

丹参水溶性化学成分的研究

周长新 罗厚蔚 丹羽正武¹

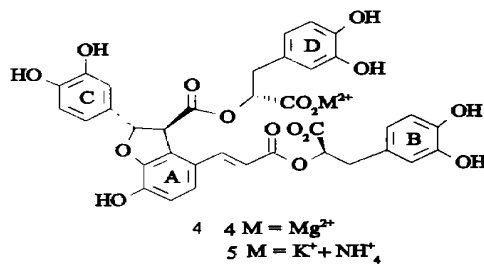
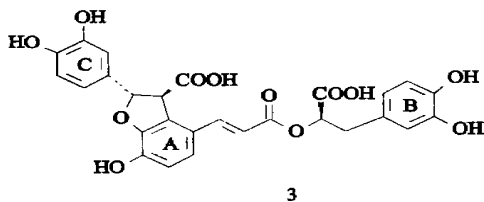
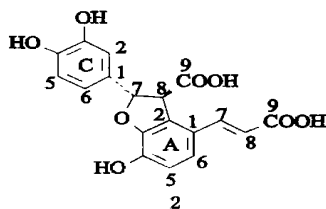
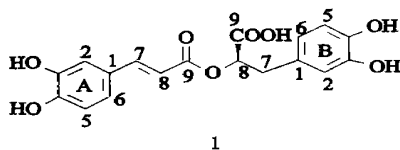
(中国药科大学天然药化教研室, 南京 210009; 名城大学药学部, 天白区 468, 名古屋, 日本)

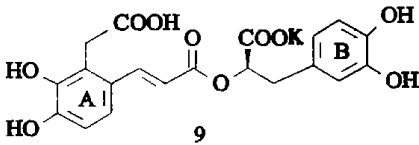
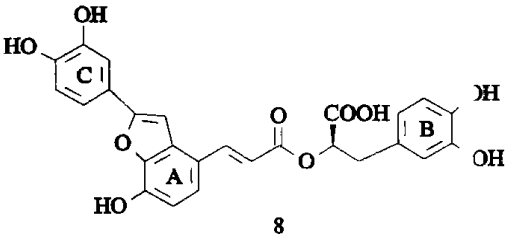
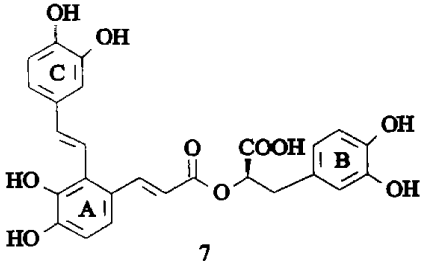
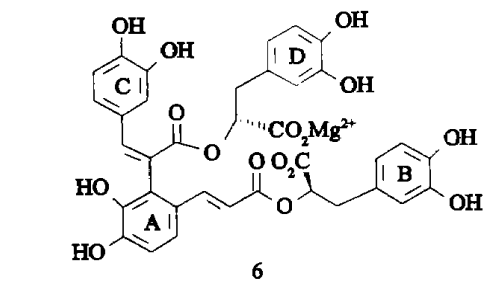
摘要 采用国产大孔树脂, Sephadex LH-20对丹参注射剂及丹参饮片的温水浸提液的化学成分进行了比较研究, 从中分离得到丹参素及九个寡聚咖啡酸类化合物。运用高分辨波谱对其碳、氢信号进行了全归属, 并探讨了后生产物的形成机制。

关键词 丹参; 丹参注射剂; 丹参水提液; 寡聚咖啡酸; 丹酚酸戊镁; 紫草酸; 原紫草酸; 高分辨波谱

丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 在临床上广泛用于治疗心血管系统疾病, 其中的活性成分为水溶性成分, 具有抗脂质过氧化、清除自由基、治疗慢性肾功能不全等多种重要的生物活性^[1-3]。以往国内对丹参水溶性成分的研究均采用硅胶柱的正相层析^[4-7], 不仅成本高、周期长, 而且得率低。本文首次采用国产大孔树脂, 结合 Sephadex LH-20, 以水-醇系统为洗脱剂, 对丹参水溶性成分进行了系统分离, 较好地克服了以上缺点。从丹参根的温水浸液中共得到迷迭香酸 (rosmarinic acid, 1)、原紫草酸 (pro-lithospermic acid, 2)、紫草酸 (lithospermic acid, 3)、紫草酸乙镁盐 (magnesium lithospermate B, 4)、紫草酸乙氨钾盐 (ammonium-potassium

lithospermate B, 5) 及丹酚酸戊镁盐 (magnesium salvianolate E, 6) 等 6 个寡聚咖啡酸类化合物, 从丹参注射剂中除得到化合物 1 4 5 6 外, 还分离得到丹酚酸甲 (salvianolic acid A, 7)、丹酚酸丙 (salvianolic acid C, 8) 和丹酚酸丁钾盐 (potassium salvianolate D, 9) 这是 3 个具有不完整的咖啡酸单元聚合物。如具有 C₆-C₂ 结构单元 (见图 1)。其中化合物 2 3 则为首次从本属植物中分离得到。本文在结构鉴定手段上, 改变了以往的化学降解结合¹H-NMR 的方法^[5-7], 代之以高分辨波谱, 特别是二维谱, 对其碳、氢信号进行了全归属 (表 1, 2) 在此基础上, 我们还建立了快速简便的色谱方法, 将另文报道。





Tab 1. ¹H NMR [(CD₃)₂CO-D₂O (10° 1)] data of compounds 1-4 and 6-9

Unit	H	1	2	3	4	6	7	8	9
A	2	7.04br. s							
	5	6.75d J= 8.3	6.66d J= 8.1	6.83d J= 8.3	6.78d J= 8.4	6.91d J= 8.8	6.76d J= 8.3	6.77d J= 8.3	6.65d J= 8.4
	6	6.87d J= 8.3	6.74d J= 8.1	7.10d J= 8.3	7.10d J= 8.4	7.36d J= 8.8	7.03d J= 8.3	7.37d J= 8.3	7.00d J= 8.4
	7	7.41d J= 16.1	7.70d J= 16.0	7.52d J= 15.6	7.46d J= 15.8	7.23d J= 15.8	7.94d J= 15.9	7.85d J= 16.1	7.90d J= 15.8
	8	6.20d J= 16.1	6.23d J= 16.0	6.19d J= 15.6	6.24d J= 15.8	6.25d J= 15.8	6.23d J= 15.9	6.45d J= 16.1	6.17d J= 15.8
	10								3.59s 3.60s
	2	6.75br. s		6.67br. s	6.74d J= 1.8	6.72d J= 1.8	6.50br. s	6.82d J= 2.0	6.87d J= 1.8
	5	6.62d J= 8.3		6.59d J= 8.1	6.58d J= 8.1	6.59d J= 7.7	6.58d J= 7.8	6.69d J= 8.1	6.62d J= 8.4
	6	6.55br. d J= 8.3		6.37br. d J= 8.1	6.46dd J= 8.1, 1.8	6.53dd J= 7.7, 1.8	6.76br. d J= 7.8	6.62dd J= 8.1, 2.0	6.56dd J= 8.4, 1.8
	B	3.02br. d J= 13.7		3.01br. d J= 14.2	3.03br. d J= 12.5	2.77dd J= 13.7, 10.7	3.04br. s	3.07dd J= 14.2, 3.9	3.02dd J= 14.2, 2.9
C	β	2.83dd J= 13.7, 7.8		2.84dd J= 14.2, 7.1	2.84dd J= 12.5, 8.1	2.96dd J= 13.7, 2.2	2.81br. s	2.96dd J= 14.2, 8.8	2.85dd J= 14.3, 10.3
	8	4.98br. d J= 7.8		5.06br. d J= 7.1	4.88br. d J= 8.1	4.83dd J= 10.7, 2.2	5.06br. s	5.16dd J= 8.8, 3.9	4.88dd J= 10.3, 2.9
	2		6.68d J= 1.8	6.80br. s J= 1.8	6.82br. s	6.50d J= 1.8	7.07br. s	7.45d J= 2.2	
	5		7.14d J= 8.4	6.73d J= 8.1	6.72d J= 8.1	6.48d J= 8.4	6.84d J= 7.8	6.88d J= 8.3	
	6		6.82dd J= 8.4, 1.8	6.59br. d J= 8.1	6.58br. d J= 8.1	6.38dd J= 8.4, 1.8	6.76br. d J= 7.8	7.35dd J= 8.3, 2.2	
	7		5.85d J= 4.0	5.71d J= 3.9	5.53d J= 4.0	7.73s	7.09d J= 16.0		
	8		4.31d	4.36d	4.43d		6.67d	7.36s	

(续表 1)

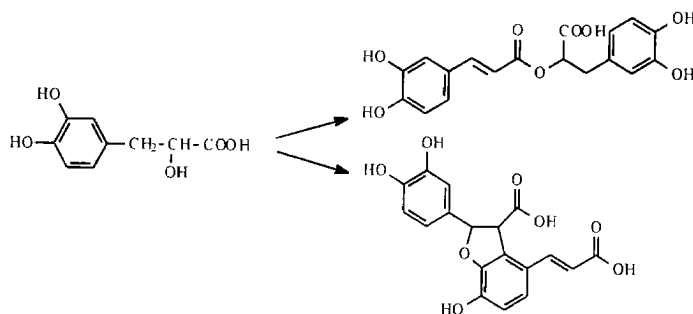
Unit	H	1	2	3	4	6	7	8	9
D			J= 4. 0	J= 3. 9	J= 4. 0		J= 16. 0		
	2				6. 79br. s	6. 44d			
						J= 1. 8			
	5				6. 63d	6. 51d			
					J= 8. 1	J= 7. 7			
	6				6. 56br. d	6. 01dd			
					J= 8. 1	J= 7. 7, 1. 8			
	7 α				2. 78dd	2. 43dd			
					J= 12. 5, 10. 6	J= 13. 5, 11. 3			
	7 β				3. 10br. d	2. 88dd			
					J= 12. 5	J= 13. 5, 1. 9			
	8				4. 94br. d	4. 81dd			
					J= 10. 6	J= 11. 3, 1. 9			

Tab 2. ¹³ CNMR((CD₃)₂CO: D₂O 10: 1) data of compounds 1-4 and 6-9

Unit	C	1	2	3	4	6	7	8	9
A	1	127. 5(s)	124. 3(s)	124. 9(s)	124. 9(s)	124. 9(s)	126. 2(s)	123. 2(s)	126. 3(s)
	2	115. 4(d)	127. 4(s)	126. 3(s)	126. 8(s)	129. 2(s)	131. 3(s)	132. 8(s)	126. 6(s)
	3	146. 4(s)	146. 1(s)	146. 4(s)	146. 4(s)	142. 5(s)	146. 7(s)	146. 1(s)	145. 7(s)
	4	149. 1(s)	148. 4(s)	149. 0(s)	148. 7(s)	150. 2(s)	147. 7(s)	148. 0(s)	149. 4(s)
	5	116. 6(d)	118. 0(d)	118. 4(d)	118. 4(d)	115. 9(d)	116. 1(d)	112. 1(d)	114. 9(d)
	6	123. 0(d)	121. 2(d)	121. 8(d)	121. 5(d)	120. 7(d)	122. 0(d)	118. 8(d)	120. 3(d)
	7	146. 6(d)	142. 8(d)	142. 8(d)	143. 5(d)	143. 1(d)	145. 6(d)	144. 5(d)	144. 4(d)
	8	115. 5(d)	117. 8(d)	118. 0(d)	117. 6(d)	115. 8(d)	116. 6(d)	116. 8(d)	118. 0(d)
	9	168. 4(s)	169. 4(s)		169. 5(s)	167. 9(s)	168. 6(s)	167. 8(s)	168. 8(s)
	10								38. 4(t)
	11								178. 6(s)
B	1	130. 4(s)		129. 7(s)	130. 8(s)	130. 6(s)	131. 2(s)	129. 8(s)	131. 2(s)
	2	117. 6(d)		117. 4(d)	117. 0(d)	116. 9(d)	117. 5(d)	117. 7(d)	117. 7(d)
	3	145. 5(s)		146. 3(s)	146. 3(s)	145. 0(s)	144. 6(s)	145. 2(s)	145. 3(s)
	4	144. 5(s)		145. 9(s)	145. 8(s)	143. 6(s)	144. 3(s)	144. 1(s)	144. 5(s)
	5	116. 2(d)		116. 5(d)	116. 5(d)	115. 7(d)	115. 0(d)	116. 6(d)	116. 3(d)
	6	121. 7(d)		122. 1(d)	121. 9(d)	121. 2(d)	120. 7(d)	121. 6(d)	121. 6(d)
	7	38. 1(t)		37. 7(t)	38. 1(t)	37. 4(t)	38. 5(t)	38. 0(t)	37. 6(t)
	8	78. 4(d)			78. 6(d)	76. 9(d)		74. 7(d)	77. 9(d)
	9				177. 5(s)	176. 4(s)			176. 6(s)
C	1		133. 5(s)	133. 7(s)	133. 8(s)	126. 9(s)	127. 5(s)	119. 6(s)	
	2		113. 6(d)	113. 7(d)	113. 6(d)	118. 2(d)	120. 2(d)	115. 7(d)	
	3		144. 7(s)	144. 9(s)	144. 8(s)	144. 7(s)	145. 8(s)	145. 9(s)	
	4		144. 7(s)	144. 8(s)	144. 7(s)	147. 5(s)	146. 7(s)	146. 7(s)	
	5		116. 2(d)	116. 4(d)	116. 3(d)	116. 4(d)	114. 3(d)	113. 4(d)	
	6		117. 8(d)	118. 0(d)	117. 6(d)	124. 2(d)	120. 2(d)	126. 6(d)	
	7		88. 0(d)	87. 7(d)	87. 5(d)	143. 7(d)	137. 4(d)	159. 2(d)	
	8		57. 2(d)	57. 5(d)	57. 5(d)	123. 0(s)	117. 4(d)	99. 8(d)	
	9		174. 0(s)	171. 9(s)	172. 8(s)	168. 0(s)			
D	1				131. 1(s)	129. 9(s)			
	2				117. 3(d)	117. 0(d)			
	3				145. 9(s)	144. 5(s)			
	4				144. 9(s)	143. 5(s)			
	5				118. 0(d)	115. 7(d)			
	6				121. 8(d)	121. 5(d)			
	7				38. 0(t)	37. 5(t)			
	8				78. 3(d)	77. 2(d)			
	9				176. 7(s)	176. 4(s)			

本文将寡聚咖啡酸按其生成方式不同分为两类;第一类,是咖啡酸与其加水产物 3,4-二羟基苯基乳酸(即丹参素)经酯化缩合后而形成的迷迭香酸(1);第二类,为由两分子咖啡酸通过游离基反应

历程,使其中的一分子咖啡酸中的双键打开,并与另一分子的咖啡酸中的儿茶酚的 2 3 位进行缩合形成了一个二氢呋喃环,即原紫草酸(2)(见下图)



上述一分子的原紫草酸再分别与一分子或两分子的丹参素进一步缩合,便形成紫草酸(3)和紫草酸乙(4,5),后者在通常情况下是以镁盐或铵钾盐的形式存在,并可由原子吸收光谱及 FAB-MS 加以确证。作为波谱解析的基础,先分别就迷迭香酸(1)与原紫草酸(2)这两种不同结构类型化合物的波谱特征分述如下:

迷迭香酸(1),黄色粉末, $C_{18}H_{16}O_8$, $[\alpha]_D^{13} = +57.7^\circ$ (C 0.063, H₂O),与 1% $FeCl_3$ 试剂反应呈污绿色, Pos. FAB-MS 361 ($M^+ - H^+$)。其结构的特点在于 A 环的 2 位无取代基,因此 A 环的芳质子 (H-2, 5, 6) 显示为 1 2 4 偶合系统。而在高场区 δ 2.8~5.0 的一组 B 环侧链的质子显示为 ABX (H-7, H-8) 系统,构成此类化合物氢谱的重要特征。而从碳谱中也不难找出其相关特征峰,由于此类化合物的聚合单元具有邻二酚羟基的单元结构,在 δ 140~150 区间出现了 4 个接氧芳香季碳,即可确定其聚合度为 2;而在 δ 38.1 的 CH_2 峰及 78.4 的 CH 峰则提示在该二聚体中含有 3,4-二羟基苯基乳酸的结构单元。

原紫草酸(2),黄色粉末, $C_{18}H_{14}O_8$, $[\alpha]_D^{12} = +177.9^\circ$ (C 0.106, EtOH),与 1% $FeCl_3$ 试剂反应呈褐色, Pos. FAB-MS= 359 ($M^+ - 1$)。与迷迭香酸(1)在结构上的差别表现为原紫草酸(2)含有二氢呋喃环的单元结构。二氢呋喃环的两个手性碳的绝对构型分别为 *R* *S* 构型^[8]。在它的高分辨波谱中,在 1H NMR 中,二氢呋喃环的一组特征脂环氢的化学位移为 δ 5.85 及 δ 4.31 (H-7, H-8),偶合常数为 4.0 Hz 左右;在 ^{13}C NMR 中则分别为 δ 88.0 的

CH 峰,及 57.2 的 CH 峰 (C-8)。

丹酚酸中的三聚体,化合物 3 及四聚体,化合物 4, 5;它们的波谱特征是兼有以上的两种缩合方式。在解析结构时,首先利用碳谱中接氧芳香季碳 (δ 140~150) 的数目来判定其聚合度,进而利用氢谱或碳谱中高场区的特征峰来判断其聚合方式。

紫草酸(3),浅黄色粉末, $C_{27}H_{22}O_{12}$, $[\alpha]_D^{13} = +103.7^\circ$ (C 0.063, EtOH),与 1% $FeCl_3$ 试剂反应呈褐色, Pos. FAB-MS= 539 ($M^+ - H^+$)。在 ^{13}C NMR 中,在 δ 140~150 区间出现了 6 个接氧芳香季碳,因此其聚合度为 3。在它的高分辨 1H NMR 中,除了含有化合物 2 的结构单元特征外,在高场区,还出现一组与 B 环连接的 ABX 质子信号 (δ 5.06, br. d, $J = 7.1$ Hz, δ 3.01, br. d, $J = 14.2$ Hz, δ 2.84, dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz),说明它比化合物 2 多了一个 3,4-二羟基苯基乳酸的结构单元;相应地,在其 ^{13}C NMR 中,也可见到此结构单元的特征峰(见表 2)。

紫草酸乙镁盐(4),浅黄色粉末, $C_{36}H_{28}O_{16}Mg$, $[\alpha]_D^{13} = +144.9^\circ$ (C 0.064, MeOH),与 1% $FeCl_3$ 试剂反应呈褐色, Pos. FAB-MS= 741 ($M^+ - H^+$)。在 ^{13}C NMR 中,在 δ 140~150 区间出现了 8 个接氧芳香季碳,所以其聚合度为 4。在它的高分辨 1H NMR 中,除了含有化合物 3 的结构单元特征外,在高场区,还有一组类似于 B 环的 ABX 质子信号,即 D 环中的 (δ 4.94, br. d, $J = 10.6$ Hz, δ 3.10, br. d, $J = 12.5$ Hz, δ 2.78, dd, $J = 12.5, 10.6$ Hz),说明它比化合物 3 多了一个 3,4-二羟基苯基乳酸的结构单元;相应地,在其 ^{13}C NMR 中,也可见到此结构单元的特征峰(见表 2)。

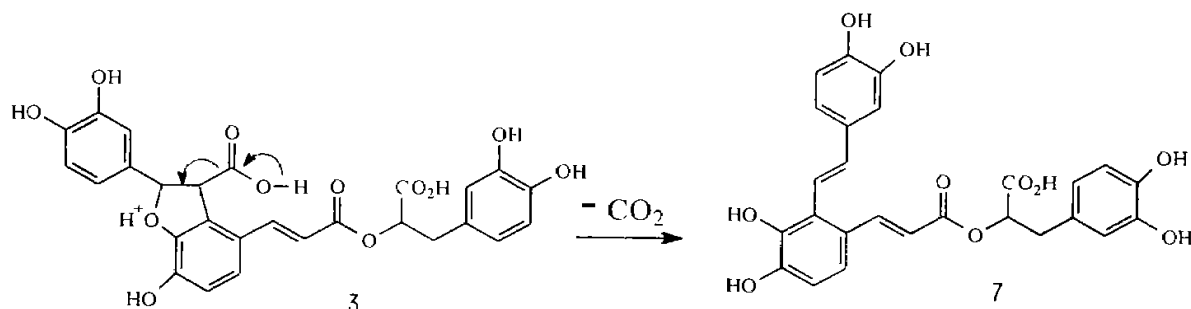
紫草酸氢钾盐 (5), 本化合物在 Sephadex LH-20 柱上的洗脱次序先于化合物 4, 但在酸性的展开系统中其 R_f 值与化合物 4 始终一致, 原子吸收光谱测出钾离子含量为 1.68%, 而未检出镁离子, 所以其结构参考文献^[8] 确定为紫草酸氢钾盐。

丹酚酸戊镁盐 (6), 浅黄色粉末, $C_{36}H_{28}O_{16}Mg$, $[\alpha]_D^{25} = +98.00 (C 0.035, H_2O)$, 与 1% $FeCl_3$ 试剂反应呈蓝紫色, $Pos. FAB-MS = 741 (M+H)^+$ 。6 和 4 的 $^1H NMR$ 的重要差别在于 4 中的一组二氢呋喃环质子 ($\delta 5.53$ 及 $4.43, d, J = 4.0 Hz$), 在 6 中为 $\delta 7.7$ 的单峰质子所替代, 提示二氢呋喃环经开环脱水, 原来环上的两个质子变成了一个与酯基共轭的烯质子。和酯基相连的缩合单元的位置可以利用远程偶合的 HMB 谱确定。在化合物 6 的结构鉴

定中, D 环的 H-8 与 C 环的 C-9 有远程偶合, C 环的 7 位烯氢与 A 环的 2 位碳有远程偶合, 由此即可确认。

丹参注射剂中的丹酚酸结构鉴定

由于丹参注射剂在制备过程中经受高温煎煮, 从而形成一些具有不完整的咖啡酸聚合单元的后生产物, 与丹参温水浸取液中所分离到的成分, 在结构上有明显差异。本实验证实, 用化合物 3 经加热煮沸 2 h 后即可转化得到化合物 7, 推测是化合物 3 经二氢呋喃环的开环、脱水、脱羧等反应而形成的后生产物 (见下图)。对此类后生产物还可利用核磁共振波谱以显示出以下三种结构类型:



i 开环后脱水、脱羧

在化合物 7 中, 由于二氢呋喃环开环后脱水、脱羧而形成的和 A 环、C 环共轭的一组反式烯氢, 其 $^1H NMR$ 的化学位移分别为 $\delta 6.67$ 及 7.09 , 偶合常数为 $16.0 Hz$; 而在 $^{13}C NMR$ 中, 于 $\delta 117.4$ 及 137.4 出现一组烯碳信号。

ii 脱羧、脱氢, 形成苯骈呋喃环的结构

化合物 8 的氢谱中出现 $\delta 7.36$ 的呋喃质子单峰, 碳谱中出现 $\delta 159.2$ 的季碳及 $\delta 99.8$ 的叔碳信号, 表现出典型的取代苯骈呋喃环的特征。

iii 开环后化合物 9 的 A 环与 C 环间的碳-碳键氧化断裂, A 环的 2 位形成 $-CH=COOH$ 的取代基。

化合物 9 的核磁共振氢谱在 $\delta 3.59$ 及 3.60 处, 出现两个孤立质子的单峰, 经 $^{13}C-^1H COSY$ 证实为 $\delta 38.4$ 的碳上的亚甲基质子, 此外, $^{13}C NMR$ 中还可可见 $\delta 178.6$ 的羧基碳, 详见表 1 2。

在采用反相层析的方法分离这类化合物时, 由于避开了酸性溶剂系统, 因而得到的化合物中多是酚酸的金属盐; 如 K^+ 、 Mg^{2+} 及 NH_4^+ 盐等, 其中

钾、镁等属于植物必需的矿质元素, 而氢盐是植物可利用氮的主要形式。因此当以快原子轰击质谱 (FAB-MS) 确定其分子量时, 所给出的分子量, 往往包含了金属离子的质量数, 对这些离子的鉴别还可通过原子吸收光谱确定。

实验部分

核磁共振用仪为 JNM-GX400 型, TMS 为内标; 质谱仪为 2AB-HS 型; 原子吸收光谱用 Shimadzu AA-670/G 型仪测定。AB-8 大孔树脂购自天津南开大学化工厂, Sephadex LH-20, 系 Pharmacia 产品。

提取分离: 丹参根的饮片 5 kg 粉碎, 以 $70 \sim 80^\circ C$ 的水浸提两次, 每次 2 h, 减压除去大部分水至 3000 ml 左右, 浓缩液上大孔树脂, 分别以水、50% 甲醇-水、甲醇洗脱。50% 甲醇-水部位再以 Sephadex LH-20 柱分离纯化得化合物 1~6。丹参注射剂为灌装前的原液 2500 ml, 由江苏常熟制药厂提供, 经上述类似分离过程得到 1~9。波谱数据: 见表 1 表 2。各化合物的得量: 分别为 1 (50

mg), **2** (210 mg), **3** (120 mg), **4** (2300 mg), **5** (550 mg), **6** (30 mg), **7** (550 mg), **8** (10 mg), **9** (290 mg).

参 考 文 献

- 1 黄诒森,张均田.丹参中三种水溶性成分的抗氧化作用.药学学报,1992, **27** 96
- 2 杨卫东,朱鸿良,赵保路.丹参的氧自由基清除作用.中国药理学通报,1990, **30** 184
- 3 Yokozawa T, Chung HY, Oura H. Effect of extract from *Radix Salvia miltiorrhiza* on the urinary urea, creatine and electrolyte excretion in uremic rats. *J Med Pharm Soc, WAKAN-YAKU* 1986, **3**: 10

- 4 陈政雄,顾文华,黄慧珠等.丹参中水溶性酚酸成分的研究.药学通报,1981, **16**(9): 536
- 5 Li LN, Tan R, Chen WM. Salvianolic acid A, a new depside from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med*, 1984, **50** 227
- 6 Ai CB, Li LN. Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza*. *J Nat Prod*, 1988, **51**(1): 145
- 7 Ai CB, Li LN. Salvianolic acid D and E Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med*, 1992, **58** 197
- 8 Tanaka T, Morimoto S, Nonaka GI, *et al.* Magnesium and ammonium(potassium Lithospermates B, the active principles having a uremia(preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem Pharm Bull*, 1989, **37**(2): 340

Studies on Isolation and Identification of Water Soluble Constituents of *Salvia Miltiorrhiza*

Zhou Changxin, Luo Houwei, Niwa Masatake¹

China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China, ²Faculty of Pharmacy, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468, Japan

Abstract Nine polyphenolic acids and polyphenolic carboxylate salts were isolated from the aqueous extract of roots of *Salvia miltiorrhiza* and Injection of *S. miltiorrhiza*. Using the gel filtration and reverse phase chromatography. Their structures were elucidated on the basis of high resolution NMR. Both the natural and the artifact compounds could be classified by the spectra of NMR. The converting mechanism of artifacts was also discussed.

Key words *Salvia miltiorrhiza*; Injection of Danshen; Depside; Magnesium Salvianolate E; Lithospermic acid; Prolithospermic acid; High resolution of NMR