

冠心宁注射液的化学成分研究

阮 鸣¹, 孔令义², 罗建光^{2*}

1. 南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 江苏 南京 211171

2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 研究冠心宁注射液的化学成分。**方法** 利用反复硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、大孔吸附树脂柱色谱、制备高效液相色谱和重结晶等方法进行分离纯化, 并通过分离得到的各个化合物的理化性质和光谱数据鉴定化合物结构。**结果** 分离得到 19 个化合物, 分别鉴定为原儿茶醛(1)、香草醛(2)、阿魏酸(3)、2-糠酸(4)、洋川芎内酯 I(5)、咖啡酸(6)、丹酚酸 A(7)、异丹酚酸 A(8)、丹酚酸 B(9)、异丹酚酸 C(10)、迷迭香酸(11)、1, 3-二咖啡酰奎宁酸(12)、洋川芎内酯 H(13)、对羟基苯甲酸(14)、间羟基苯甲酸(15)、邻羟基苯甲酸(16)、对羟基肉桂酸(17)、迷迭香酸甲酯(18)和丹酚酸 N 甲酯(19)。**结论** 19 个化合物均为首次从该制剂中分离得到; 经 HPLC 分析检测及文献对照, 化合物 2、3、5、13~16 为川芎中的化学成分, 化合物 7~11、18~19 为丹参中的化学成分, 化合物 1、4、6、12、17 为川芎和丹参共有成分。

关键词: 冠心宁注射液; 丹参; 川芎; 原儿茶醛; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)13-1838-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.006

Chemical constituents from Guanxinling Injection

RUAN Ming¹, KONG Ling-yi², LUO Jian-guang²

1. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China

2. College of China Martesia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents from Guanxinling Injection. **Methods** The chemical constituents were repeatedly isolated by column chromatographic techniques including silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and macroporous resin, and were purified by preparation HPLC chromatography and recrystallization, and their structures were identified by physicochemical properties and spectroscopic data. **Results** Nineteen compounds were isolated and identified as protocatechuic aldehyde (1), vanillin (2), ferulic acid (3), 2-furoic acid (4), senkyunolide I (5), caffeic acid (6), salvianolic acid A (7), isosalvianolic acid A (8), salvianolic acid B (9), isosalvianolic acid C (10), rosmarinic acid (11), 1, 3-dicaffeoylquinic acid (12), senkyunolide H (13), 4-hydroxybenzoic acid (14), *m*-hydroxybenzoic acid (15), *o*-hydroxybenzoic acid (16), 4-hydroxycinnamic acid (17), methyl rosmarinate (18), and salvianolic acid *N* methyl ester (19). **Conclusion** Nineteen compounds are isolated from the Guanxinling Injection for the first time, and all HPLC analyses and literature data show that compounds 2, 3, 5, 13—16 are originated from *Ligusticum chuanxiong*, compounds 7—11, and 18—19 from *Salvia miltiorrhiza*, and compounds 1, 4, 6, 12, and 17 from *L. chuanxiong* and *S. miltiorrhiza*.

Key words: Guanxinling Injection; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; *Ligusticum chuanxiong* Hort.; protocatechuic aldehyde; ferulic acid; senkyunolide I

近年来中药注射液安全事件频发, 如 2005 年莲必治注射液、穿琥宁注射液, 2006 年鱼腥草注射液, 2008 年的刺五加注射液、“茵栀黄注射剂”及 2009 年的“双黄连注射液”事件。组成中药注射剂的中

药材因品种、产地、生长环境和年限、采收季节、加工、储藏条件不同, 其化学成分会有差异, 加之中药注射剂在生产、运输、储存及临床应用缺乏有效的质量控制, 造成其安全性受到严重质疑^[1-2]。

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-12-0977)

作者简介: 阮 鸣 (1979—), 博士, 讲师, 主要从事中药及食品化学成分与质量控制研究。E-mail: yubinruming@sina.com

*通信作者 罗建光 Tel: (025)83271512 E-mail: luojg99@163.com

因此, 中药注射剂的安全性再评价被提上日程, 其关键技术之一是尽可能了解该制剂的物质基础, 并在此基础上提出有效可控的质量评价体系。冠心宁注射液由丹参、川芎两味药材组成, 具有活血化痰、通脉养心之功效, 主要用于冠心病、心绞痛的治疗, 具有多年的临床应用历史, 被收载于原卫生部药品标准中药成方制剂第十七册 (WS₃-B-3267-98) [3], 临床研究表明, 该注射液还可用于心血管疾病、脑血管疾病、呼吸系统疾病、肾病的治疗[4]。目前, 国内外的学者对冠心宁注射液的质量研究多集中于 HPLC-MS 的定性和定量分析[5-6], 而本实验则对该注射液进行系统的化学成分的分离, 从中分离得到的 19 个化合物, 分别鉴定为原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde, **1**)、香草醛 (vanillin, **2**)、阿魏酸 (ferulic acid, **3**)、2-糠酸 (2-furoic acid, **4**)、洋川芎内酯 I (senkyunolide I, **5**)、咖啡酸 (caffeic acid, **6**)、丹酚酸 A (salvianolic acid A, **7**)、异丹酚酸 A (isosalvianolic acid A, **8**)、丹酚酸 B (salvianolic acid B, **9**)、异丹酚酸 C (salvianolic acid C, **10**)、迷迭香酸 (rosmarinic acid, **11**)、1, 3-二咖啡酰奎宁酸 (1, 3-dicaffeoylquinic acid, **12**)、洋川芎内酯 H (senkyunolide H, **13**)、对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid, **14**)、间羟基苯甲酸 (*m*-hydroxybenzoic acid, **15**)、邻羟基苯甲酸 (*o*-hydroxybenzoic acid, **16**)、对羟基肉桂酸 (4-hydroxycinnamic acid, **17**)、迷迭香酸甲酯 (methyl rosmarinate, **18**)、丹酚酸 N 甲酯 (salvianolic acid N methyl ester, **19**)。并通过 HPLC 分析检测及文献对照, 对这些成分进行了归属, 有效地阐述了冠心宁注射液的物质基础, 为其质量控制体系的建立提供依据, 并为相关注射剂的化学成分研究提供参考。

1 仪器与材料

核磁共振仪 (德国 Bruker ACF—500), 质谱仪 (Agilent 1100 series LC-MSD-ESI-Trap-SL), 旋转蒸发仪 (Eyela Rotary Evaporator N—1001), 高效液相色谱仪 (Agilent 1100, DAD 检测器), 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目) 及薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 (20~100 μ m, 美国 Pharmacia 公司), D-101 型大孔树脂 (安徽三星树脂科技有限公司), 反相 C₁₈ (40~63 μ m, 日本富士公司)。蒸馏水用于柱色谱和薄层色谱, 双蒸水用于液相色谱, 甲醇 (色谱级和分析级, 江苏汉邦科技有限公司生产)。其他试剂和溶剂均购自南京

化学试剂有限公司, 级别为分析纯。

冠心宁注射液中试产品 (批号 091026)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎及川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎均由河北神威药业有限公司提供, 并由中国药科大学中药学院秦明坚教授鉴定。其中丹参药材及川芎药材分别按照冠心宁注射液工艺制备相应的注射用提取物, 以作 HPLC 定性鉴别分析使用。

2 提取与分离

取冠心宁注射液中试品约 6 L, 经 D-101 大孔吸附树脂吸附上样, 乙醇-水 (0:100、50:50、95:5) 梯度洗脱, 浓缩, 收集 50%乙醇洗脱部位 (121 g), 再经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇 (100:0、100:5、100:10、100:20、100:100、0:100) 梯度洗脱, 得到组分 Fr. A~F。

取 Fr. B 浸膏 27.42 g, 经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 再经硅胶柱色谱分离, 用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱纯化, 得到化合物 **1** (100.6 mg)、**2** (4.8 mg)、**3** (8.4 mg)、**4** (15.3 mg)、**5** (10.7 mg)、**6** (8.3 mg); 用 HPLC 制备色谱纯化 (甲醇-0.05% TFA 水为流动相), 得到化合物 **13** (6.2 mg)、**14** (1.5 mg)、**15** (1.2 mg) 和 **16** (1.1 mg); 经常压反相 C₁₈ 硅胶柱色谱分离 (甲醇-水为流动相) 梯度洗脱, 得化合物 **17** (1.8 mg)、**18** (0.7 mg) 和 **19** (0.4 mg)。

将 Fr. C 浸膏 6.34 g, 经硅胶色谱柱分离, 用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 并经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离, 得化合物 **7** (12.5 mg)、**10** (16.1 mg), 再将其他组分重复一次凝胶色谱柱分离, 经 HPLC 制备色谱纯化 (甲醇-0.07% TFA 水为流动相), 得化合物 **8** (5.8 mg)、**11** (13.5 mg)。

将 Fr. D 浸膏 10.33 g, 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离, 得化合物 **9** (12.6 mg)。再经 HPLC 制备色谱纯化 (甲醇-0.07% TFA 水为流动相), 得化合物 **12** (5.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 在空气中放置易变为淡米黄色; mp 153~154 $^{\circ}$ C; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 209, 232, 278, 313; ESI-MS m/z : 137 [M-H]⁻; 相对分子质量为 138.12; 分子式为 C₇H₆O₃。¹H-NMR (500 Hz, CD₃OD) δ : 6.93 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 7.29 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6),

7.27 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 9.72 (1H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 191.2 (C-7), 152.3 (C-3), 146.0 (C-4), 129.0 (C-1), 124.6 (C-6), 115.7 (C-5), 114.5 (C-2)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为原儿茶醛。

化合物 **2**: 白色针晶 (石油醚-醋酸乙酯); mp 81~83 °C; ESI-MS m/z : 152 $[\text{M}]^+$, 151 $[\text{M}-\text{H}]^+$, 137 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^+$, 相对分子质量为 152.15; 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 9.74 (1H, s, -CHO), 7.43 (1H, brs, H-2), 7.42 (1H, brd, $J = 7.9$ Hz, H-6), 6.93 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 129.8 (C-1), 114.4 (C-2), 151.7 (C-3), 147.1 (C-4), 108.7 (C-5), 127.6 (C-5), 190.9 (-CHO), 56.1 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为香草醛。

化合物 **3**: 白色针晶 (二氯甲烷-甲醇); mp 168~169 °C; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 289, 318; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 437, 1 691, 1 665, 1 517; ESI-MS m/z : 194 $[\text{M}]^+$, 179, 177 $[\text{M}-\text{OH}]^+$, 161, 148, 133, 105, 77; 相对分子质量为 194.18; 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 7.18 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.07 (1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H- α), 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H- β), 3.89 (3H, s, OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.2 (C=O), 151.5 (C-3), 149.9 (C-4), 127.8 (C-1), 124.0 (C-6), 116.5 (C-5), 115.9 (C- α), 111.64 (C-2), 147.0 (C- β), 56.4 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为阿魏酸。

化合物 **4**: 白色单斜长棱形结晶 (石油醚-醋酸乙酯); mp 133~134 °C; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 418; 相对分子质量为 112.08; 分子式为 $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CDCl_3) δ : 6.56 (1H, dd, $J = 1.8, 3.5$ Hz, H-4), 7.34 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-3), 7.65 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 9.18 (1H, s, -OH)。根据以上数据, 故鉴定化合物 **4** 为 2-糠酸。

化合物 **5**: 浅黄色油状物; ESI-MS m/z : 471 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 247 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 225 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 224 $[\text{M}]^+$, 207 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 206 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$; 相对分子质量为 224.25; 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 5.49 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-8), 4.30 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-7), 3.98 (1H, m, H-6), 2.56 (2H, m, H-4), 2.39 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, H-9), 1.98 (2H, m, H-5), 1.56 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz, H-10), 1.00 (3H, t, $J = 7.4$

Hz, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.6 (C-1), 155.2 (C-3), 149.9 (C-3a), 126.5 (C-7a), 114.4 (C-8), 71.1 (C-6), 65.4 (C-7), 29.2 (C-9), 25.1 (C-5), 23.4 (C-10), 18.3 (C-4), 14.2 (C-11)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为洋川芎内酯 I。

化合物 **6**: 黄白色针晶 (二氯甲烷-甲醇); mp 162~164 °C; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 216, 297, 322; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 420, 3 200, 1 640, 1 620, 1 600, 1 530, 1 450; ESI-MS m/z : 179 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 相对分子质量为 180.16; 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 7.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.02 (1H, d, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.24 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 167.9 (C-9), 148.4 (C-4), 146.1 (C-3), 145.7 (C-7), 127.5 (C-1), 122.3 (C-5), 116.1 (C-2), 115.6 (C-6), 114.9 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为咖啡酸。

化合物 **7**: 无定形黄色粉末; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205, 218, 287, 305, 335。ESI-MS m/z : 493 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 313, 295, 277, 185, 159; 相对分子质量为 494.45; 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5a), 7.03 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6a), 7.94 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7a), 6.23 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8a), 6.50 (1H, brs, H-2b), 6.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5b), 6.76 (1H, brd, $J = 7.8$ Hz, H-6b), 3.04 (1H, brs, H_B-7 α), 2.81 (1H, brs, H_B-7 β), 5.06 (1H, brs, H-8b), 7.07 (1H, brs, H-2c), 6.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5c), 6.76 (1H, brd, $J = 7.8$ Hz, H-6c), 7.09 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7c), 6.67 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H_C-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 126.2 (C_A-1), 131.3 (C_A-2), 146.7 (C_A-3), 147.7 (C_A-4), 116.1 (C_A-5), 122.0 (C_A-6), 145.6 (C_A-7), 116.6 (C_A-8), 168.6 (C_A-9), 131.2 (C_B-1), 117.5 (C_B-2), 144.6 (C_B-3), 144.3 (C_B-4), 115.0 (C_B-5), 120.7 (C_B-6), 38.5 (C_B-7), 127.5 (C_C-1), 120.2 (C_C-2), 145.8 (C_C-3), 146.7 (C_C-4), 114.3 (C_C-5), 120.2 (C_C-6), 137.4 (C_C-7), 117.4 (C_C-8)。[由于化合物结构复杂, 将其分为 A、B、C、D 等部分, 每部分的 C 和 H 再用阿拉伯数字标示, α 和 β 通常指同一碳上 2 个有不同构型的 H, a 和 b 常指同一碳上 2 个不同的 H (不强调构型)]。结合文献报道^[11], 故鉴定化合物 **7** 为丹酚酸 A。

化合物 **8**: 黄色粉末; ESI-MS m/z : 493 $[\text{M}-\text{H}]^-$;

相对分子质量为 494.45; 分子式为 $C_{26}H_{22}O_{10}$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 7.15 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_A-5), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_A-6), 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H_A-7), 6.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H_A-8), 6.70 (1H, brs, H_B-2), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_B-5), 6.49 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H_B-6), 3.05 (1H, dd, $J = 14.5, 4.0$ Hz, $H_B-7\alpha$), 2.94 (1H, dd, $J = 14.5, 4.0$ Hz, $H_B-7\beta$), 5.09 (1H, dd, $J = 4.0, 8.0$ Hz, H_B-8), 6.45 (1H, brs, H_C-2), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_C-5), 6.50 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H_C-6), 4.38 (1H, brs, H_C-7), 5.65 (2H, brs, $J = 16.0$ Hz, H_C-8); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 122.8 (C_A-1), 130.7 (C_A-2), 144.0 (C_A-3), 146.0 (C_A-4), 121.5 (C_A-5), 116.1 (C_A-6), 142.8 (C_A-7), 114.8 (C_A-8), 166.8 (C_A-9), 127.9 (C_B-1), 116.0 (C_B-2), 144.7 (C_B-3), 144.2 (C_B-4), 115.4 (C_B-5), 120.7 (C_B-6), 36.5 (C_B-7), 73.3 (C_B-8), 172.1 (C_B-9), 131.6 (C_C-1), 113.9 (C_C-2), 145.4 (C_C-3), 148.3 (C_C-4), 115.0 (C_C-5), 118.8 (C_C-6), 55.6 (C_C-7), 68.3 (C_C-8)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为异丹酚酸 A。

化合物 **9**: 淡黄色粉末; UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 286, 210; ESI-MS m/z : 717 $[M-H]^-$, 519, 537, 339, 321, 295, 279; 相对分子质量为 718.61; 分子式为 $C_{36}H_{30}O_{16}$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H_A-5), 7.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H_A-6), 7.46 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H_A-7), 6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H_A-8), 6.23 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H_B-2), 6.68 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H_B-5), 6.31 (1H, dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, H_B-6), 3.17 (1H, brd, $J = 14.0$ Hz, $H_B-7\alpha$), 2.79 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz, $H_B-7\beta$), 5.00 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H_B-8), 6.70 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H_C-2), 6.60 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_C-5), 6.54 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H_C-6), 5.63 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H_C-7), 4.35 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H_C-8), 6.58 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H_D-2), 6.48 (1H, brs, $J = 8.0$ Hz, H_D-5), 6.30 (1H, d, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H_D-6), 2.82 (1H, dd, $J = 14.0, 12.5$ Hz, $H_D-7\alpha$), 2.90 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, $H_D-7\beta$), 4.96 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H_D-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.3 (C_B-9), 170.7 (C_D-9), 170.4 (C_C-9), 165.9 (C_A-9), 147.3 (C_A-4), 147.3 (C_D-4), 145.8 (C_A-3), 145.5 (C_B-3), 145.1 (C_B-4), 145.1 (C_D-3), 144.0 (C_C-3), 143.9 (C_C-4), 141.8 (C_A-7), 131.4 (C_C-1), 127.9 (C_B-1), 127.6 (C_D-1), 125.0 (C_A-2), 122.8 (C_A-1), 121.2 (C_B-6),

121.2 (C_D-6), 120.0 (C_A-6), 117.3 (C_A-5), 117.1 (C_A-8), 116.9 (C_C-6), 116.5 (C_C-5), 116.5 (C_D-5), 115.9 (C_D-2), 115.6 (C_B-2), 115.4 (C_B-5), 112.6 (C_C-2), 86.1 (C_C-7), 74.9 (C_D-8), 74.1 (C_B-8), 55.5 (C_C-8), 36.4 (C_D-7), 36.2 (C_B-7)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为丹酚酸 B。

化合物 **10**: 无定形黄色粉末; UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 202, 222, 288, 326, 340; ESI-MS m/z : 491 $[M-H]^-$, 293, 311, 276, 265, 249; 相对分子质量为 492.43; 分子式为 $C_{26}H_{20}O_{10}$ 。 1H -NMR (500 Hz, $DMSO-d_6$) δ : 7.47 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, $H-2$), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, $H-3$), 7.82 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, $H-7$), 6.34 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, $H-8$), 6.64 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, $H-2'$), 6.65 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, $H-5'$), 6.53 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, $H-6'$), 3.00 (1H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz, $H-7'\alpha$), 2.96 (1H, dd, $J = 14.4, 7.8$ Hz, $H-7'\beta$), 5.14 (1H, dd, $J = 7.8, 2.7$ Hz, $H-8'$), 6.84 (1H, s, $H-3''$), 6.63 (1H, s, $H-6''$), 6.87 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, $H-7''$), 6.84 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, $H-8''$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 123.4 ($C-1$), 123.9 ($C-2$), 116.2 ($C-3$), 150.8 ($C-4$), 144.8 ($C-5$), 131.1 ($C-6$), 142.5 ($C-7$), 116.0 ($C-8$), 166.7 ($C-9$), 127.9 ($C-1'$), 116.1 ($C-2'$), 143.9 ($C-3'$), 146.0 ($C-4'$), 114.9 ($C-5'$), 120.4 ($C-6'$), 36.5 ($C-7'$), 73.3 ($C-8'$), 172.1 ($C-9'$), 121.9 ($C-1''$), 142.3 ($C-2''$), 108.3 ($C-3''$), 150.8 ($C-4''$), 146.9 ($C-5''$), 114.1 ($C-6''$), 131.4 ($C-7''$), 123.6 ($C-8''$)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为异丹酚酸 C。

化合物 **11**: 淡黄色粉末; mp 172~174 °C; ESI-MS m/z : 359 $[M-H]^-$, 161, 197, 179, 133; 相对分子质量为 360.31; 分子式为 $C_{18}H_{16}O_8$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.98 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, $H-2$), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, $H-6$), 6.89 (1H, dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, $H-6$), 7.49 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-7$), 6.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-8$), 6.90 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, $H-2'$), 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, $H-5'$), 6.55 (1H, dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, $H-6'$), 3.03 (1H, dd, $J = 3.5, 14.0$ Hz, $H-7'\alpha$), 2.95 (1H, dd, $J = 8.5, 14.0$ Hz, $H-7'\beta$), 5.13 (1H, brd, $J = 8.5$ Hz, $H-8'$); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 127.6 ($C-1$), 115.2 ($C-2$), 146.6 ($C-3$), 149.6 ($C-4$), 116.3 ($C-5$), 123.1 ($C-6$), 147.7 ($C-7$), 114.3 ($C-8$), 168.4 ($C-9$), 129.2 ($C-1'$), 117.5 ($C-2'$), 146.0 ($C-3'$), 143.1 ($C-4'$), 116.5 ($C-5'$), 121.8 ($C-6'$), 37.8 ($C-7'$), 74.5 ($C-8'$), 173.5 ($C-9'$)。以上数据与文献报道一致^[16], 故

鉴定化合物 **11** 为迷迭香酸。

化合物 **12**: 白色粉末; mp 225~227 °C; ESI-MS m/z : 515 $[M-H]^-$, 353, 191, 179; 相对分子质量为 516.45; 分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 2.23 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2 α), 2.40 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2 β), 5.45 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, m, H-4), 4.37 (1H, m, H-5), 1.96 (1H, m, H-6 α), 2.48 (1H, m, H-6 β), 7.07 (1H, s, H-2' α), 7.03 (1H, s, H-2' β), 6.74 (2H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-5'), 6.91 (2H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.46 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7' α), 7.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7' β), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8' α), 6.15 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 80.9 (C-1), 35.0 (C-2), 72.3 (C-3), 70.5 (C-4), 68.8 (C-5), 37.4 (C-6), 173.4 (C-7), 125.8 (C-1' α), 125.3 (C-1' β), 115.8 (C-2' α), 114.7 (C-2' β), 145.7 (C-3'), 148.6 (C-4' α), 147.9 (C-4' β), 116.3 (C-5' α), 115.8 (C-5' β), 121.0 (C-6' α), 120.2 (C-6' β), 144.6 (C-7' α), 143.2 (C-7' β), 114.7 (C-8' α), 114.4 (C-8' β), 166.4 (C-4' α), 165.0 (C-4' β)。结合文献报道^[17-18], 并利用对照品 HPLC 定性鉴别, 鉴定化合物 **12** 为 1, 3-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **13**: 黄色油状物; ESI-MS m/z : 471 $[2M+Na]^+$, 265, 253, 225 $[M+H]^+$, 207, 189; 相对分子质量为 224.25; 分子式为 $C_{12}H_{16}O_4$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 5.48 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-8), 4.45 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7), 3.80 (1H, m, H-6), 2.69 (2H, m, H-4), 2.38 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, H-9), 2.01 (2H, m, H-5), 1.56 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.00 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.1 (C-1), 155.3 (C-3), 149.7 (C-3a), 127.7 (C-7a), 114.7 (C-8), 70.4 (C-6), 63.2 (C-7), 29.2 (C-9), 25.8 (C-5), 23.4 (C-10), 21.1 (C-4), 14.2 (C-11)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **13** 为洋川芎内酯 H。

化合物 **14**: 无色针晶(甲醇); mp 213~214 °C; ESI-MS m/z : 138 $[M]^+$, 121 $[M-OH]^+$, 93 $[M-COOH]^+$; 相对分子质量为 138.12; 分子式为 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 7.86 (2H, m, H-2, 6), 6.82 (2H, m, H-3, 5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.6 (-COOH), 123.2 (C-1), 133.3 (C-2, 6), 116.3 (C-3, 5), 163.6 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **14** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **15**: 无色针晶(甲醇); mp 201~203 °C;

相对分子质量为 138; 分子式为 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 7.79 (1H, dd, $J = 1.5, 7.5$ Hz, H-4), 7.33 (1H, dt, $J = 1.5, 7.0$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 6.81 (1H, m, H-5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.9 (-COOH), 155.4 (C-3), 138.9 (C-6), 134.5 (C-5), 119.3 (C-2), 115.2 (C-4), 111.2 (C-1)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **15** 为间羟基苯甲酸。

化合物 **16**: 无色针状晶体(甲醇); mp 157~159 °C; 相对分子质量为 138.12; 分子式为 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 10.36 (1H, brs, -COOH), 7.94 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.54 (1H, dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz, H-5), 7.00 (1H, dd, $J = 8.0, 7.9$ Hz, H-6), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.8 (C-1), 111.3 (C-2), 162.2 (C-3), 117.8 (C-4), 136.9 (C-5), 119.6 (C-6), 130.6 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **16** 为邻羟基苯甲酸。

化合物 **17**: 白色针状结晶(甲醇); mp 210~212 °C; ESI-MS m/z : 165 $[M+H]^+$, 164 $[M]^+$, 163, 147, 119, 107, 91, 65; 相对分子质量为 164.16; 分子式为 $C_9H_8O_3$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.80 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, 5), 7.49 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1'), 10.6 (1H, s, -OH), 12.4 (1H, s, -COOH); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 146.7 (C-1), 115.6 (C-2, 6), 116.8 (C-3, 5), 161.2 (C-4), 131.1 (C-7), 127.2 (C-8), 171.0 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **17** 为对羟基肉桂酸。

化合物 **18**: 白色粉末; mp 72~74 °C; IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 386, 2 950, 1 689, 1 631, 1 602, 1 519, 1 441; ESI-MS m/z : 373 $[M-H]^-$, 397 $[M+Na]^+$, 375 $[M+H]^+$; 相对分子质量为 374.34; 分子式为 $C_{19}H_{18}O_8$ 。 1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.29 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3'), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8'), 6.98 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-9'), 7.08 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-5'), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 6.60 (1H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-9), 6.78 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-5), 3.75 (3H, s, -OCH₃), 3.07 (2H, m, H-3), 5.22 (1H, dd, $J = 7.5, 5.0$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.8 (C-1), 166.9 (C-1'), 148.4 (C-7'), 146.6 (C-3'), 145.4 (C-6'), 144.18 (C-6), 143.9 (C-7), 127.4 (C-4), 126.2

(C-4'), 121.8 (C-9'), 120.4 (C-9), 116.1 (C-5), 115.1 (C-8'), 114.9 (C-8), 113.8 (C-5'), 112.7 (C-2'), 73.3 (C-2), 51.3 (C-10), 36.5 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **18** 为迷迭香酸甲酯。

化合物 **19**: 黄色无定形粉末; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 290, 329; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 424, 2 926, 1 693, 1 600; ESI-MS m/z : 505 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 相对分子质量为 506.46; 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 。 ^1H -NMR (500 Hz, CD_3OD) δ : 6.77 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 6.78 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 7.88 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 6.70 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.57 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6'), 5.14 (1H, dd, $J = 8.0, 4.5$ Hz, H-8'), 3.05 (1H, dd, $J = 15.0, 4.5$ Hz, H-7 α'), 2.96 (1H, dd, $J = 15.0, 8.5$ Hz, H-7 β'), 6.80 (1H, s, H-2''), 6.59 (1H, s, H-5''), 6.82 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7''), 7.28 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8''), 3.65 (3H, s, H-10'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 132.5 (C-1), 124.8 (C-2), 143.9 (C-3), 152.2 (C-4), 123.3 (C-5), 132.8 (C-6), 143.7 (C-7), 117.4 (C-8), 168.1 (C-9), 129.3 (C-1'), 117.6 (C-2'), 146.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.8 (C-6'), 37.9 (C-7'), 74.7 (C-8'), 173.5 (C-9'), 52.1 (C-10'), 125.0 (C-1''), 109.7 (C-2''), 147.3 (C-3''), 148.3 (C-4''), 115.5 (C-5''), 152.3 (C-6''), 117.5 (C-7''), 125.3 (C-8'')。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **19** 为丹酚酸 *N* 甲酯。

4 冠心宁注射液、丹参药材、川芎药材的 HPLC 分析结果

4.1 色谱条件

Agilent 1100 高效液相色谱仪, QuatPump 泵, DAD 检测器, 全自动进样器, Agilent HPLC 色谱工作站。XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Part Number: Ult5B18425 (Welch Materials, Inc.), 预柱: C₁₈ 保护柱 (10 mm×4.6 mm, 5 μm , Alltech)。流动相 0.8% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 0~30 min, 5%~19% A; 30~45 min, 19%~33% A; 45~60 min, 33%~43% A; 60~70 min, 43% A; 70~90 min, 43%~60% A。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254、280 nm, 进样量 5 μL 。

4.2 HPLC 定性分析结果

根据冠心宁注射液、丹参药材、川芎药材的 HPLC 色谱图上各化合物色谱峰的保留时间的一致性鉴定其归属, 结果见图 1。

从图 1 中详细对比各化合物保留时间可发现, 注射液中的化合物 **2**、**3**、**5**、**13**、**14** 来自川芎药材, 化合物 **7**~**11** 来自丹参药材, 化合物 **1**、**4**、**6**、**12**、**17** 为丹参和川芎共有成分。

5 讨论

本实验对冠心宁注射液化学成分进行了系统的分离纯化, 共得到 19 个单体化合物; 同时本实验还按照冠心宁注射液的制备工艺制备出川芎及丹参注射液提取物, 并采用 HPLC 定性分析方法进行检测,

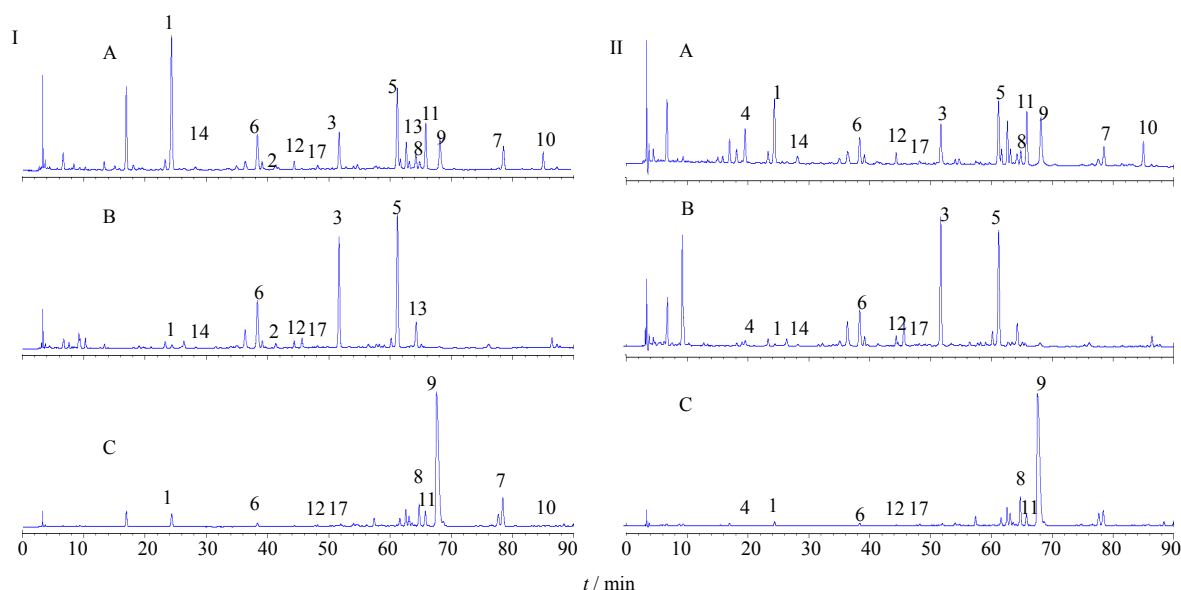


图 1 冠心宁注射液 (A)、川芎药材 (B) 与丹参药材 (C) 在 280 nm (I) 和 245 nm (II) 波长下的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of Guanxinling Injection, Chuanxiong Rhizoma, and Salviae Miltiorrhiza Radix at 280 nm (I) and 245 nm (II)

同时结合文献对照,结果表明,化合物 2、3、5、13、14、15^[25]、16^[26]为川芎中的化学成分,化合物 7~11、18^[27]、19^[24]为丹参中的化学成分,化合物 1、4、6、12、17 为川芎和丹参共有成分。此外,化合物 15、16、18、19 虽为冠心宁注射液中分得的化学成分,但由于制剂成分的复杂性,其在本实验的色谱条件下并未出峰。本研究结果较明确地阐述了冠心宁注射液的物质基础。

参考文献

- [1] Ji K, Chen J, Li M, *et al.* Comments on serious anaphylaxis caused by nine Chinese herbal injections used to treat common colds and upper respiratory tract infections [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 55: 134-138.
- [2] 郭旭辉, 张娜, 李林森. 中药注射剂不良反应原因分析及对策 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(3): 216-219.
- [3] 中药成方制剂部颁标准冠心宁注射液 (WS₃-B-3267-98) [S]. 1998.
- [4] 俞丹晖. 冠心宁注射液的临床应用进展 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2009, 33(3): 454-455.
- [5] Chen X, Lou Z, Zhang H, *et al.* Identification of multiple components in Guanxinning injection using hydrophilic interaction liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(11): 1661-1674.
- [6] Guo X R, Chen X H, Li L, *et al.* LC-MS determination and pharmacokinetic study of six phenolic components in rat plasma after taking traditional Chinese medicinal-preparation: Guanxinning lyophilized powder for injection [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873: 51-58.
- [7] 陈炜. 丹参中儿茶酚醛的分离鉴定 [J]. *中草药*, 1980, 11(10): 442.
- [8] 李陆军, 宋杰, 冯丽彬. 变叶树参根醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(2): 144-146.
- [9] Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, *et al.* Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* [J]. *Murr Mol*, 2009, 14: 850-867.
- [10] Grech J N, Li Q, Roufogalis B, *et al.* Novel Ca²⁺-Atpase inhibitors from the dried root tubers of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57: 1682-1687.
- [11] 曹园, 瞿慧, 姚毅, 等. 鬼针草化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(24): 3435-3439.
- [12] Li L N, Tan R, Chen W M. Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(3): 227-228.
- [13] Bont D, Andreas H B, Raggars R J. Salvianolic acid components as lipase inhibitors, and use in the prevention and treatment of overweight EP1371368A1 [P]. 2003-12-17.
- [14] Chun B A. Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prod*, 1988, 1: 145.
- [15] Qian T X, Li L N. Isosalvianolic acid C, a depside possessing a dibenzoxepin skeleton [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1068-1070.
- [16] 郑晓珂, 李钦, 冯卫生. 冬凌草中酚酸类化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2004, 39(5): 335.
- [17] 滕荣伟, 周志宏, 王德祖, 等. 白花刺参中的咖啡酰基奎宁酸成分 [J]. *波谱学杂志*, 2002, 19(2): 167-174.
- [18] 袁珂, 贾安, 朱建鑫. 少花斑鸠菊中苯丙素类化合物的结构鉴定 [J]. *分析化学*, 2008, 36(1): 47-51.
- [19] 卓敏, 吕寒, 任冰如, 等. 红凤菜化学成分研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 30-32.
- [20] 温晶, 史海明, 咎珂, 等. 刘寄奴的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 870-873.
- [21] 李微, 陈发奎, 刘晓秋. 大青叶的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(1): 15-16.
- [22] 冯美玲, 王书芳, 张兴贤. 枸杞子的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 265-268.
- [23] Wang M, Liang J Y, Chen X Y. Water-soluble constituents of *Clerodendranthus spicatus* [J]. *Chin J Nat Med*, 2007(5): 27-30.
- [24] Ma H Y, Gao H Y, Sun L, *et al.* Constituents with α -glucosidase and advanced glycation end-product formation inhibitory activities from *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. *J Nat Med*, 2011, 65: 37-42.
- [25] 王普善, 高宣亮, 福山爱保, 等. 中药川芎的化学成分研究-六种酚类化合物 [J]. *中草药*, 1985, 16(5): 45.
- [26] 王普善, 高宣亮, 福山爱保, 等. 中药川芎的化学成分研究——一种萜类化合物 [J]. *中草药*, 1985, 16(4): 30.
- [27] Kohda H, Takeda O, Tanaka S, *et al.* Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from Dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 7(5): 1287-1289.