

丹参中酚酸类成分在不同工艺条件下转化关系

彭九嫚, 柴尧, 潘旻, 陈丽叶, 郑云枫, 程建明*
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] 目的:研究提取时间、碱处理、转化时间等因素对丹参中酚酸类成分水解转化规律影响。方法:采用高效液相色谱法,分别考察了丹参饮片在不同加热时间、pH 及反应时间下的丹参酚酸类成分峰面积变化规律。结果:在加热的 6 h 内,丹酚酸 B 在受热 30 min 峰面积最大,随后丹酚酸 B 开始发生降解,丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A 是终产物。丹酚酸 A 进一步在碱性条件下又发生降解,生成丹酚酸 C 和异丹酚酸 C 一对同分异构体。结论:揭示了丹参在受热、pH 条件下中丹酚酸类成分的转化规律,为丹参在中药制剂生产和临床应用中提供理论基础。

[关键词] 丹参; 丹参素; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A; 转化关系

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0067-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050067

Transformation Relationship of Salvianolic Acids in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* Under Heating, pH Conditions

PENG Jiu-man, CHAI Yao, PAN Min, CHEN Li-ye, ZHENG Yun-feng, CHENG Jian-ming*
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regularity of extraction time, pH of the phenolic acids in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. **Method:** Respectively investigates the *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* at different heating time, pH, and the reaction time of phenolic acids peak area change rule by High-performance liquid chromatography. **Result:** The content of salvianolic acid B was increasing and reached the maximum at 30 min, but it decreased from 1 to 6 h. Tanshinol, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid A is the final product. Salvianolic acid A could be converted into Salvianolic acid C and iso-salvianolic acid C by alkaline hydrolysis. **Conclusion:** Reveals transformation of phenolic acids under heating, pH conditions, providing theoretical support in future Chinese medicine production and clinical applications of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*.

[Key words] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; tanshinol; salvianolic acid B; salvianolic acid A; conversion

丹参在临床上广泛用于治疗心血管系统疾病,其主要活性成分为水溶性酚酸类,具有抗心肌缺血、中枢神经保护、抗氧化等药理作用^[1]。目前临床使用较多的丹参注射液、丹参滴注液等制剂的有效成分皆为丹参中水溶性酚酸,但在该类制剂的生产过程中,药材的提取、浓缩、醇沉液调碱等因素都对丹酚酸类成分有一定的影响^[2-5]。本实验旨在研究不

同提取时间、pH 以及反应时间等的因素对丹参水溶性酚酸转化的影响。

1 材料

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters), BT 125D 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), STP FA2004 型电子分析天平(上海上平仪器有限公司), PB-10 型酸度计(北京赛多利

[收稿日期] 20150722(008)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(13KJD360004)

[第一作者] 彭九嫚,在读硕士,从事中药新剂型、新技术及其产品研发, Tel:15251870314, E-mail:pengjiuman188@163.com

[通讯作者] *程建明,博士,研究员,从事中药新剂型、新技术及其产品研发, E-mail:cjm7895@163.com

斯仪器系统有限公司), Unique-s15 型超纯水仪(厦门锐思捷科学仪器有限公司)。

对照品丹参素钠(南京广润生物有限公司,批号 GR-133-140525), 原儿茶醛、迷迭香酸(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110810-201007, 111871-201404), 紫草酸(南京泽朗医药有限公司,批号 ZL15090812056), 丹酚酸 A、丹酚酸 B(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 RF0228FD14, Y04A6H2126)。丹参药材购于安徽协和成药业饮片有限公司(批号 14082901), 经南京中医药大学吴启南教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 的干燥根和根茎。乙腈、冰乙酸为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

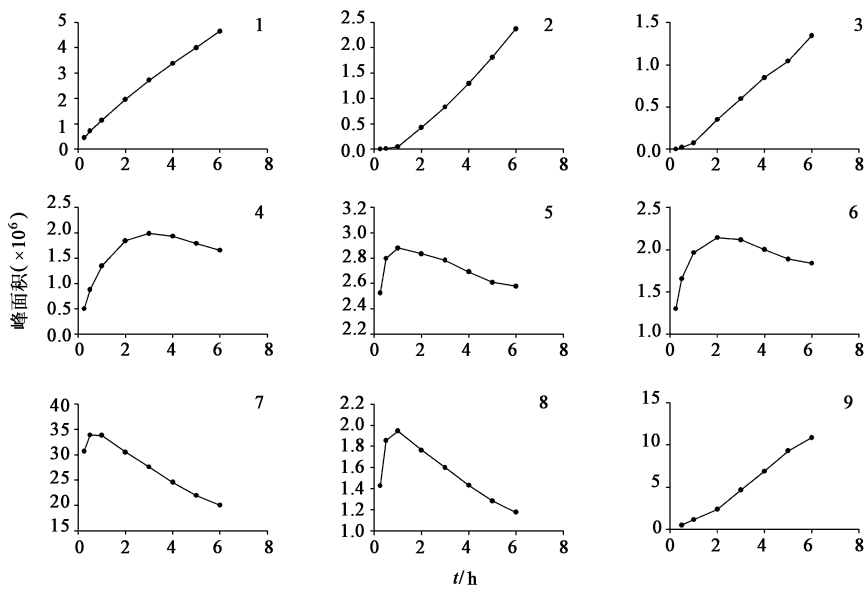
2.1 色谱条件 Waters xbridge 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 流动相乙腈(A)-

1% 冰乙酸(B) 梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% ~ 15% B; 20 ~ 60 min, 15% ~ 27% B; 60 ~ 61 min, 27% ~ 35% B; 61 ~ 65 min, 35% B; 65 ~ 68 min, 35% ~ 65% B; 68 ~ 75 min, 65% B)。

质谱条件为 ESI 离子源, 毛细管电压 15 V, 毛细管温度 300 °C, 负离子检测模式, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 2 000。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称定丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 对照品适量, 加 50% 甲醇制各含约为 0.2 g · L⁻¹ 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.3 不同提取时间对丹参酚酸类主要成分变化的影响 称取丹参药材约 50 g, 加 12 倍量水, 加热回流提取 6 h, 分别于 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 取样, 即得不同提取时间样品溶液。取完样后向提取液中加入取出液同体积的水, 补足失重, 以保持溶液的体积不变。结果见图 1。



1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 物质 3; 4. 物质 4; 5. 迷迭香酸; 6. 紫草酸; 7. 丹酚酸 B; 8. 物质 8; 9. 丹酚酸 A

图 1 丹参中各类酚酸类化合物在加热温度为 100 °C 变化趋势

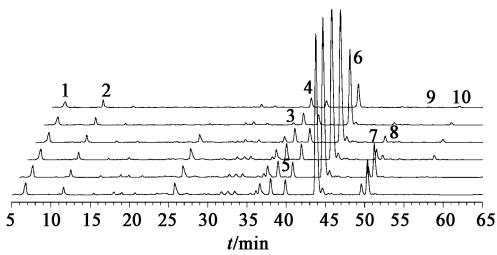
Fig. 1 Changed trend of salvanolic acids in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* under heating temperature of 100 °C

当提取时间 > 0.5 h 丹酚酸 B 峰面积开始下降, 此时丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A 的峰面积都在增加, 然而物质 4 和迷迭香酸、紫草酸、物质 8 峰面积总体上呈现先升高后下降的趋势。在整个提取过程中, 丹参素、原儿茶醛、物质 3 和丹酚酸 A 峰面积一直在增加。由此可以推测丹酚酸 B 在受热过程中发生分解, 可能转化为丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A, 且丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A 是各成分转化的终产物。

2.4 不同 pH 对丹参酚酸类主要成分变化的影响

取丹参 6 h 提取液滤过, 滤液减压浓缩(60 °C), 加乙醇使含醇量达 75%, 醇沉液用 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠分别调节 pH 至 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 反应 2 h 后, 进样测定。见图 2 ~ 4。

丹参中各酚酸类成分除了物质 9 和物质 10 外, 其他的酚酸类成分如丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的峰面积皆随着溶液碱性的增强, 峰面积在下降。原儿茶醛的下降趋势不



1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 物质 4; 4. 迷迭香酸; 5. 紫草酸; 6. 丹酚酸 B; 7. 物质 8; 8. 丹酚酸 A; 9. 物质 9; 10. 物质 10

图 2 丹参水提醇沉上清液调 pH 7~12 的 HPLC
Fig. 2 HPLC of Water extract-alcohol precipitation *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* that supernatant fluid pH 7-12

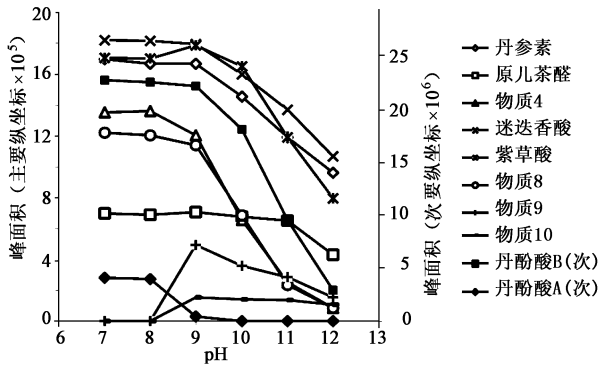
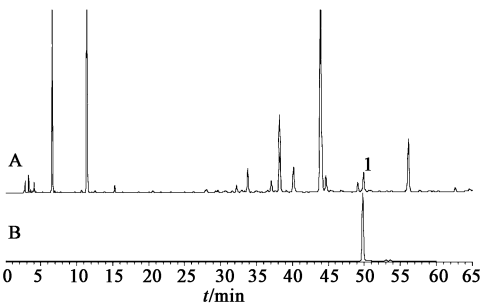


图 3 丹参中各酚酸类成分在 pH 7~12 峰面积变化趋势
Fig. 3 Changed trend of phenolic acids in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in pH 7~12 peak area



A. 丹参醇沉上清液调节 pH8; B. 对照品; 1. 丹酚酸 A
图 4 丹酚酸 A 水解后 HPLC
Fig. 4 Chromatogram of salvianolic acid A before and after hydrolysis

显著但丹酚酸 B、丹酚酸 A 的峰面积下降趋势最明显。其中物质 9 和物质 10 是伴随着丹酚酸 A 的消失而产生。当 pH 为 13 时,丹参中各酚酸类成分除了原儿茶醛峰外,其他成分都不见。丹酚酸 A 在碱性条件下转化为物质 9 和物质 10,且各酚酸类成分可能转化为原儿茶醛。

2.5 调碱反应时间对酚酸类成分影响 取丹参 6 h 提取液滤过,滤液减压浓缩(60℃),加乙醇使含醇

量达 75%,醇沉液用氢氧化钠调节 pH 至 8,分别于反应时间为 2,4,6,8,10,12,24 h 取样,进 HPLC 测定。结果见图 5。

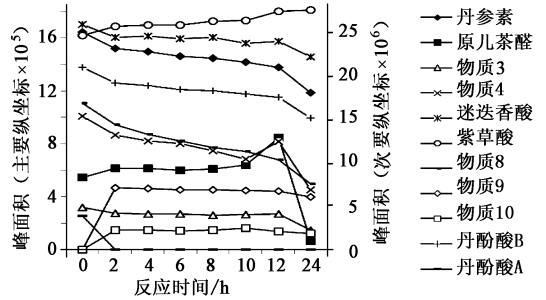
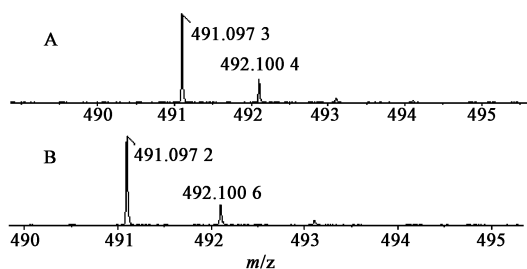


图 5 丹参中各酚酸类成分调碱反应时间 24 h 内变化趋势
Fig. 5 Changed trend chart of phenolic acids in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* under alkaline condition in 24 h

在反应时间 24 h 内,原儿茶醛的峰面积一直在上升且在反应时间 12 h 峰面积达到最大,但在反应时间 24 h 峰面积下降较明显。紫草酸的峰面积一直在上升且在反应时间 24 h 时达到最大。其余的各酚酸类成分中,丹酚酸 A 的峰面积下降最明显,在反应时间 2 h 时,丹酚酸 A 开始消失了,与此同时新的生成物物质 9 和物质 10 峰面积开始上升并于反应时间 24 h 时峰面积下降。

3 讨论

丹参水提液中的主要活性成分是水溶性酚酸,其中丹酚酸 B 含量远远高于其他成分。丹酚酸 B 不稳定,在受热和碱处理条件下出现不同程度的降解。在加热 6 h 过程中各酚酸类成分之间互相转化。主要表现为丹酚酸 B 峰面积显著下降,丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A 的峰面积一直在上升且丹酚酸 A 是紫草酸和丹酚酸 B 的共同降解产物,与文献[6-7]报道一致。酚酸类成分在一定的 pH 范围内稳定,溶液调碱对其存在的状态会有所影响。实验结果表明,丹酚酸类成分对碱敏感,峰面积皆呈现一定程度下降,但丹酚酸 A 在碱处理后表现出对碱较强的敏感性。且生成了新的产物。对丹酚酸 A 加碱样品,进行质谱分析,对负离子碎片离子峰采集,结果如图 6,得知产物的相对分子质量为 491.09。推测新的生成物主要为异丹酚酸 C 和丹酚酸 C 和这一对同分异构体。丹酚酸类成分的结构母核相同,在碱性条件下,丹酚酸 A 发生环合反应可生成异丹酚酸 C 和丹酚酸 C。丹酚酸 A 在该反应条件下的产物与在加热条件下的产物相似^[8]。对于本研究丹酚酸 A 在加热过程中并未发生降解,最主要的原因是丹参酚酸类成分是天然的



A. 物质 9; B. 物质 10

图 6 丹酚酸 A 碱处理后产物的质谱图谱

Fig. 6 Mass spectrum of product of salvianolic acid A after alkali treatment

稳定剂,一定程度有利于化合物稳定。

在丹参制剂的生产过程中,提取工艺常用水提醇沉法。本实验还考查了不同醇沉浓度对酚酸类成分的影响,实验结果表明,浓缩原液中的各类丹酚酸类化学成分和醇沉液相比,除了原儿茶醛以外,浓缩液中各酚酸的峰面积最大,随着醇沉浓度的不断增加,丹参素,物质 3,紫草酸,物质 4,迷迭香酸,丹酚酸 B,物质 10,物质 8 和丹酚酸 A 的峰面积都逐渐减小,而原儿茶醛随着醇沉浓度的增加略有上升的趋势。原儿茶醛在水和醇中的峰面积相差较大,且醇浓度越大其峰面积也越大。可能在醇沉过程中,有其他酚酸类成分转变成原儿茶醛,或者是醇沉该步骤改变了原儿茶醛存在状态。这其中的原因尚待进一步研究。

丹酚酸类成分治疗脑血管方面疾病主要物质基础^[9-10],尤以丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A 效果明显。但在丹参药材中,丹酚酸 A 的含量非常低,丹参素和原儿茶醛不是丹参药材固有成分,而是在受热过程中逐渐产生^[11]。故丹参中各酚酸类的相互转化就显得尤为重要。

[参考文献]

[1] 刘梅,夏鑫华,张志敏,等. 丹参素,原儿茶醛,咖啡酸和丹酚酸 B 体外抗氧化活性比较研究[J]. 中药材, 2009,32(2):265-267.

[2] 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):541-544.

[3] 李耿,于长安,李振坤,等. 丹参煎煮化学成分溶出规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8): 46-49.

[4] 俞翔,莫必琪,王治,等. 丹参醇沉过程中丹参素、丹 酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率预测研究[J]. 中草药, 2010,41(6):900-903.

[5] 倪力军,史晓浩,高秀蛟,等. 提取时间、溶剂对丹参 提取物质量的影响研究[J]. 中成药,2003,25(10): 780-782.

[6] 王颖,朱靖博,付绍平,等. 高温高压下丹酚酸 B,紫 草酸水溶液化学变化的研究[J]. 中国中药杂志, 2011,36(4):434-438.

[7] 张春光,崔翰明,张秋燕,等. 丹参提取物中的丹酚酸 B 在不同 pH 条件下的稳定性研究[J]. 中国实验方 剂学杂志,2009,15(1):3-5.

[8] Xu J Z, Zeng S S, Chen X Y, et al. Isolation and identification of degradation products of salvianolic acid A by NMR and LC-MS[J]. Fitoterapia, 2011, 82(2): 260-262.

[9] 杜先华,向虎,于龙顺,等. 丹参对 H₂O₂ 诱导的大鼠 血管平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 中药材,2004,27 (9):659-661.

[10] Fan H Y, Fu F H, Yang M Y, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. Thromb Res, 2010, 126(1):17-22.

[11] 徐德然,王康才,王峰涛,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): 148-150.

[责任编辑 顾雪竹]