

丹参多酚酸提取物中异紫草酸的结构确定

田介峰^{1,2}, 李淑明^{2,3}, 罗学军^{1,2}, 李瑞明^{1,2}, 霍志鹏^{1,2}, 张 双⁴, 旷文静⁵, 何 毅^{1,2*}

1. 天士力医药集团股份有限公司 研究院现代中药开发中心, 天津 300410
2. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410
3. 天士力医药集团股份有限公司 研究院临床医学中心, 天津 300410
4. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016
5. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘 要: 目的 确定从丹参多酚酸提取物中分离得到的 1 个紫草酸同分异构体(异紫草酸)的结构。方法 利用质谱、核磁共振、化学转化以及 ECD 等方法确定其化学结构。结果 该化合物鉴定为 [(2*S*,3*S*)-4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-2*H*-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[(1*R*)-1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯] (异紫草酸)。结论 总结了紫草酸同分异构体核磁数据的规律, 进一步明确了异紫草酸的平面结构并首次确定了异紫草酸的立体结构。

关键词: 丹参多酚酸; 异紫草酸; 紫草酸; 化学结构; 立体结构

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2710-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.002

Structure elucidation of a lithospermic acid isomer from extract of salvia polyphenolic acids

TIAN Jie-feng^{1, 2}, LI Shu-ming^{2, 3}, LUO Xue-jun^{1, 2}, LI Rui-ming^{1, 2}, HUO Zhi-peng^{1, 2}, ZHANG Shuang⁴, KUANG Wen-jing⁵, HE Yi^{1, 2}

1. Development Center of Modern Chinese Medicine, Research Institute of Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
2. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
3. Clinical Medical Center, Research Institute of Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
5. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To determine the chemical structure of an isomer of lithospermic acid isolated from extract of salvia polyphenolic acids. **Methods** MS, NMR, Chemical conversion, and ECD were used to determine the chemical structure of the isolated lithospermic acid isomer. **Results** The isomer of lithospermic acid was elucidated to be (2*S*,3*S*)-4-[(1*E*)-2-carboxyethenyl]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-7-hydroxy-3-benzofuran-2-carboxylic acid 3-[(1*R*)-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]ester (isolithospermic acid). **Conclusion** The planer structure of isolithospermic acid is confirmed by the empirical rule summarized through the analysis of the lithospermic acid isomers' NMR data, and its stereochemical structure is determined for the first time.

Key words: salvia polyphenolic acid; isolithospermic acid; lithospermic acid; chemical structure; stereochemical structure

多酚酸类成分是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 中主要的药效成分, 研究表明其具有抗氧化、抗凝血、抗血栓、抗癌、抗 HIV、护肝、调节肾脏和心血管

系统功能等多种药理活性^[1-3]。注射用丹参多酚酸是以丹参多酚酸为主要成分的中药注射剂, 在前期对其中间体(丹参多酚酸提取物)的化学成分研究中,

收稿日期: 2022-11-27

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制项目“中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究”(2017ZX09301005)

作者简介: 田介峰(1987—), 男, 博士研究生, 研究方向为天然药物中活性物质研究。E-mail: tsl-tianjiefeng@tasly.com

*通信作者: 何 毅 E-mail: heyi@tasly.com

通过分离、纯化和结构鉴定对其中含量较大的酚酸类成分进行了研究^[3],随着研究的深入进行,在本实验中丹参多酚酸提取物中 1 个含量较低的多酚酸类化合物(化合物 1)被分离得到。化合物 1 通过一维核磁共振数据初步确定为 4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-2H-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯(异紫草酸)^[4],在对其化学结构进行二维核磁数据确证及立体结构研究时发现其 2 个羧基碳的化学位移值非常接近,导致关键的 HMBC 相关信号的分辨存在一定困难,且尚未有文献对其立体结构进行研究。目前普遍认为异紫草酸是丹酚酸 B 的降解或转化产物,多数文献只报道了其平面结构^[4-6],也有一些文献报道^[7-8]认为其立体结构与丹酚酸 B 一致,但是由于苯并二氢呋喃片段易发生差向异构化^[9-10],且近年来有学者发现丹参中存在少量丹酚酸 B 的同分异构体^[11],以及丹参素片段为 S 构型的多酚酸类化合物^[12-13],因此目前对异紫草酸平面及立体结构的报道都有存在错误的风险。鉴于此种情况,本课题组对化合物 1 的化学结构进行了深入研究,利用质谱、核磁共振、化学转化以及电子圆二色谱(electrostatic circular dichroism, ECD)的方法确定了其化学结构,将其鉴定为 (2*S*,3*S*)-4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-2H-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[(1*R*)-1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯(异紫草酸)。

1 仪器与材料

Bruker Avance 400 型核磁共振仪(德国布鲁克公司); Waters UPLC-Q-TOF/MS (Synapt G2) 液质联用仪(美国 Waters 公司); Buchi 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); 梅特勒 XS205DU 型电子天平(托利多仪器有限公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); CHIRALCEL OD-H 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大赛璐公司); LC 80 轴向加压制备色谱(法国 Novasep 公司); MCI-Gel 树脂(日本三菱公司); Sephadex LH20 凝胶(美国 GE 公司); ODS 填料(日本 YMC 公司); 薄层硅胶板(青岛海洋科技有限公司); 三氯化铁、甲酸(色谱纯)、三氟乙酸(色谱纯), 上海阿拉丁试剂公司; R-丹参素钠(批号 110855-201614, 质量分数 98.1%), 中国食品药品检定研究院; S-丹参素(批号 20161101, 质量分数 95.1%), 由天士力研究院化学药品开发中心提供; 乙腈(色谱纯)、无水乙醇(色谱纯)、正己烷(色谱纯), 天津市康科德科技有限

公司; 紫草酸(批号 20170225, 质量分数 98.6%)、monardic acid A(批号 20170221, 质量分数 98.1%), 天津药明康德新药开发有限公司; 丹参多酚酸提取物(生产批号 20131-101)由天津天士力之骄药业有限公司提供。

2 方法

2.1 提取与分离

取丹参多酚酸提取物 10 g, 用水溶解, 进行 MCI 柱色谱(10 cm×51 cm)分离, 用 10%乙醇水溶液洗脱, 体积流量 100 mL/min, 得到 4 个流分 F1~F4, 分别为 0.66、0.4、1.0、0.7 g。F2 用水溶解调节 pH 值为 3.0, 再次进行 MCI 柱色谱(10 cm×51 cm)分离, 用水洗脱, 体积流量 10 mL/min, 弃去洗脱液, 再用 95%乙醇洗脱, 体积流量 10 mL/min, 收集洗脱液浓缩至干。将上述样品用 50%乙醇溶解, 进行 Sephadex LH20 柱色谱(3 cm×50 cm)分离, 用 50%乙醇洗脱, 体积流量 10 mL/min, 分段收集后合并薄层板上喷 FeCl₃ 显色剂显蓝色斑点的流分。将合并后的流分浓缩至干, 用 23%乙腈水溶解, 加压制备液相纯化, 流动相为乙腈-水 23:77 (0.01%甲酸), 体积流量 200 mL/min, 得到化合物 1 (0.1 g)。

2.2 化合物 1 的水解及手性分析

取化合物 1 (2 mg) 溶于 4 mL 3 mol/L 的 HCl 溶液中, 搅拌, 60 °C 反应 8 h。反应液用 4 倍量水稀释后用等体积醋酸乙酯萃取 3 次, 将醋酸乙酯层减压浓缩至干, 用色谱甲醇复溶后进行液相分析, 并收集与丹参素保留时间相同的色谱峰的洗脱液, 减压浓缩后得到片段 II (片段 II 为紫草酸异构体结构中的丹参素片段)的浓缩液。将片段 II 的浓缩液、R 构型丹参素溶液、S 构型丹参素溶液分别进行手性分析。色谱条件: 色谱柱为 CHIRALCEL OD-H (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为含 0.5%三氟乙酸的 0.5%三氟乙酸的乙醇溶液(A)-含 0.5%三氟乙酸的乙醇溶液(B), 90%A 等度洗脱 35 min, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 30 °C。

3 结构鉴定

3.1 平面结构的确定

化合物 1: 三氯化铁显色呈阳性, 提示其为酚酸类化合物。HR-ESI-MS *m/z*: 537.105 4 [M-H]⁻ (计算值 537.103 3), 推测其分子式为 C₂₇H₂₂O₁₂ (计算值 538.111 1), 不饱和度为 17。¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄)、¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) 数据见表 1。

表 1 化合物 1 的核磁共振数据
Table 1 NMR data of compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		133.7, s	6'	7.15 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	122.0, d
2	6.75 (1H, overlapped)	113.3, d	7'	7.58 (1H, d, $J = 16.3$ Hz)	143.1, d
3		146.6, s	8'	6.18 (1H, d, $J = 16.3$ Hz)	117.8, d
4		146.7, s	9'		170.6, s
5	6.59 (1H, overlapped)	116.5, d	1''		129.0, s
6	6.63 (1H, overlapped)	118.3, d	2''	6.60 (1H, overlapped)	117.3, d
7	5.85 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	88.2, d	3''		146.0, s
8	4.32 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	57.8, d	4''		145.1, s
9		172.2, s	5''	6.74 (1H, overlapped)	116.4, d
1'		124.9, s	6''	6.37 (1H, dd, $J = 0.9, 8.2$ Hz)	121.8, d
2'		126.1, s	7''	2.90 (1H, dd, $J = 9.0, 13.9$ Hz), 3.03 (1H, dd, $J = 3.0, 13.9$ Hz)	37.5, t
3'		149.1, s	8''	5.13 (1H, dd, $J = 3.0, 9.0$ Hz)	75.6, d
4'		144.8, s	9''		172.5, s
5'	6.84 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	118.4, d			

化合物 1 的核磁数据和文献报道中^[4]化合物 4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-2H-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯的核磁数据一致, 提示其平面结构可能与该化合物一致。在利用二维核磁共振数据确证化合物 1 平面结

构的过程中发现 C-9 ($\delta_{\text{C}} 172.2$) 和 C-9'' ($\delta_{\text{C}} 172.5$) 2 个羰基碳的化学位移值非常接近, H-8'' ($\delta_{\text{H}} 5.13$) 与 C-9'' ($\delta_{\text{C}} 172.5$) 的 HMBC 相关清晰可见而与 C-9 ($\delta_{\text{C}} 172.2$) 的 HMBC 相关由于受到和 C-9'' ($\delta_{\text{C}} 172.5$) 的 HMBC 相关的影响, 分辨存在一定困难 (图 1)。

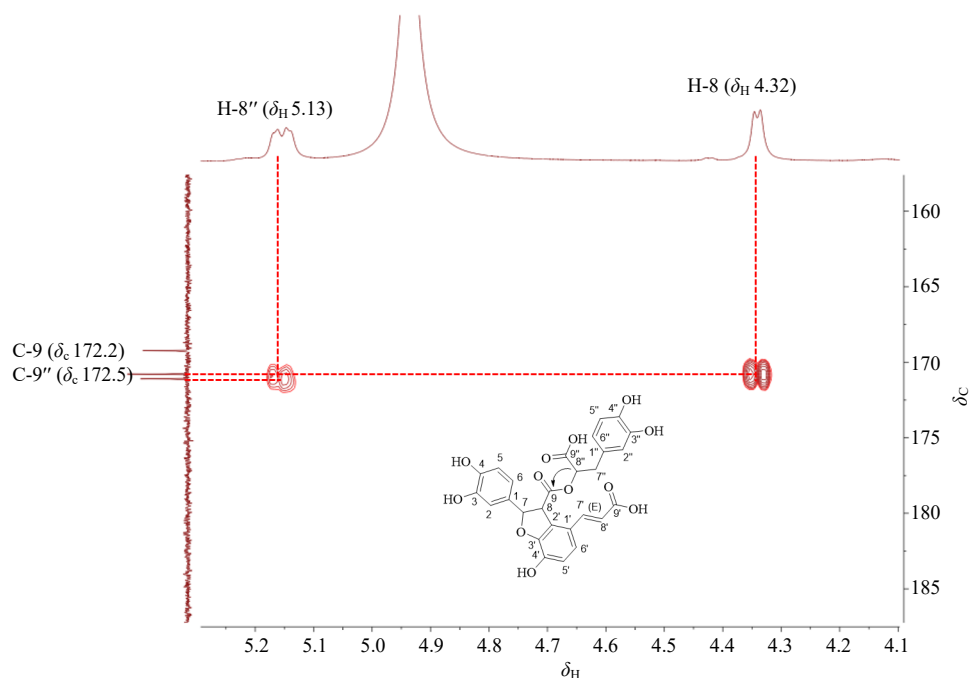


图 1 化合物 1 的关键 HMBC 相关

Fig. 1 Key HMBC correlation of compound 1

为了进一步确定化合物 **1** 的平面结构, 本课题组比较了紫草酸及其 4 个同分异构体的 ^{13}C -NMR 数据 (表 2), 其中, 紫草酸和 monardic acid A 为实测数据, monardic acid C^[10]、lithospermic acid C^[10]和化合物 **a** (4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-2*H*-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯)^[4]为文献报道数据, 发现紫草酸和 monardic acid A ^{13}C -NMR 数据一致, monardic acid C 和 lithospermic acid C ^{13}C -NMR 数据一致 (数据差别均在测量误差范围内), 这与常规的认识 (差向异构体核磁数据存在差异) 存在偏差。推测原因如下: 这些化合物在结构上可以看做由 2 个相对独立的结

构片段 I 和 II 构成 (片段 I 为紫草酸异构体结构中去掉丹参素片段后的其余部分, 片段 II 为紫草酸异构体结构中的丹参素片段) (图 2)。这 2 个片段相互影响较小。对于紫草酸和 monardic acid A 片段 I 是对映异构体, ^{13}C -NMR 数据一致, 片段 II 是相同结构, 也具有相同的 ^{13}C -NMR 数据, 因此紫草酸和 monardic acid A ^{13}C -NMR 数据完全一致。Monardic acid C 和 lithospermic acid C 的 ^{13}C -NMR 数据一致也是基于相同的原因。对于化合物 **1**, 如果片段 II (图 2) 和 C-9' 的羧基形成酯键, 其平面结构和紫草酸一致, 按照以上规律, 其 ^{13}C -NMR 数据一定与紫草酸、monardic acid A、monardic acid C、lithospermic acid C

表 2 紫草酸及其异构体的 ^{13}C -NMR 核磁共振数据
Table 2 ^{13}C -NMR data of lithospermic acid and its isomers

碳位	δ_{C}				
	紫草酸	monardic acid A	monardic acid C ^[10]	lithospermic acid C ^[10]	化合物 a ^[4]
1	134.1	133.7	129.3	129.4	133.9
2	113.8	113.5	115.1	115.1	113.4
3	147.0	146.6	146.1	146.0	146.7
4	146.3	146.7	146.5	146.5	146.9
5	116.7	116.4	115.9	115.9	116.6
6	118.5	118.3	119.6	119.6	118.4
7	89.2	88.8	88.4	88.4	88.3
8	58.0	57.5	55.2	55.4	58.0
9	175.7	175.1	173.6	173.8	172.3
1'	124.9	124.6	124.3	124.3	125.0
2'	128.0	127.6	129.3	129.4	126.3
3'	149.1	148.8	149.6	149.6	149.2
4'	145.5	145.2	145.3	145.2	145.0
5'	118.6	118.3	118.1	118.1	118.5
6'	122.0	121.7	122.6	122.7	122.1
7'	144.3	144.0	143.8	143.8	143.3
8'	116.7	116.4	116.4	116.4	117.9
9'	168.4	168.2	168.1	168.0	170.6
1''	129.7	129.3	129.3	129.3	129.1
2''	118.0	117.5	117.6	117.7	117.4
3''	146.9	146.1	146.0	146.0	146.2
4''	145.5	145.2	145.4	145.4	145.3
5''	116.7	116.3	116.5	116.7	116.6
6''	122.2	121.9	121.9	122.0	122.0
7''	38.2	37.9	37.9	38.0	37.7
8''	75.3	74.9	74.9	74.9	75.8
9''	174.0	173.4	173.3	173.5	172.3

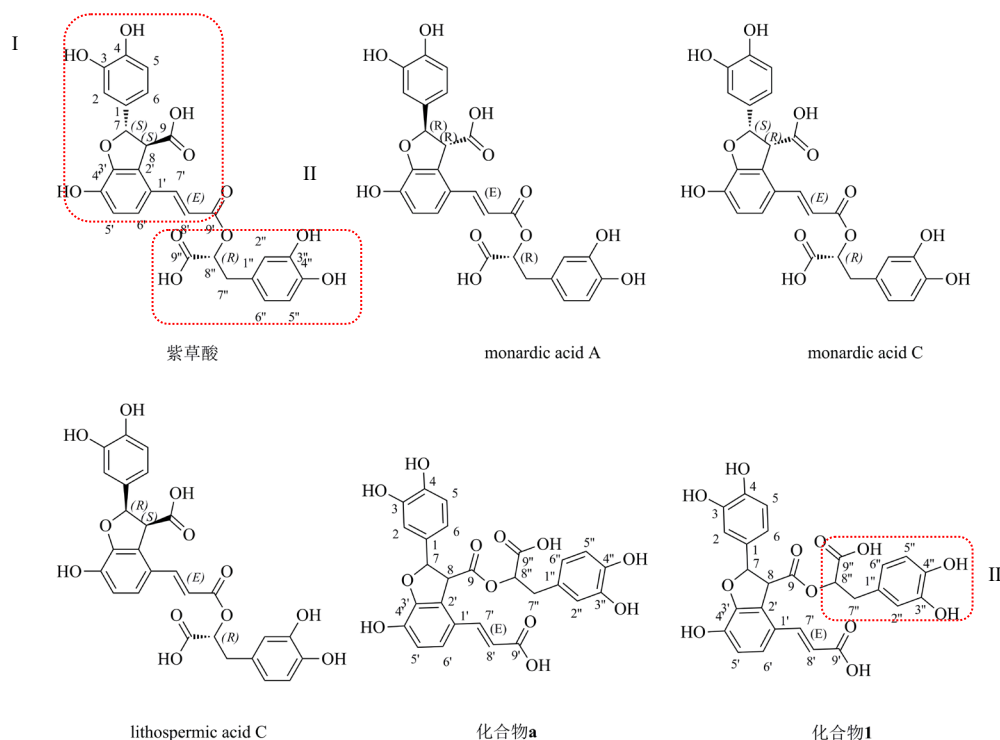


图2 紫草酸及其异构体的结构

Fig. 2 Structures of lithospermic acid and its isomers

中的一个完全一致,而事实上化合物1的 ^{13}C -NMR数据与4者的 ^{13}C -NMR数据都不一致,因此可以推断化合物1的结构片段II与C-9''的羧基形成酯键。综上所述确定了化合物1的平面结构(图2)。

3.2 立体结构的确定

3.2.1 C-7和C-8立体结构的确定 C-7和C-8的相对构型是通过H-7和H-8的耦合常数确定的。H-7和H-8的耦合常数为4.1 Hz,表明H-7和H-8为反式构型(7*S*,8*S*或者7*R*,8*R*)。C-7的绝对构型可以通过ECD图谱进行判断。异紫草酸的ECD图谱(图3)在250~260 nm处显示正的cotton效应,提示C-7为*S*构型。综上所述C-7和C-8立体构型确定为(7*S*,8*S*)^[10]。

3.2.2 C-8''立体结构的确定 C-8''立体结构是通过

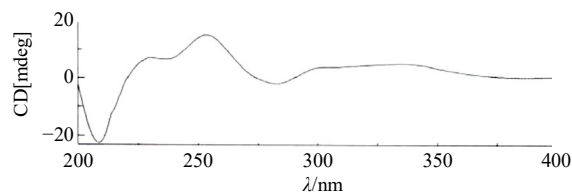


图3 化合物1的ECD图谱

Fig. 3 ECD spectrum of compound 1

水解反应以及手性分析确定的。通过比对片段II和*R*构型丹参素以及*S*构型丹参素在手性色谱柱上的保留时间(图4、5)将C-8''的立体构型确定为*R*^[14]。至此,化合物的结构鉴定为(2*S*,3*S*)-4-(2-羧基乙烯基)-2-(3,4-二羟基苯基)-2,3-二氢-7-羟基-3-苯并呋喃羧酸-3-[(1*R*)-1-羧基-2-(3,4-二羟基)乙基]酯。

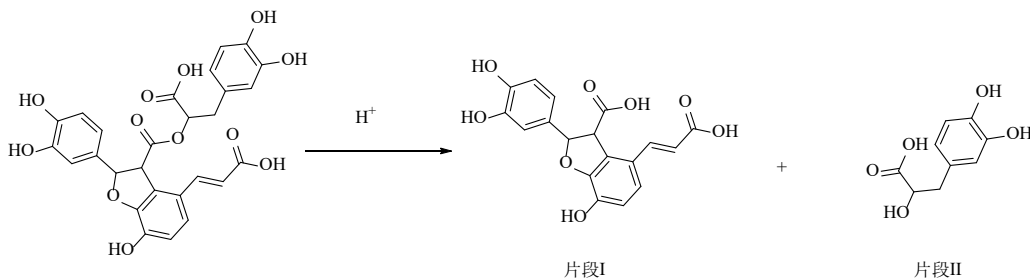


图4 异紫草酸的水解反应

Fig. 4 Hydrolysis reaction of isolithospermic acid

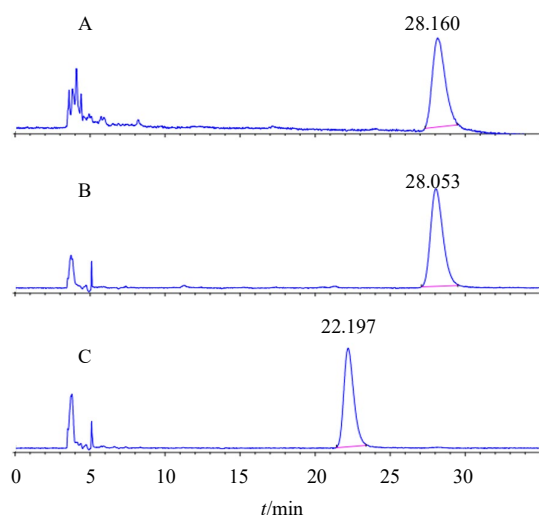


图 5 片断 II(A)、R 构型丹参素 (B)、S 构型丹参素 (C) 的手性分析图

Fig. 5 Chiral HPLC chromatogram of fragment II (A), R-salvianic acid A (B) and S-salvianic acid A (C)

4 讨论

丹参多酚酸提取物中主要成分为以丹参素为结构片段的多酚酸类化合物，其中存在大量同分异构体，且某些多酚酸类成分由于存在重复的结构片段（丹参素片段）导致其部分核磁信号重叠严重，对结构解析及核磁数据归属造成一定困难。通过对多酚酸同分异构体核磁共振数据的总结及分析从中发现规律，对结构存疑的及新的多酚酸类成分化学结构的解析具有一定意义。多酚酸类化合物的立体结构一般包括 2 个部分：苯骈二氢呋喃片段的立体结构及丹参素片段的立体结构。苯骈二氢呋喃片段的立体结构可以通过偶合常数及 ECD 的方法确定，丹参素片段的立体结构可以通过水解及手性分析的方法进行确定。本研究综合运用多种手段首次对异紫草酸的结构，特别是立体结构进行了深入研究，不仅确定了异紫草酸的化学结构也为具有类似结构的多酚酸类化学成分的结构解析提供了一种思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang X H, Morris-Natschke S L, Lee K H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(1): 133-148.
- [2] Lu Y L. Polyphenolics of *Salvia*—A review [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2): 117-140.

- [3] 田介峰, 阎红, 王瑞静, 等. 丹参多酚酸提取物化学成分分离与鉴定 [J]. *中草药*, 2018, 49(21): 5024-5028.
- [4] Lee H J, Cho J Y, Moon J H. Chemical conversions of salvianolic acid B by decoction in aqueous solution [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(7): 1196-1204.
- [5] Zeng G F, Xiao H B, Liu J X, et al. Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(3): 499-506.
- [6] Guo Y X, Xiu Z L, Zhang D J, et al. Kinetics and mechanism of degradation of lithospermic acid B in aqueous solution [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4): 1249-1255.
- [7] Kan S D, Lin H M, Li J A, et al. Biotransformation of salvianolic acid B by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and its two degradation routes [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(7): 885-888.
- [8] Kan S D, Chen Z Z, Shao L, et al. Transformation of salvianolic acid B to salvianolic acid a in aqueous solution and the *in vitro* liver protective effect of the main products [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(4): C499-C504.
- [9] Wada H, Kido T, Tanaka N, et al. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. LXXXI. characteristic lignans of blechnaceous ferns [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40: 2099-2101.
- [10] Murata T, Oyama K, Fujiyama M, et al. Diastereomers of lithospermic acid and lithospermic acid B from *Monarda fistulosa* and *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 51-59.
- [11] Gong J, Ju A C, Zhou D Z, et al. Salvianolic acid Y: A new protector of PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury from *Salvia officinalis* [J]. *Molecules*, 2015, 20(1): 683-692.
- [12] Si Y Y, Li N, Tong L, et al. Bioactive minor components of the total salvianolic acids injection prepared from *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(1): 82-86.
- [13] Zhang J Q, Jin Q H, Deng Y P, et al. New depsides from the roots of *Salvia miltiorrhiza* and their radical-scavenging capacity and protective effects against H₂O₂-induced H9c2 cells [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121: 46-52.
- [14] Li W, Zhou S P, Jin Y P, et al. Salvianolic acids T and U: A pair of atropisomeric trimeric caffeic acids derivatives from root of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98: 248-253.

[责任编辑 王文倩]