

丹酚酸 B 热解产物化学成分分离与鉴定

刘生生¹, 韩 飞^{3*}, 许 卉², 刘 珂^{2,3}

1. 山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250000

2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005

3. 山东靶点药物研究有限公司, 山东 烟台 264006

摘 要: 目的 更好地开发利用丹酚酸 B (salvianolic acid B)。方法 对质量分数 95% 丹酚酸 B 进行热解, 热解产物经大孔树脂柱、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、制备液相和重结晶等方法进行分离; 根据理化性质、TLC、波谱数据以及 MS 鉴定产物结构。结果 分得 8 个化合物, 分别鉴定为丹参素 (1)、咖啡酸 (2)、原儿茶醛 (3)、紫草酸 (4)、迷迭香酸 (5)、丹酚酸 A (6)、丹酚酸 F 甲酯 (7)、丹酚酸 C (8)。结论 首次报道丹酚酸 B 裂解产物的结构。

关键词: 丹参; 丹酚酸 B; 丹酚酸 F 甲酯; 原儿茶醛; 丹酚酸 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0247-04

Isolation and identification of chemical constituents from thermal decomposition extract of salvianolic acid B

LIU Sheng-sheng¹, HAN Fei³, XU Hui², LIU Ke^{2,3}

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250000, China

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

3. Shandong Target Drug Research Co., Ltd., Yantai 264006, China

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; salvianolic acid B; methyl salvianolate F; protocatechaldehyde; salvianolic acid A

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物丹参的干燥根及根茎^[1], 根据丹参化学成分的性质, 主要分为水溶性成分和脂溶性成分两大类。丹参的水溶性成分具有酚酸类结构, 是丹参发挥疗效作用的主要物质之一, 在化学成分、药理作用方面被广泛研究, 已表明具有抑制血小板聚集、抑制凝血和抗血栓形成^[2]、抑制细胞内源性胆固醇合成以及调节血脂、防止动脉粥样硬化斑块形成等作用^[3]。丹酚酸 B 作为丹参中量最高的酚酸, 常作为丹参原药材、丹参制剂及含丹参药材复方制剂的质量控制指标成分, 具有潜在的药物研发价值。丹酚酸 B 是热不稳定物质, 在热作用下发生分解反应^[4-6]。因此, 丹酚酸 B 热解产物的分离与鉴定, 对于含丹酚酸 B 中药制剂、保健品开发以及上市治疗药物的监测具有重要的意义。本实验对质量分数为 95% 丹酚酸 B 进行热解, 对热解产物进行分离和鉴定, 共分得 8 个化合物, 分别鉴定为丹参素 (1)、

咖啡酸 (2)、原儿茶醛 (3)、紫草酸 (4)、迷迭香酸 (5)、丹酚酸 A (6)、丹酚酸 F 甲酯 (7)、丹酚酸 C (8), 首次报道丹酚酸 B 裂解产物的结构。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

XT-4 型熔点测定仪; WRR 熔点测定仪, 上海精密科学仪器有限公司; 核磁共振谱用 Bruker AV-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标; Thermo electron corporation TSQ Quantum Access 质谱仪; Agilent 1200 高效液相色谱仪。

1.2 药品与试剂

丹酚酸 B (95%, 自制); 丹参素、咖啡酸、原儿茶醛对照品由山东靶点药物研究有限公司提供; 柠檬酸三钠, 分析纯, 天津市天大化工实验厂, 批号 20070109; 水为 Milli-Q 超纯水。其余试剂均为分析纯。丹参药材购自烟台医药商城, 经烟台大学药学院刘珂博士鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge。

收稿日期: 2010-06-24

作者简介: 刘生生 (1979—), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物活性成分研究。

*通讯作者 韩 飞 Tel: 15965178443 E-mail: ythanfei@sohu.com

2 热解产物的制备与分离

丹酚酸 B 提取物 10 g, 溶于水中配制成质量分数为 1% 丹酚酸 B 溶液, 加柠檬酸三钠调 pH 值至 4.6, 于 125 °C, 0.4 MPa 条件下热解 4 h, 放冷后加盐酸调 pH 值至 2。转化液用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 萃取液减压浓缩得 4 个萃取部分。取醋酸乙酯层 5.6 g, 经 D-101 树脂 (乙醇-水体系洗脱)、硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇体系洗脱)、制备液相 (甲醇-水体系)、羟丙基葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20) 柱色谱和重结晶分离得化合物 **1** (89.2 mg)、**2** (260.5 mg)、**3** (210.4 mg)、**4** (50.2 mg)、**5** (20.5 mg)、**6** (386.7 mg)、**7** (20.6 mg)、**8** (2.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色长针状结晶 (甲醇), 三氯化铁显色为绿色, 溴酚蓝反应呈阳性, 示结构中含有酚羟基及羧基。mp 85~87 °C。经与已知对照品丹参素共薄层色谱, 在 3 种溶剂系统下展开 R_f 值相同, CO-TLC 实验斑点不分离, 混合后测定熔点不下降, 故鉴定化合物 **1** 为丹参素。

化合物 **2**: 黄色结晶 (甲醇-水, 7:3), 三氯化铁及溴酚蓝反应均为阳性, 示结构中含有酚羟基及羧基。mp 218~220 °C。经与已知对照品咖啡酸共薄层色谱, 在 3 种溶剂系统下展开 R_f 值相同, CO-TLC 实验斑点不分离, 混合后测定熔点不下降, 故鉴定化合物 **2** 为咖啡酸。

化合物 **3**: 灰白色片状结晶 (醋酸乙酯), 三氯化铁显色为绿色, 溴酚蓝反应呈阳性, 示结构中含有酚羟基及羧基。mp 153~154 °C。经与已知对照品原儿茶醛共薄层色谱, 在 3 种溶剂系统下展开 R_f 值相同, CO-TLC 实验斑点不分离, 混合后测定熔点不下降, 故鉴定化合物 **3** 为原儿茶醛。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, 三氯化铁-铁氰化钾及溴酚蓝反应均为阳性, 提示结构中含有酚羟基及羧基。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 255, 289, 261; 红外光谱 IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 399, 1 686, 1 608, 1 266, 1 127。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 3.00 (1H, dd, J = 14.32, 8.08 Hz, H_a-7), 3.07 (1H, dd, J = 14.36, 4.36 Hz, H_b-7), 4.37 (1H, d, J = 4.6 Hz, H-8a), 5.17 (1H, dd, J = 7.96, 4.28 Hz, H-8), 5.90 (1H, d, J = 4.6 Hz, H-7a), 6.34 (1H, d, J = 15.96 Hz, H-8), 6.62 (1H, dd, J = 8.08, 1.96 Hz, H-6'), 6.65~6.79 (5H, m, ArH-2', 5', 2a, 5a, 6a), 6.81 (1H, dd, J = 8.44 Hz, H-5), 7.21

(1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 7.82 (1H, d, J = 15.92 Hz, H-7)。电喷雾质谱 ESI 获得 M-H 离子峰为 [M-H]⁻ 537.15, 符合分子式 C₂₇H₂₂O₁₂。¹³C-NMR 详细归属见表 1, 以上数据与文献报道的紫草酸一致^[7]。

表 1 化合物 4~7 的 ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD 中)

Table 1 ¹³C-NMR (100 MHz, in CD₃OD) data of compounds 4—7

碳号	4	5	6	7
1	124.6	127.7	126.1	126.1
2	127.6	115.2	128.4	128.1
3	148.8	146.8	131.4	131.4
4	145.2	149.7	148.2	148.1
5	118.3	116.3	114.8	114.7
6	121.7	123.1	120.6	120.5
7	144.1	147.7	147.4	146.5
8	116.4	114.4	115.6	116.0
9	168.1	168.4	168.6	169.9
1'	129.2	129.3	129.3	
2'	117.6	117.6	117.4	
3'	146.6	146.1	146.1	
4'	145.2	145.2	145.2	
5'	116.3	116.5	116.3	
6'	121.9	121.8	121.9	
7'	37.9	37.9	37.9	
8'	74.7	74.6	74.7	
9'	173.4	173.6	173.4	
1a	133.8		144.4	144.4
2a	113.4		113.9	113.9
3a	146.7		146.5	146.4
4a	146.0		146.8	146.7
5a	118.3		116.4	116.4
6a	116.0		120.4	120.2
7a	88.7		137.9	137.7
8a	57.5		120.1	120.1
9a	173.4			
-COOCH ₃				52.0

化合物 **5**: 白色无定形粉末, 三氯化铁-铁氰化钾及溴酚蓝反应均为阳性, 香荚蓝醛显粉红色, 提示结构中含有酚羟基及羧基。mp 218~220 °C。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 3.00 (1H, dd, J = 14.28, 8.32 Hz, H_a-7'), 3.09 (1H, dd, J = 14.36, 4.32 Hz, H_b-7'), 5.19 (1H, dd, J = 8.24, 4.28 Hz, H-8'), 6.26 (1H, d, J = 15.92 Hz, H-8), 6.61 (1H, dd, J = 8.04,

1.84 Hz, H-6'), 6.70 (1H, d, $J = 8.04$ Hz, H-5'), 6.75 (1H, d, $J = 1.76$ Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, H-5), 6.95 (1H, dd, $J = 8.24, 1.96$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J = 1.92$ Hz, H-2), 7.55 (1H, d, $J = 15.88$ Hz, H-7)。 ^{13}C -NMR 数据见表 1。以上数据与文献报道的迷迭香酸一致^[7]。

化合物 6: 黄色无定形粉末, mp 218~220 °C。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 41.67^\circ$ (c 0.10, 乙醇)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 205, 218, 287, 305, 335。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 385, 1 710, 1 689, 1 601, 1 519, 1 283, 1 169。 ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) 在氢谱高场区三组质子峰 δ 2.95 (1H, dd, $J = 14.28, 8.52$ Hz), δ 3.06 (1H, dd, $J = 14.32, 4.08$ Hz) 与质子峰 δ 5.17 (1H, dd, $J = 8.36, 4.08$ Hz) 三者之间偶合相关, 构成 ABX 系统, 应归属为结构中 7'-H_a, 7'-H_b (它们因连接于手性中心 8' 位表现为不等同质子而化学位移不同) 和 8' 质子; 低场区有 8 个氢信号为 3 个苯环上的芳香氢和 4 个咖啡酰基双键上的氢, 其中 δ 6.31 (1H, d, $J = 15.76$ Hz), δ 8.06 (1H, d, $J = 15.80$ Hz) 显示分子中与 9 位酯基相连的咖啡酰基 7, 8 位不饱和双键, 受羰基和相邻苯环的影响, H-7 处于较低场, 由其偶合常数可知为反式结构; δ 6.75 (1H, d, $J = 8.08$ Hz), 6.87 (1H, dd, $J = 8.16, 1.56$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 1.44$ Hz) 显示为一个 1、3、4 三取代苯环, 应归属为 5a、6a、2a 位氢信号; 6.54 (1H, dd, $J = 8.04, 1.60$ Hz), 6.64 (1H, d, $J = 8.56$ Hz), 6.71 (1H, d, $J = 1.56$ Hz) 显示分子中含有一个 1、3、4 三取代苯环, 应归属为 6'、5'、2' 位氢信号; δ 6.73 (1H, d, $J = 8.44$ Hz), 7.12 (1H, d, $J = 8.32$ Hz) 表明分子中含有一个 1、2、3、6 四取代苯环, 应归属为 5、6 位氢信号。 δ 7.14 (1H, d, $J = 16.00$ Hz), 6.63 (1H, d, $J = 16.04$ Hz) 为分子中与两苯环相连的双键, 应归属为 8a、7a 位双键氢信号, 由偶合常数为 16.00 Hz 可知为反式构型。以 DMSO 为溶剂所测 ^1H -NMR 谱可见羧酸氢和 6 个酚羟基信号, 加 D_2O 后消失。 ^{13}C -NMR 归属见表 1。高分辨质谱 HRMS 获得 $\text{M} + \text{Na}$ 的离子峰为 $[\text{M} + \text{Na}]^+ 517.110 5$, 推测分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}\text{Na}$ (计算值 517.111 1), 给出分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 。以上数据与文献报道的丹酚酸 A 一致^[8]。

化合物 7: 黄色结晶 (CH_2Cl_2 -MeOH 50 : 50), 三氯化铁-铁氰化钾及溴酚蓝反应均为阳性。mp 187~190 °C。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 254, 267。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 419, 1 692, 1 603, 1 495, 1 261。在氢谱上共有 13 组质子峰, 共 13 个氢。其中, 较高场的一组质子峰

δ 3.73 (3H, s) 应归属为结构中 (-COOCH₃) 甲氧基氢信号; 低场区质子峰 δ 6.26 (1H, d, $J = 15.84$ Hz) 与质子峰 δ 8.00 (1H, d, $J = 15.84$ Hz) 偶合相关, 应归属为分子中咖啡酰基的双键上的氢, 受羰基和相邻苯环的影响, H-7 处于较低场, 由其偶合常数可知为反式结构。 δ 6.62 (1H, d, $J = 16.40$ Hz) 与质子峰 δ 7.12 (1H, d, $J = 16.36$ Hz) 偶合相关, 应归属为分子中 7a、8a 位不饱和双键上的氢, 且受苯环上吸电子基团的作用 8a 位氢处于较低场; δ 6.84 (1H, dd, $J = 8.20, 1.80$ Hz), δ 7.02 (1H, d, $J = 1.72$ Hz), δ 7.07 (1H, d, $J = 8.44$ Hz) 组成 ABX 系统, 显示分子中 1, 3, 4-取代苯环结构, 应分别归属为苯环上 6a 位、2a 位、5a 位氢信号; δ 6.73 (1H, d, $J = 8.72$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.44$ Hz) 表明分子中含有 1、2、3、6 四取代苯环结构, 应分别归属为苯环上 4、5 位氢信号。 ^{13}C -NMR 谱中给出 18 个碳信号, 其中 δ 值为 52.0 为甲酯 (-COOCH₃) 的信号, 169.8 为羧基的信号, 碳谱归属详见表 1。高分辨质谱 HRMS 获得 $\text{M} - \text{H}$ 的准分子离子峰为 $[\text{M} - \text{H}]^- 327.087 7$, 给出分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (计算分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 327.087 4)。在化合物 7 的 HMBC 谱中显示 δ 3.73 (3H, s) 处的甲氧基信号与羰基碳信号 C-9 相关, 说明甲氧基信号连接在羰基碳上。以上数据与文献报道的 salvianolic acid F 的数据对照^[9], 证明该化合物为丹酚酸 F 甲酯 (methyl salvianolate F), 结构式见图 1。

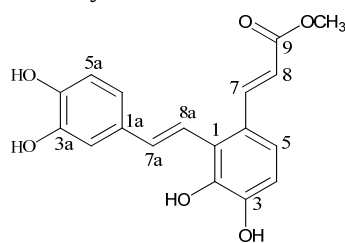


图 1 丹酚酸 F 甲酯的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of methyl salvianolate F

化合物 8: 黄色无定形粉末, 三氯化铁试剂反应呈褐色。电喷雾电离质谱测得 $[\text{M} - \text{H}]^- 490.98$, 符合分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 。 ^1H -NMR 谱中有 3 个重要特征, 其一是在 ^1H -NMR 谱中, 相对丹酚酸 B, 二氢呋喃环的一组特征酯环双氢的化学位移为 δ 7.22 (1H, s, H-7) 所代替; 其二是 A 环有强偶合的两个烯氢信号, δ 7.93 (1H, d, $J = 15.92$ Hz, H-7'), δ 6.47 (1H, d, $J = 16.00$ Hz, H-8'), 偶合常数较大, 为 $J = 16.00$ Hz, 表明存在反式双键结构; 其三是高场区 δ 3.0~5.3 出现一组质子信号, δ 3.04 (1H, dd, $J =$

14.38, 8.50 Hz, $H_{a-7''}$), δ 3.13 (1H, dd, $J = 14.38, 8.50$ Hz, $H_{b-7''}$), δ 5.24 (1H, dd, $J = 8.20, 4.24$ Hz, H-8''), 处在 C-7' 位的同碳氢偶合常数较大, 约为 $J = 14$ Hz; 处在 C-7' 位和 C-8' 位的邻位碳氢偶合常数较小, 约为 $J = 4, 8$ Hz。处在 C 环上的氢信号因为临近无共轭体系, 所以在低场区处于化学位移值最小, 根据苯环的 ABX 偶合关系, 应将 δ 6.65 (1H, dd, $J = 8.08, 1.88$ Hz) 归属为 H-6'', 6.71 (1H, d, $J = 7.08$ Hz) 应归属为 H-5'', 6.79 (1H, d, $J = 1.88$ Hz) 应归属为 H-2'', 6.88 (1H, d, $J = 8.16$ Hz) 应归属为 H-5', 7.38 (1H, d, $J = 2.20$ Hz) 应归属为 H-6'; 其他质子应归属苯环 A 上的芳氢。经与文献报道的 salvianolic acid C 的数据对照一致^[10], 证明该化合物为丹酚酸 C (salvianolic acid C)。

4 结论

丹酚酸 B 的热解产物主要为丹参素(1)、咖啡酸(2)、原儿茶醛(3)、紫草酸(4)、丹酚酸 A(6), 此外还含有少量的迷迭香酸(5)、丹酚酸 F 甲酯(7)、丹酚酸 C(8) 等酚酸类化合物, 这些化合物为建立含丹参药材的中药制剂品种且以丹酚酸 B 为指标的质量分析标准的建立提供了物质基础, 通过本研究希望对丹酚酸 B 的分离、保存及生物学研究提供一定的借鉴意义。其中咖啡酸、原儿茶醛、丹酚酸 A 3 个为生成量最大的产物, 丹参素收率为 2.6%, 原儿

茶醛收率为 2.1%, 丹酚酸 A 产率高达 3.9%, 以上结果表明对于丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A 量较低的酚酸类化合物提供了更有效的制备方案。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 何正显, 信玉琼. 丹参的化学成分及其临床应用探讨 [J]. 中华临床新医学, 2004, 4(4): 350-351.
- [3] 柳 丽, 张洪泉. 丹参活性成分的现代中药药理研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6): 1.
- [4] 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.
- [5] 朱 静, 陈慧清, 白 鹏, 等. 丹酚酸 B 水溶液分解反应的动力学研究 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 541-543.
- [6] 张文芯, 玄 律, 倪 健. 丹酚酸 B 在水溶液中的稳定性研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(12): 856-858.
- [7] 段营辉, 戴 毅, 高 昊, 等. 草珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 29-32.
- [8] Li L N, Tan R, Chen W M. Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Med*, 1984, 50: 227-228.
- [9] Dalla V, Cotellet P. The total synthesis of salvianolic acid F [J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(22): 6923-6930.
- [10] 李志刚, 顾 群, 金志刚, 等. 一种丹参丹酚酸 A 固体制剂及其制备方法 [P]. 中国专利: CN1994277A, 2007-7-11.