

文章编号:1001-6880(2014)6-1132-05

# 丹参生品及炮制品的抗氧化活性研究

王培卿,孔祥密,康文艺\*

河南大学中药研究所,开封 475004

**摘要:**采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除[2,2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐](ABTS)自由基及铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)测定法,以二丁基羟基甲苯(BHT)为阳性对照,对丹参生品及炮制品进行抗氧化活性评价。实验结果表明,丹参生品及其炮制品均有一定的抗氧化活性。其中,丹参炭乙酸乙酯部位清除DPPH自由基的能力最强,IC<sub>50</sub>值为13.9 μg/mL;炒丹参乙酸乙酯部位、酒丹参乙酸乙酯部位和丹参炭正丁醇部位清除ABTS自由基能力最强,IC<sub>50</sub>值均为2.1 μg/mL;米丹参乙酸乙酯部位的FRAP值最高为1517.81 μmol/g。不同炮制方法对丹参抗氧化活性的能力有所不同,其中,丹参炭的整体抗氧化活性相对较好。

**关键词:**丹参;抗氧化活性;DPPH;ABTS;FRAP

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

## Antioxidant Activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and Different Processed Products

WANG Pei-qing, KONG Xiang-mi, KANG Wen-yi\*

Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China

**Abstract:** 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, [2, '-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid] diamonium salt (ABTS) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluated the extracts of *S. miltiorrhiza* and different processed products with BHT as positive control. The results showed that the extracts from *S. miltiorrhiza* and different processed products had antioxidant activity. The ethyl acetate extract of *S. miltiorrhiza* carbon showed the strongest radical scavenging power on DPPH and the IC<sub>50</sub> value was 13.9 μg/mL; The ethyl acetate extracts of fried *S. miltiorrhiza* and wined *S. miltiorrhiza* and the n-BuOH extract of *S. miltiorrhiza* carbon exhibited the highest radical scavenging power on ABTS and the IC<sub>50</sub> value was 2.1 μg/mL, The ethyl acetate extract of rice fried *S. miltiorrhiza* had the biggest value of FRAP and IC<sub>50</sub> was 1517.81 μmol/g. And the different processing methods varied on the different antioxidant activity power of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, however, the antioxidant activity of *Salvia miltiorrhiza* carbon was better.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的干燥根和根茎,味苦,性微寒。归心、肝经。主产于四川、安徽、江苏、山西和河北等地<sup>[1]</sup>,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈的功效<sup>[2]</sup>。药理学研究发现丹参具有扩张冠状动脉,防止心肌缺血,改善微循环等作用<sup>[3]</sup>。化学研究表明,丹参脂溶性成分为丹参酮类,主要有丹参酮I、丹参酮IIA、丹参酮IIB、羟基丹参酮等<sup>[4]</sup>;丹参水溶性成分主要为酚酸类,包括丹参素、原儿茶醛和丹参甲、乙、丙<sup>[5]</sup>等,临幊上用于治疗心血管疾病、扩张

血管、改善微循环防止血栓形成,具有抗氧化活性等<sup>[6]</sup>。王研等<sup>[7]</sup>利用清除DPPH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OH自由基和还原Fe<sup>3+</sup>的方法对丹参提取物进行了体外抗氧化活性研究,发现丹参提取物具有较强的抗氧化活性;吕露阳,张浩<sup>[8]</sup>对丹参有效成分的抗氧化活性进行了比较,发现丹参水溶性成分具有较强的活性,未见文献对丹参不同炮制品体外抗氧化的研究。

本课题组采用DPPH、ABTS和FRAP三种方法对丹参炮制品的抗氧化活性进行了综合考察,以评价不同炮制方法对丹参抗氧化作用的影响。

## 1 仪器、材料和试剂

### 1.1 主要仪器

UV -2000型紫外可见分光光度计(上海尤尼

收稿日期:2013-02-21 接受日期:2013-06-25

基金项目:河南省科技厅重点项目(132102310261)

\*通讯作者 Tel:86-378-3880680;E-mail:kangweny@ hotmail.com

可仪器有限公司); Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Electron 公司); 旋转蒸发仪(日本东京理化公司); 电子天平(美国 Mettler-Toledo 仪器有限公司)。

## 1.2 材料

丹参于 2010 年 9 月购于开封乐仁堂总店, 经河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定为唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge.) 的干燥根及根茎, 标本存于河南大学中药研究所。

## 1.3 试剂

DPPH(日本东京化成工业株式会社);  $\text{Fe}^{3+}$ -三吡啶三唑嗪(tripyranyl-triazine, TPTZ; 比利时 Acros organics 公司); [2,2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS, 美国 Fluka 公司); 二丁基羟基甲苯(BHT, 比利时 Acros organics 公司); 6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸(Trolox, 美国 Aldrich 公司), 其他试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 丹参炮制及浸膏提取

丹参生品: 取丹参饮片, 除去杂质及残茎, 清水洗净, 晒干。

炒丹参: 取净丹参片 500 g, 置于锅内用文火炒至紫褐色, 有焦斑, 取出放凉。

醋丹参: 取净丹参片 500 g, 加入 50 g 米酒, 拌匀微润, 置于锅内用文火炒干, 取出放凉。

酒丹参: 取净丹参片 500 g, 加入 50 g 黄酒, 拌匀闷透, 置于锅内用文火炒干, 取出放凉。

丹参炭: 取净丹参片 500 g, 置于锅内用武火炒至焦黑色, 喷少许水, 灭尽火星, 取出放凉。

米丹参: 用水将锅打湿, 将米 100 g 置于铁锅内, 加热冒烟时, 放入净丹参片 500 g, 不断翻动, 丹参片转变为深紫色时, 出锅, 筛去米粒, 放凉。

各取相同重量的丹参生品、炒丹参、丹参炭、米丹参、酒丹参、醋丹参, 用甲醇室温冷浸提取三次, 回收溶剂, 得甲醇(ME) 提取物。甲醇总浸膏分散于 80% 甲醇水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 回收溶液, 得到丹参不同炮制品的各石油醚(PE) 部位、乙酸乙酯(EA) 部位和正丁醇(BU) 部位, 为活性测定做准备。

## 2.2 抗氧化活性筛选

### 2.2.1 DPPH 法

按照文献<sup>[9]</sup>, 将样品配制成一系列质量浓度, 取 10 μL 样品溶液加入到 96 孔板中, 再加入 175 μL DPPH 甲醇溶液, 混合 30 min 后测定 515 nm 处吸光度。每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 计算出清除率及半数清除率  $IC_{50}$  值。

### 2.2.2 ABTS 法

按照文献<sup>[10]</sup>, 配制 ABTS 自由基工作液, 将样品用甲醇配制成一系列浓度, 取 10 μL 样品加入 96 孔板, 将 200 μL ABTS 自由基工作液与样品混匀用酶标仪测定其吸光度。每份样品平行 3 次, 取平均值, 并计算出清除率及半数清除率  $IC_{50}$  值。

### 2.2.3 FRAP 法

按照文献<sup>[11]</sup>, 将样品用甲醇配制成一系列质量浓度, 取 10 μL 样品溶液加入到 96 孔板中, 加入 200 μL 新鲜配制的 TPTZ 工作液, 混匀, 37 °C 反应 30 min 后, 用酶标仪在 595 nm 测定吸光度, 每份样品平行操作 3 次。取平均值并计算出对  $\text{Fe}^{3+}$  的还原能力, 结果以 Trolox 当量(即每克样品还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力相当于 Trolox 的还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力的微摩尔数) 表示。

## 3 结果与讨论

### 3.1 对 DPPH 自由基的清除能力

结果见表 1。

表 1 丹参生品及不同炮制品各部位的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of different extracts of crude and different processed products of *Salvia miltiorrhiza*

样品 Sample	提取部位 Extract	DPPH $IC_{50}$ (μg/mL)	ABTS $IC_{50}$ (μg/mL)	FRAP TEAC (μmol/g)
炒丹参 fried <i>Salvia miltiorrhiza</i>	ME 总浸膏	73.7	10.1	774.05
	PE 部位	—	21.3	46.38
	EA 部位	16.4	2.1	1446.55
	BU 部位	26.8	4.1	1142.92

醋丹参 vinegar fried <i>Salvia miltiorrhiza</i>	ME 总浸膏	81.1	10.4	705.28
	PE 部位	-	21.3	49.11
	EA 部位	17.8	2.8	1462.69
	BU 部位	23.5	3.8	1457.73
酒丹参 wine fired <i>Salvia miltiorrhiza</i>	ME 总浸膏	92.5	9.4	669.4
	PE 部位	-	16	182.18
	EA 部位	17.8	2.1	1486.52
	BU 部位	29.7	5.1	1512.34
丹参炭 <i>Salvia miltiorrhiza</i> carbon	ME 总浸膏	50.1	7.7	802.97
	PE 部位	-	31.9	125.57
	EA 部位	13.9	4.1	1490.5
	BU 部位	17.2	2.1	1501.92
米丹参 rice fried <i>Salvia miltiorrhiza</i>	ME 总浸膏	99.6	9.1	584.25
	PE 部位	-	22	145.56
	EA 部位	14.4	2.4	1517.81
	BU 部位	31.8	5.8	1482.8
丹参生品 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	ME 总浸膏	-	16	477.37
	PE 部位	-	29	45.63
	EA 部位	41.9	7.4	1220.38
	BU 部位	30.3	2.8	1486.28
阳性对照 positive control	BHT	23	2.3	1532.7

注:BHT 为阳性对照;“-”未测定。

Note: BHT was used as positive control; “-” : undeterminate.

表 1 显示,丹参生品及炮制品 PE 部位几乎无清除 DPPH 自由基的能力;丹参生品 ME 总浸膏无清除 DPPH 自由基的能力,炮制品(炒丹参、醋丹参、酒丹参、丹参炭和米丹参)ME 总浸膏清除 DPPH 能力( $IC_{50}$  分别为 73.7、81.1、92.5、50.1 和 99.6  $\mu\text{g/mL}$ )增强;与生品丹参 EA 部位比较,其他五种炮制品(炒丹参、醋丹参、酒丹参、丹参炭和米丹参)EA 部位清除 DPPH 能力( $IC_{50}$  分别为 16.4、17.8、17.8、13.9 和 14.4  $\mu\text{g/mL}$ )均强于生品丹参 EA 部位( $C_{50}$  为 41.9  $\mu\text{g/mL}$ );与生品 BU 部位比较,除米丹参 BU 部位  $IC_{50}$  为 31.8  $\mu\text{g/mL}$  外,其他炮制品(炒丹参、醋丹参、酒丹参和丹参炭)清除 DPPH 自由基的能力( $IC_{50}$  分别为 26.8、23.5、29.7 和 17.2  $\mu\text{g/mL}$ )均比丹参生品 BU 部位( $IC_{50}$  为 30.3  $\mu\text{g/mL}$ )强。

### 3.2 对 ABTS 自由基的清除作用

丹参生品及其 5 种炮制品提取部位质量浓度对 ABTS 自由基清除率的影响见图 1~图 6。结果显示,丹参生品及炮制品各提取物对 ABTS 自由基的清除率随着质量浓度的增加而增大,当达到一定浓度后,再继续增加浓度,抑制率变化不大,即抗氧化

活性接近饱和。

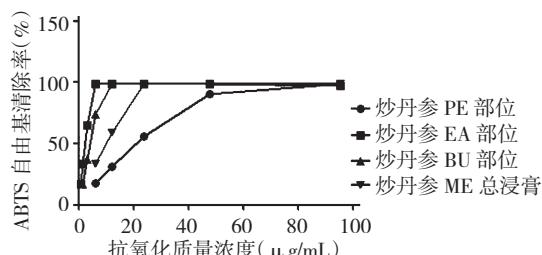


图 1 炒丹参各部位抗氧化质量浓度对 ABTS 自由基的影响

Fig. 1 Effect of mass concentration of antioxidant of fried *Salvia miltiorrhiza* on ABTS free radical

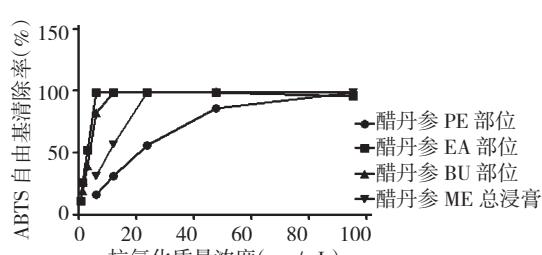


图 2 醋丹参各部位抗氧化质量浓度对 ABTS 自由基的影响

Fig. 2 Effect of mass concentration of vinegar fried *Salvia miltiorrhiza* on ABTS free radical

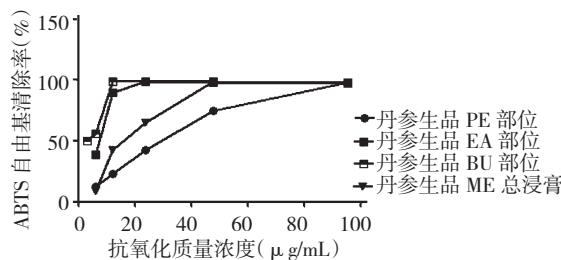


图3 丹参各部位抗氧化质量浓度对ABTS自由基的影响

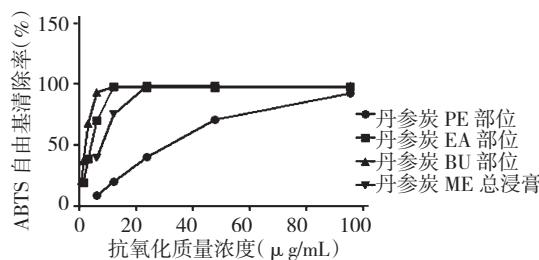
Fig. 3 Effect of mass concentration of antioxidant of *Salvia miltiorrhiza* on ABTS free radical

图4 丹参炭各部位抗氧化质量浓度对ABTS自由基的影响

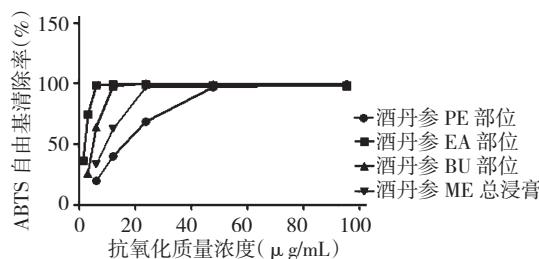
Fig. 4 Effect of mass concentration of antioxidant of *Salvia miltiorrhiza* carbon on ABTS free radical

图5 酒丹参各部位抗氧化质量浓度对ABTS自由基的影响

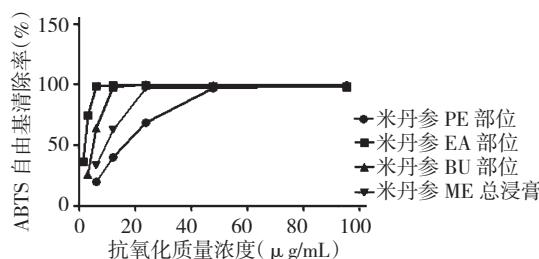
Fig. 5 Effect of mass concentration of antioxidant of wine fired *Salvia miltiorrhiza* on ABTS free radical

图6 米丹参各部位抗氧化质量浓度对ABTS自由基的影响

Fig. 6 Effect of mass concentration of antioxidant of rice fried *Salvia miltiorrhiza* on ABTS free radical

由表1可以看出,除米丹参、酒丹参、醋丹参和炒丹参外,丹参炭BU部位清除ABTS自由基的能力

( $IC_{50}$ 为2.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )强于丹参生品BU部位( $IC_{50}$ 为2.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );除丹参炭PE部位( $IC_{50}$ 为31.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )外,其他炮制品(炒丹参、醋丹参、酒丹参和米丹参)清除ABTS自由基能力( $IC_{50}$ 分别为21.3、21.3、16和22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均强于丹参生品PE部位( $IC_{50}$ 为29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );丹参炮制品ME总浸膏及EA部位清除ABTS的能力均强于丹参生品ME总浸膏及EA部位。

### 3.3 对 $\text{Fe}^{3+}$ 的还原能力

表1显示,丹参生品及炮制品各提取部位还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力均弱于阳性对照BHT,除米丹参、醋丹参和炒丹参外,酒丹参和丹参炭BU部位还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力(TEAC分别为1512.34和1501.92  $\mu\text{mol}/\text{g}$ )强于丹参生品BU部位(TEAC=1486.28  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ),丹参炮制品ME总浸膏、PE和EA各部位还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力均强于丹参生品。

## 4 结论

采用DPPH、ABTS和FRAP三种方法评价丹参及其炮制品的抗氧化性,发现丹参经炮制后,抗氧化活性发生了一定的变化。部分丹参经炮制后抗氧化活性显著升高,可能在炮制过程中,化合物的成分产生了变化造成的,需要进一步研究证实。

## 参考文献

- 1 The State Administration of Traditional Chinese Medicine of the Chinese Herbal Medicine Editorial Board(国家中医药管理局《中华本草》编委会). *Chinese Materia Medica(中华本草)*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. 6193.
- 2 China Pharmacopoeia Committee(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of People's Republic of China(中华人民共和国药典)*. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010:71.
- 3 Zhao N(赵娜), Guo ZX(郭治昕), Zhao X(赵雪), et al. Pharmaceutical action and chemical constitution of *Salvia Miltiorrhiza*. *World Phytomed* (国外医药:植物药分册), 2007, 22:155-160.
- 4 Lu LY, Zhang H, Qian Y, et al. Isolation of salvianolic acid A, a minor phenolic carboxylic acid of *Salvia Miltiorrhiza*. *Nat Prod Commun*, 2010, 5:805-808.
- 5 Ling HY(凌海燕), Lu XZ(鲁学照), Zhao YL(赵永丽), et al. Research general idea on the water-soluble components of *Salvia Miltiorrhiza*. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 1999, 11:75-81.