

丹参滴注液制备过程中酚酸类成分的变化研究

袁晓航¹, 葛婷婷², 程建明^{2*}

(1. 江苏省无锡市中医院药剂科, 江苏 无锡 214000; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究丹参滴注液在制备工艺过程中原儿茶醛和丹酚酸 B 等水溶性成分的变化规律, 为丹参滴注液质量标准的制定提供依据。方法 采用 RP-HPLC 乙腈-0.5% 冰醋酸系统梯度洗脱程序, 考察在加热、醇、酸碱等条件下水溶性成分的变化规律。结果 丹酚酸 B 减少, 丹参素钠和原儿茶醛增加。结论 在高温和酸碱条件下, 丹酚酸 B 被降解为丹参素钠和原儿茶醛。

关键词:丹参滴注液; 原儿茶醛; 丹酚酸 B; 酚酸类成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-5005(2011)02-0172-03

Componential Changing of Phenolic Acids in the Preparation of Danshen Dripping Solution

YUAN Xiao-hang¹, GE Ting-ting², CHENG Jian-ming^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuxi, 214000, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study changing regulation of protocatechuic aldehyde and salvianolic acid B in the preparation for Danshen Dripping Solution (DDS) and to provide reference for the drug's quality standard. **METHODS** Gradient separated method was applied. Mobile phase: acetonitrile-0.5% acetic acid, DDS was detected by HPLC to inspect the changing regulation of the water-soluble components in the conditions of heating, alcohol, and acid base. **RESULTS** The peak area of salvianolic acid B decrease, while the peak area of Danshensu sodium and protocatechuic aldehyde increased. **CONCLUSION** In the condition of high temperature and acid base, salvianolic acid B hydrolyzes into Danshensu sodium and protocatechuic aldehyde.

KEY WORDS: DDS; protocatechuic; salvianolic acid B; components of phenolic acids

丹参滴注液由丹参一味药研制而成, 主要成分为水溶性成分, 其制备过程是丹参药材经水煎、醇沉、酸碱处理的过程, 文献显示在此过程中酚酸性成分如丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 各自的含量有所变化^[1], 但未见丹参滴注液酚酸性成分在制备过程中变化规律的文献报道。

本文中酚酸类成分丹参素钠和原儿茶醛, 是治疗心血管系统疾病的主要成分^[2], 需对其进行质量控制, 我们采用 HPLC 进行丹参素钠、原儿茶醛和丹酚酸 B 的含量测定, 以每千克药材中所含丹参素钠、原儿茶醛和丹酚酸 B 的量为纵坐标, 考察在丹参滴注液制备过程中丹参素钠、原儿茶醛和丹酚酸 B 总量的变化规律, 为丹参滴注液制备工艺和质量控制研究提供理论依据, 现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 药材及中间体样品制备

丹参药材及各中间体(批号: 100429, 100430)均为安徽华源生物药业有限公司提供。丹参药材加水煎煮 3 次, 每次 2 h, 合并煎液(水提液), 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.16(70℃)的清膏(清膏 1), 加乙醇使含醇量达 75%, 搅匀, 冷藏 24 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至相对密度为 1.06~1.08(78℃)的清膏(清膏 2), 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 9, 加热煮沸 1 h(碱提取液), 用盐酸调节 pH 值至 6(酸提取液), 滤过, 放冷后, 加乙醇使醇含量达 85%, 搅匀, 冷藏 24 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至相对密度 1.11~1.13(78℃)的清膏(清膏 3)。加注射用水稀释 4 倍, 用盐酸调节 pH 值至 3, 冷藏 72 h, 滤过(水沉液)。以上处

收稿日期: 2010-12-02; 修稿日期: 2011-01-19

基金项目: 南京中医药大学校企合作项目(2009024)

作者简介: 袁晓航(1978-), 女, 江苏无锡人, 江苏省无锡市中医院主管药师。* 通信作者: cjm7895@163.com

理即得中间体样品。

1.2 对照品

丹参素钠对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号:110855-200809);原儿茶醛对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号:110810-200506);丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号:111562-200807)。

1.3 试剂

甲醇、乙腈、冰醋酸均为色谱纯,水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.4 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪,Agilent1100 四元泵,DAD 检测器,全自动进样器,Agilent1100 色谱工作站。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性

色谱条件:Hedera ODS-2 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);波长 λ = 281 nm;柱温:30 ℃;流动相:乙腈(A):0.5%(B)冰醋酸,时间程序为:0~20 min 5%的 A,20~60 min 15%~45%的 A;流速:1 mL/min;进样量:10 μL。在此条件下,样品分离较好。

表 1 各中间体样品总体积及药材总质量(L)

批号	药材/kg	水提液	清膏 1	清膏 2	碱提液	酸提液	清膏 3	水沉液
100429	320	6 600	300	350	350	350	110	400
100430	320	6 600	300	350	350	350	110	400

按表 2 取各样品相应的体积,用甲醇定容至 10 mL,摇匀,0.45 μm 的微孔滤膜滤过,收集续

表 2 各中间体样品取样量(mL)

批号	水提液	清膏 1	清膏 2	碱提液	酸提液	清膏 3	水沉液
100429	5	1	1	2	1	0.5	2
100430	5	1	1	2	1	0.5	2

2.4 线性关系的考察

称取丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 对照品储备液适量,精密稳定,采用倍比稀释法,用 50% 甲醇水制成系列浓度的溶液,分别吸取上述系列溶液各 10 μL 按上述色谱条件进行分析,测定峰面积。色谱图见图 2。以峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度(X)为横坐标,进行线性回归,结果表明 3 个被测化合物在各自标准曲线范围内线性关系良好,回归方程分别为丹参素钠:Y=6.124 4X-4.083 4,r=0.999 9;原儿茶醛:Y= 44.127 3X-

2.2 对照品溶液的制备

精密称取丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 标准品适量,加水制成分别含 40 μg/mL 丹参素钠、10 μg/mL 原儿茶醛、0.5 mg/mL 丹酚酸 B 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 丹参药材溶液制备

取丹参药材,粉碎,过 4 号筛,60 ℃烘干精密称定 3.0 g,加入适量水,超声 30 min 后,100 mL 容量瓶定容,摇匀,过滤,取续滤液 5 mL,用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液进样,见图 1。

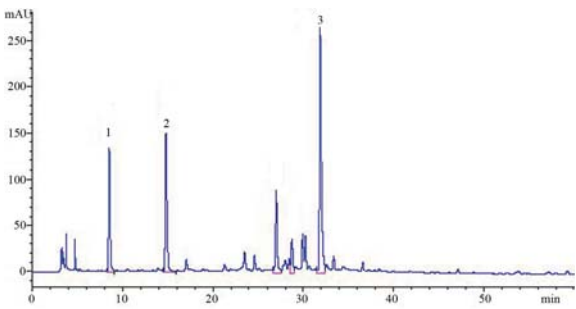


图 1 丹参滴注液水煎液样品色谱图

2.3.2 中间体溶液的制备

各中间体样品总体积及药材总质量见表 1。

滤液,作为丹参滴注液中间产品的供试品溶液。

6.850 6,r=0.999 9;丹酚酸 B:Y=5.532 4X + 1.204 2,r=0.999 9;丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 的线性范围分别为 446.0~27.88,100.8~6.30,220.1~12.51,100.2~6.26 μg/mL。

2.5 精密度实验

取同一供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别 0.36%,0.24%,0.74%。稳定性实验:取同一供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样分析,丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 峰面积的

RSD 分别为 0.73%, 0.42%, 1.74%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 重复性实验

取同一批样品液 6 份, 制备得供试品溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定, 测得丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 的平均含量分别为 2.107 mg/mL ($RSD = 1.18\%$), 0.541 mg/mL ($RSD = 1.89\%$), 0.282 mg/mL ($RSD = 1.14\%$)。

2.7 回收率实验

精密量取已知含量的样品液 9 份, 每份 0.5 mL, 3 份为一组, 分别按相当于制剂含量的 80%, 100%, 120%, 精密加入上述 3 个对照品储备溶液, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进行分析测定, 计算回收率。丹参素钠的平均回收率为 99.8% ($RSD = 2.15\%$); 原儿茶醛的平均回收率为 100.6% ($RSD = 2.38\%$); 丹酚酸 B 的平均回收率为 1.98% ($RSD = 1.54\%$)。

2.8 样品测定结果

根据标准品与样品色谱图确定丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 的保留时间(标准品图见图 1, 样品图见图 2), 根据标准品和样品的峰面积计算丹参滴注液在制备的各个步骤中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B 的总量(g), 结果见表 3。

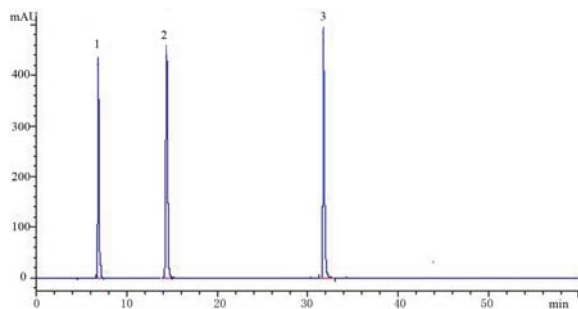


图 2 对照品色谱图

1. 丹参素钠; 2. 原儿茶醛; 3. 丹酚酸 B

表 3 含量测定结果(g)

样品名称	丹参素钠	原儿茶醛	丹酚酸 B
药材	555.81	9.83	16 587.22
水提液	4 199.10	626.11	7 899.87
清膏 1	2 997.84	488.25	3 650.35
清膏 2	4 527.54	680.48	6 276.21
碱提液	3 097.57	266.27	2 250.76
酸提液	8 222.65	1 463.82	2 047.20
清膏 3	4 249.90	631.81	1 273.90
水沉液	4 228.00	737.33	1 143.66

3 讨论

从检测结果看, 原药材的甲醇超声提取检测到丹参素占总量的 1.8%, 原儿茶醛只有 0.2%, 在经煎煮以后, 丹参素钠增加到 14.0%, 原儿茶醛增加到 12.8%, 但是丹酚酸 B 却相反, 原药材的甲醇超声提取检测到丹酚酸 B 占总量的 42.4%, 在经煎煮以后而丹酚酸 B 减少至 20.2%。从分子结构上看, 丹酚酸 B 是由两分子丹参素和一个分子咖啡酸二聚体以酯键缩合而成的低聚物, 在水溶液中不稳定, 丹酚酸 B 是通过酯水解和苯并呋喃环开环反应进行降解。总的来说, 丹酚酸 B 主要反应位点有 3 处, 分别是 2 个酯键与 1 个呋喃环; 主要反应类型是呋喃环开环和酯水解。由此可以推测丹参药材含游离的丹参素和原儿茶醛很少, 经煎煮后丹酚酸 B 降解为丹参素钠和原儿茶醛。

丹参素钠和原儿茶醛的变化趋势很相似, 只是丹参素钠的含量相比原儿茶醛的含量较大, 因此两者可以合在一起讨论, 由于二者受热皆不稳定, 因此在浓缩成清膏 1 后, 成分含量有所下降; 在调节 pH 至 9 时, 由于两者的酚羟基离子化, 两者含量增多; 在加了 85% 乙醇后除去杂质浓缩至清膏 3, 在除杂质的过程中, 有效成分也有一部分损失; 在水沉的过程中, 两者含量几乎不变。由此可以看出, pH 在丹参滴注液的制备过程中影响很大, 因此在生产过程中尤其要注意 pH 的调节。

此次研究可以说明丹酚酸 B 在高温、碱性条件下水解为丹参素钠与原儿茶醛, 但不能说明, 丹参素钠与原儿茶醛全部由丹酚酸 B 水解而来, 丹参滴注液中其他成分在相应条件下是否水解为丹参素钠和原儿茶醛, 丹酚酸 B 在相应条件下是否降解为其他物质, 有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1]徐德然, 王康才, 王峥涛, 等. 丹参中丹参素、原儿茶醛来源的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 148.
- [2]周欣, 王道平, 梁光义, 等. 丹参药材水溶性成分的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 色谱, 2005, 23(3): 292.

(编辑: 李伟东)