的方法,首先使用 20% 乙醇洗脱杂质,再用 40% 乙醇洗脱丹酚酸。最终测定纯化后固体中丹参总酚酸含量为 98.41%。王凤美^[29]等人通过比较 D101、D301、LSA-20、SIP1905 四种大孔吸附树脂对丹酚酸 B 的分离的效果,发现 D101 树脂从经济性、易得性、便利性等方面均适合用于制备丹酚酸 B。通过正交试验最终确定分离丹酚酸 B 工艺条件为:药材切片筛去泥土,加入 8 倍量水,于 90 ℃ 下提取 2 次,1 h/次;提取结束后过滤,提取液离心后取上清液减压浓缩;浓缩液用乙酸乙酯萃取,萃取液减压蒸干用水溶解;上述溶解液上 D101 大孔吸附树脂柱,静止吸附 2 h,水洗除去未吸附杂质,40% 乙醇洗脱丹酚酸 B;洗脱液减压浓缩除去乙醇冷冻干燥得丹酚酸 B 纯化物。王凤美^[30]等人还尝试采用高速逆流色谱法制备高纯丹酚酸 B,色谱法采用正己烷-乙酸乙酯-水-甲醇(1.5:5:5:1.5)的混

合物作为分离递质,混合物的上相做固定相,下相做流动相。每次将粗提物 80 mg 进样,最终可制备得到 63.4 mg 纯度为 98.6% 的丹酚酸 B。

3 酚酸类化合物的分析方法及质量控制

丹参质量控制的研究经历了相当长的时间。起初质控多采用单一成分控制的策略。如对于酚酸类成分,只关注其中含量较高的原儿茶醛或丹酚酸 B 等某一成分的含量^[31]。该策略简单易操作,但是忽略了其他有效成分,易造成质量控制的不全面性。随着对丹参不断的深入了解,仅控制其中 1 种成分的含量已经远远无法达到质控的要求。近年来,对丹参及其提取物的分析已经向多成分、微量化、指纹图谱几方面飞速发展,为丹参的质量控制奠定了良好的基础。

中药的功效往往是其中多种成分联合作用的结果,因此只关注其中 1 种物质往往是不够的。近年来对丹参的质量控制开始关注其中多个组分含量的综合分析。张英丰^[32]等人建立了丹参提取物中丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸、丹参素及丹参酮 IIA 同时测定的新方法。该方法采用高效液相色谱法,以 Kromasil-C18 为固定相,乙腈-0.1% 甲酸水为流动相梯度洗脱,检测波长 285 nm。待测化合物在进样范围线性关系良好,仪器精密度和稳定性等各项指标均符合要求,可以用于含量测定。虞科^[33]等人采用高效液相色谱法为对照建立了近红外光谱测定丹参滴丸中 3 种酚酸类含量的方法。使用最小二乘法建立 3 种成分的 NIR 光谱分析值与 HPLC 分析值之间的多元校正模型,校正模型相关系数均大于 0.99,表明 NIR 光谱法和 HPLC 法测定值无统计学意义。证明 NIR 法操作简便、快速无损,可用于中药及其复方制剂有效成分的快速检测。

在研究中药的化学成分时需对其含有的每种物质进行定性研究,常采用 NMR 方法进行鉴定。但有些成分往往含量较低,无法采用富集后进行 NMR 检测的方法进行研究。在这种情况下,采用质谱联用的技术往往可以收到事半功倍的效果。Liu Mei^[34]等采用 HPLC-DAD-MS 联用技术检测了 13 个丹参样品和 21 批次制剂中的共有峰,并根据质谱鉴定出了其中 20 多个成分。

虽然丹参中多种成分结构已经明确,但这只占其所有化学成分的小部分。针对这种情况,“指纹图谱技术”适合用来对丹参进行质量控制。指纹图谱强调复杂体系的模糊性和整体性,主要考察体系的整体相似性而不是某几个组分的相似性。唐旭

利^[35]等人采用高效液相色谱法测定了 18 批丹参药材的图谱,同时进行了聚类分析。最终根据聚类分析结果,建立了丹参水溶性成分指纹图谱。图谱共显示了 12 个共有峰,从共有峰中指认了丹参素钠、丹酚酸 B 等特征峰。丰加涛^[36]等不仅建立了指纹图谱,并且对指纹图谱进行了方法学研究,最终可以利用指纹图谱测定其中原儿茶醛、迷迭香酸的含量,从而提高了丹参的质量标准,使丹参的质控向着完善化、全面化发展。

4 酚酸类化合物的药理活性

丹酚酸类化合物和丹参酮类化合物是丹参中主要的药理活性成分。丹酚酸类化合物的结构中富含酚羟基。研究表明,该类化合物具有显著的抗氧化作用、对脑缺血损伤和内皮细胞的保护作用、抑制糖性白内障等活性。诸多体外实验证明,丹酚酸类化合物具有清除氧自由基、抑制脂质体过氧化等多种抗氧化作用。Wu 等人认为丹酚酸 A 对神经细胞及肝脏细胞过氧化应激损伤等的保护作用机制主要来源于其抗氧化作用^[37]。张亚杰等人考察了丹参多酚酸盐对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响,发现用丹参多酚酸盐预给药的试验组大鼠心肌梗死面积明显低于对照组,证明丹参多酚酸盐对损伤有保护作用^[38]。除此之外,丹参多酚酸盐还可以改善冠脉慢血流现象^[39],改善慢性心力衰竭患者心功能^[40],有着丰富的治疗心血管疾病的作用。

在治疗脑缺血方面,丹酚酸类化合物也有丰富的药理活性。杜冠华^[41]用脑缺血再灌注损伤造成小鼠学习记忆功能障碍模型,通过跳台实验和避暗实验研究了丹酚酸 A 对记忆获得功能障碍的作用,结果表明丹酚酸 A 可以明显改善小鼠学习记忆功能障碍状态。任德成^[42]等人也发现总丹酚酸可以明显改善缺血再灌注引起的学习记忆障碍,其机制与总丹酚酸抗氧化作用有关。在保护血管内皮细胞方面,陈敏等^[43]观察丹参多酚酸盐对术后危重症患者血管内皮细胞功能的作用,发现丹参多酚酸盐可以改善一氧化氮、白细胞介素、内皮素水平,降低患者 APACHE III 评分,降低 MODs 发生率。表明丹参多酚酸盐对血管内皮细胞有保护作用。

5 结语

丹参中含有酚酸类、丹参酮类等多种化学成分,这些化学成分有丰富的药理作用。虽然研究者们对丹参的化学成分和药理作用研究逐年深入,但是丹参有效成分的作用机理研究和应用研究并不充分完备。因此对于丹参有效成分的药理和临床作用,还

需要大量研究工作,从而可以充分发掘丹参这一中药的潜力,造福人类。

参考文献

- [1] 陈政雄,顾文华,黄慧珠. 丹参中水溶性酚酸成分的研究[J]. 药学通报,1981,16(9):24-25.
- [2] Zhang HJ, Li LN. Salvianolic Acid I: A New Depside from *Salvia cavaleriei* [J]. *Planta Med*, 1994, 60(1): 70-72.
- [3] Li LN, Zhang HJ. Salvianolic acid J, a depside from *Salvia flava* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(3): 907-908.
- [4] Lu Y, Foo L. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(1): 91-94.
- [5] Dapkevicius A, van Beek TA, Lelyveld GP, et al. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(6): 892-896.
- [6] Yinrong Lu and L. Yeap Foo. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis* [J]. *Tetrahedron Letters*, 2001, 42: 8223-8225.
- [7] Shuiping Zhou, Wei Li, Yuanpeng Jin. Compound of Salvianolic acid L, preparation method and use thereof [P]. US 20120041062.
- [8] Lian-Niang L, Rui T, Wei-Ming C. Salvianolic Acid A, a New Depside from Roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(3): 227-228.
- [9] Zhang HJ, Li LN. Salvianolic Acid H, A New Depside from *Salvia cavaleriei* Var. *Simplicifolia* [J]. *Chinese Chemical Letters*, 1993, 4(6): 501-504.
- [10] 沈建芳,王强,汪红. 南丹参化学成分研究[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(2): 55-58.
- [11] Ai CB, Li LN. Stereostructure of Salvianolic Acid B and Isolation of Salvianolic Acid C from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Natural Products*, 1988, 51(1): 145-149.
- [12] 姚俊严. 丹参中有效成分原儿茶醛的分离鉴定[J]. 南京药学院学报, 1979, 11(1): 74.
- [13] Ai Chun Bo, Li Lian-niang. Salvianolic Acid D and E, two New Depsides from Roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Medica*, 1992, 58: 198.
- [14] Ai Chun-bo, Li Lian-niang. Synthesis of tetramethyl savianolic acid F and trimethyl przewalskinic acid A [J]. *Chinese Chemical Letters*, 1996, 7(5): 427-430.
- [15] Liu AH, Guo H, Ye M, et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1-2): 170-182.
- [16] 周长新,罗厚蔚,丹羽正武. 丹参水溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(6): 411-416.
- [17] 吴世蓉. 不同产地丹参其主要化学成分的分离和测定[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(3): 24.
- [18] Lee HJ, Cho JY, Moon JH. Chemical conversions of salvianolic acid B by decoction in aqueous solution [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(7): 1196-1204.
- [19] 张军,王风云,詹丽玲,等. 丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 789-790.
- [20] 张慧杰,任晓亮,崔明磊. 注射用丹参多酚酸中主要成分的降解动力学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 1-5.
- [21] 毛声俊,侯世祥,唐昌炯,等. 丹参素在加温加速条件下的含量变化规律研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 220-222.
- [22] 林青,黄琳,肖晓丽,等. 丹参水提液中丹酚酸 B 湿热降解动力学研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(8): 29-31.
- [23] 顾娟,罗海燕,安莲英,等. 丹参酚酸水提取工艺的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 781-783.
- [24] 刘峰群,肖小河,史成和,等. 大孔吸附树脂在药物分离中的应用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(3): 166-167.
- [25] 陈世敏,胡盛,李效宽,等. 丹酚酸 B 提取工艺的研究[J]. 中药材, 2007, 30(4): 477-479.
- [26] 周锦珂,黄裕,葛发欢,等. 纳滤技术在丹酚酸 B 提取液浓缩的应用研究[J]. 今日药学, 2009, 19(9): 26-28, 17.
- [27] 倪力军,史晓浩,高秀蛟,等. 提取时间、溶剂对丹参提取物质量的影响研究[J]. 中成药, 2003, 25(10): 780-782.
- [28] 苗建武,陈绍民,王超,等. 聚酰胺树脂分离纯化丹参总酚酸的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 28-30.
- [29] 王凤美,陈军辉,李磊. 高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 476-478.
- [30] 王凤美,陈军辉,李磊,等. 高速逆流色谱法分离制备丹酚酸 B [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 100-104.
- [31] 张启伟,张颖,李计萍,等. 高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 848-849.
- [32] 张英丰,朱黎霞,梁东辉. HPLC 同时检测丹参提取物中 5 种水溶性和脂溶性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 76-79.
- [33] 虞科,胡楚楚,程翼宇. 近红外光谱法测定复方丹参滴丸中的 3 种有效成分[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(3): 226-229.
- [34] Liu M, Li YG, Zhang F, et al. Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(14): 2256-2267.
- [35] 唐旭利,刘静,李国强,等. 丹参药材水溶性成分 HPLC 化学指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 313-317.
- [36] 丰加涛,金郁,王金成,等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制[J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [37] Wu ZM, Wen T, Tan YF, et al. Effects of salvianolic acid on oxidative stress and liver injury induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 100(2): 115-120.
- [38] 张亚杰,王旭. 丹参多酚酸盐对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5659-5661.
- [39] 季俭,卢英民,姚能才,等. 丹参多酚酸盐对冠状动脉慢血流现象的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(10): 751-752.
- [40] 邱雅慧,薛凌,高夏青. 丹参多酚酸盐对慢性心力衰竭患者心功能及炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 321-323.
- [41] 杜冠华,张均田. 丹酚酸 A 对小鼠脑缺血再灌注致学习记忆功能障碍的改善作用及作用机制[J]. 药学报, 1995, 30(3): 184-190.
- [42] 任德成,杜冠华,张均田. 总丹酚酸对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 219-221.
- [43] 陈敏. 丹参多酚酸盐对术后危重症患者血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(1): 60-61.