

· 工艺与制剂 ·

注射用丹参多酚酸中主要成分的降解动力学分析

张慧杰,任晓亮*,崔明磊,蒲位凌,马思萌,戚爱棣

(天津中医药大学中药学院,天津 300193)

[摘要] **目的:**探索注射用丹参多酚酸中主要活性成分(丹酚酸 B 和迷迭香酸)在不同 pH 和温度下的降解规律。**方法:**采用 HPLC 测定迷迭香酸、丹酚酸 B 含量,研究二者在不同 pH(1~13)和温度(60,70,80,90 ℃)下含量变化,通过化学动力学法计算降解动力学参数。**结果:**丹酚酸 B 与迷迭香酸在不同 pH 和温度下降解反应均属于一级动力学反应,降解速率随 pH 及温度的升高而增加。丹酚酸 B 和迷迭香酸在水溶液中的降解活化能(E_a)分别为 48.54,49.83 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,在注射用丹参多酚酸中则分别为 95.19,83.56 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。**结论:**丹酚酸 B 与迷迭香酸在碱性条件及高温条件下易降解,与对照品相比较,二者在注射用丹参多酚酸中更为稳定。

[关键词] 丹酚酸 B; 迷迭香酸; 注射用丹参多酚酸; 降解动力学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0001-05

[doi] 10.11653/syjf2013140001

Degradation Kinetics Analysis of Main Ingredients in Salvianolate Lyophilized Injection

ZHANG Hui-jie, REN Xiao-liang*, CUI Ming-lei, PU Wei-ling, MA Si-meng, QI Ai-di

(School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate degradation kinetics of main ingredients (salvianolic acid B and rosmarinic acid) of salvianolate lyophilized injection under different pH and temperatures. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of salvianolic acid B and rosmarinic acid at different pH values and temperatures, degradation kinetic parameters of these two ingredients were evaluated by chemical kinetics. **Result:** Reaction of salvianolic acid B and rosmarinic acid at different pH values and temperatures were accord with the first-order kinetics, degradation rate accelerated by increasing of pH value and temperature. According to arrhenius equation, activation energy (E_a) of salvianolic acid B in aqueous solution and salvianolate lyophilized injection were 48.54, 95.19 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. E_a of rosmarinic acid in aqueous solution and salvianolate lyophilized injection were 49.83, 83.56 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Salvianolic acid B and rosmarinic acid were sensitive to strong alkaline and high temperature conditions, but salvianolate lyophilized injection could obviously improve their stability.

[Key words] salvianolic acid B; rosmarinic acid; salvianolate lyophilized injection; degradation kinetics

[收稿日期] 20121129(009)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81102732);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20111210110010)

[第一作者] 张慧杰,硕士,从事药物分析研究, Tel: 13820559197, E-mail: jyhuijie@163.com

[通讯作者] *任晓亮,博士,讲师,从事药物分析研究, Tel: 022-59596221, E-mail: xiaoliang-ren@sina.com

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎^[1],具有活血祛瘀、通经止痛等功效^[2],临床用于治疗因血瘀引起的冠心病、脑血栓等。研究表明,丹参的水溶性成分具有抗血栓、改善血液循环、保护心肌缺血缺氧、促进组织修复等药理活性^[3-5]。注射用丹参多酚酸是以丹参中水溶性酚

酸类成分为活性物质基础的一种临床常用制剂,主要活性成分包括丹酚酸 B、迷迭香酸等^[6-9]。本实验利用恒温加速法,以化学动力学为理论基础^[10-12],通过测定注射用丹参多酚酸中主要活性成分丹酚酸 B 及迷迭香酸在不同 pH 及温度下含量的变化,研究 pH 和温度对稳定性的影响,为丹酚酸 B、迷迭香酸及注射用丹参多酚酸的贮藏及使用提供实验依据。

1 材料

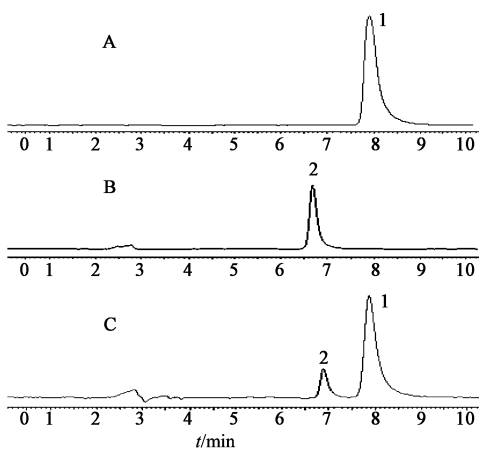
Waters 600E-2487 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),AX205 型分析天平和 DELTA 320 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司),XW-80A 型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

丹酚酸 B 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111562-200908),迷迭香酸对照品(天津中新药业研究中心,纯度 $\geq 98\%$),不同批次的注射用丹参多酚酸(冻干,天津天士力天之骄药业有限公司,批号 20100302),乙腈、甲酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Waters Symmetry Shield™ RP18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.5% 甲酸溶液(30:70),流速 1 mL·min⁻¹,柱温室温,检测波长 286 nm,进样量 10 μL,见图 1。



A, B. 对照品; C. 供试品; 1. 丹酚酸 B; 2. 迷迭香酸

图 1 注射用丹参多酚酸 HPLC

2.1.2 线性关系的考察 精密称取丹酚酸 B、迷迭香酸对照品 1.51, 1.22 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释,得 151, 100.67, 50.33, 25.17, 10.07, 5.03 mg·L⁻¹ 的丹酚酸 B 对照品溶液和 122, 81.33, 40.67, 20.33, 8.13, 4.07 mg·L⁻¹ 的迷迭香酸对照品溶液。分别吸取 10 μL 进样,记录色谱峰面

积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y_{\text{丹酚酸 B}} = 22\ 355X + 7\ 601.5$ ($r = 0.999\ 9$), $Y_{\text{迷迭香酸}} = 18\ 038X + 1\ 528$ ($r = 0.999\ 9$),表明丹酚酸 B、迷迭香酸分别在 5.03 ~ 151, 4.07 ~ 122 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.3 精密度考察 取 2.1.2 项下 25.17 mg·L⁻¹ 丹酚酸 B 溶液及 20.33 mg·L⁻¹ 迷迭香酸溶液,分别重复进样 6 次,结果丹酚酸 B 和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.74%, 0.96%,表明仪器精密度良好。

2.2 溶液的配制

2.2.1 缓冲溶液 取适量磷酸二氢钠、氢氧化钠配制 pH 1 ~ 13 的系列缓冲溶液。

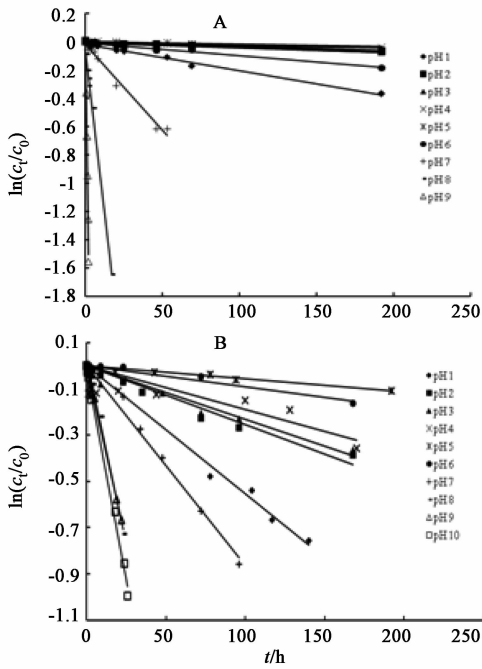
2.2.2 对照品储备液 将 10 mL 棕色量瓶灭菌,分别精密称取丹酚酸 B、迷迭香酸适量置于量瓶中,配制丹酚酸 B (0.301 g·L⁻¹) 和迷迭香酸 (0.241 g·L⁻¹) 的对照品储备液。

2.2.3 注射用丹参多酚酸储备液 精密称取注射用丹参多酚酸冻干粉适量,置于灭菌的 10 mL 棕色量瓶中,混匀,配制成 0.501 g·L⁻¹ 的注射用丹参多酚酸储备液。

2.3 丹酚酸 B 对照品水溶液不同条件下降解动力学研究

2.3.1 pH 精密量取丹酚酸 B 对照品储备液 500 μL,分别置于 5 mL 灭菌量瓶中,分别加入不同 pH 的缓冲溶剂稀释至刻度,涡旋混匀,得样品溶液,采用 HPLC 测定丹酚酸 B 初始浓度(c_0)。将各样品溶液于室温条件下放置,间隔一定时间取样,测定溶液中丹酚酸 B 的残余浓度(c_t),以 $\ln(c_t/c_0)$ 为纵坐标, t 为横坐标,降解曲线见图 2A。将测定结果进行拟合,显示丹酚酸 B 的降解过程符合一级动力学,相关动力学方程、线性相关系数(r)及降解速率常数(k)见表 1。pH 与 k 值的关系见图 3A(丹酚酸 B 在 pH 9.87, 11.06, 12.02, 12.88 的缓冲溶液中迅速降解,因此未在图表中列出),表明丹酚酸 B 降解的整体趋势是随溶液碱性的增加,降解速率加快。

2.3.2 温度 精密量取丹酚酸 B 对照品储备液 500 μL,置于 5 mL 灭菌量瓶中,加 pH 7.27 的超纯水定容至刻度,涡旋混匀,得样品溶液,测定 c_0 。将样品溶液密封,分别置于 60, 70, 80, 90 °C 的恒温水浴锅中,间隔一定时间取样,测定 c_t 。以 $\ln(c_t/c_0)$ 对 t 作图,见图 4A。拟合测定结果发现,丹酚酸 B 在 60, 70, 80, 90 °C 下的降解过程均符合一级动力学,其动力学方程、线性相关系数、降解速率常数及温度系数(Q_{10})见表 2。根据阿伦尼乌斯方程 [$k = A \exp$



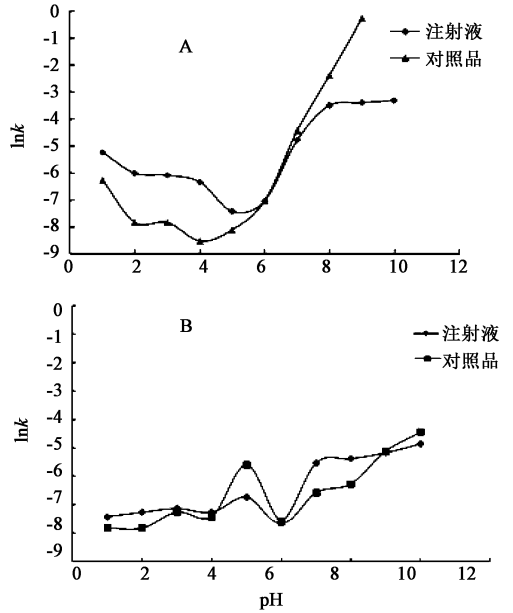
A. 对照品水溶液;B. 注射用丹参总酚酸

图2 丹酚酸 B 在不同 pH 缓冲溶液中降解曲线

表1 丹酚酸 B 和迷迭香酸在不同 pH 缓冲溶液中降解参数

成分	pH	对照品水溶液			注射用丹参多酚酸		
		r	k	t _{1/2} /d	r	k	t _{1/2} /d
丹酚酸 B	0.99	0.994 0	0.001 9	365	0.994 5	0.005 4	128
	2.05	0.994 0	0.000 4	1 733	0.987 4	0.002 5	277
	2.96	0.997 0	0.000 4	1 733	0.985 9	0.002 3	301
	4.06	0.980 3	0.000 2	3 465	0.940 7	0.001 8	385
	5.09	0.992 0	0.000 3	2 310	0.991 0	0.000 6	1 155
	6.01	0.985 9	0.000 9	770	0.975 2	0.000 9	770
	6.94	0.991 5	0.012 1	57	0.996 5	0.008 6	81
	8.01	0.996 0	0.093 3	7	0.995 5	0.030 4	23
	9.06	0.996 4	0.769 9	1	0.996 5	0.033 6	21
	9.87	-	-	-	0.997 5	0.036 8	19
迷迭香酸	0.99	0.995 3	0.000 6	1 155	0.993 2	0.000 4	1 733
	2.05	0.988 8	0.000 7	990	0.994 8	0.000 4	1 733
	2.96	0.995 3	0.000 8	866	0.997 3	0.000 7	990
	4.06	0.998 4	0.000 7	990	0.992 9	0.000 6	1 155
	5.09	0.992 8	0.001 2	578	0.993 0	0.003 7	187
	6.01	0.995 3	0.000 5	1 386	0.992 4	0.000 5	1 386
	6.94	0.999 0	0.004 0	173	0.990 5	0.001 4	495
	8.01	0.997 9	0.004 6	151	0.991 8	0.001 9	365
	9.06	0.985 7	0.005 7	122	0.997 0	0.006 0	116
9.87	0.995 2	0.007 8	89	0.998 5	0.011 7	59	

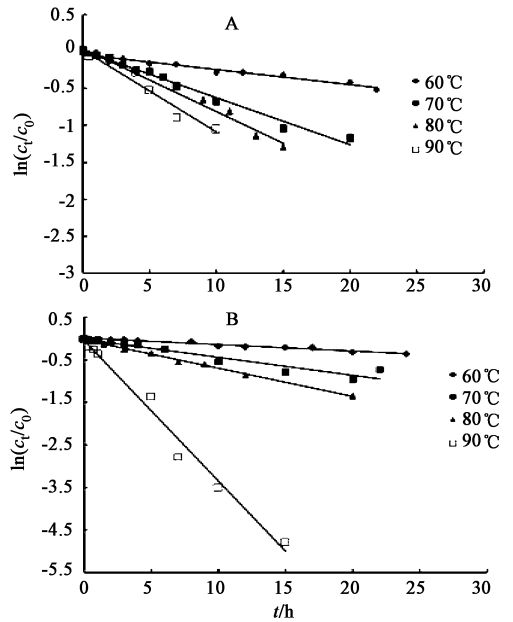
($-Ea/RT$)],由各温度下的 $\ln k$ 对 $1/T$ 作图,得图



A. 丹酚酸 B; B. 迷迭香酸

图3 丹酚酸 B 和迷迭香酸在不同 pH 缓冲液中降解规律

5A, 拟合曲线的斜率为 ($-Ea/R$), 经计算, pH 7.27, 温度 60~90 °C 的条件下, 丹酚酸 B 降解活化能 (Ea) = 48.54 kJ·mol⁻¹。



A. 对照品水溶液;B. 注射用丹参总酚酸

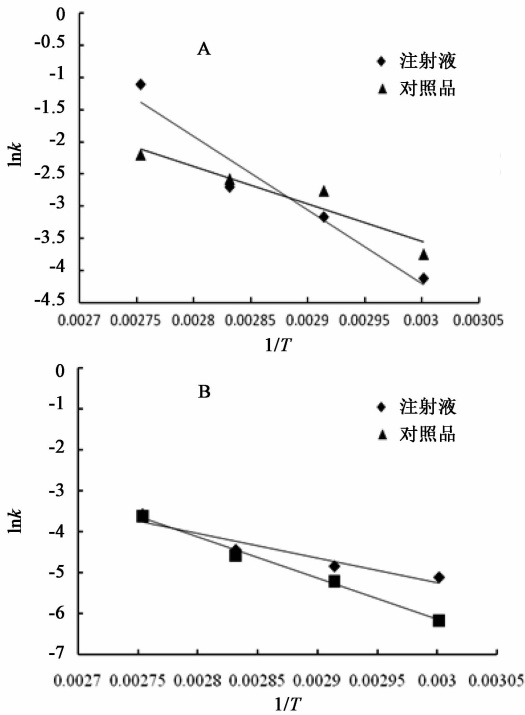
图4 丹酚酸 B 在不同温度中降解曲线

2.4 迷迭香酸对照品水溶液在不同条件下降解动力学研究

2.4.1 pH 精密量取迷迭香酸对照品储备液 500 μL, 置于灭菌的 5 mL 量瓶中, 分别用不同 pH 值的缓冲溶液稀释至刻度, 涡旋混匀, 得样品溶液, 测定 c₀。按 2.3.1 项下方法对样品进行测定, 得图

表 2 丹酚酸 B 和迷迭香酸于不同温度下降解参数

成分	温度/°C	对照品水溶液					注射用丹参多酚酸				
		<i>r</i>	<i>k</i>	<i>t</i> _{1/2} /d	<i>Q</i> ₁₀	<i>E_a</i> /kJ·mol ⁻¹	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>t</i> _{1/2} /d	<i>Q</i> ₁₀	<i>E_a</i> /kJ·mol ⁻¹
丹酚酸 B	60	0.978 3	0.023 8	29	2.66	48.54	0.992 0	0.016 4	43	2.56	95.19
	70	0.992 0	0.063 4	11	1.20		0.965 4	0.042 0	16	1.60	
	80	0.982 8	0.076 0	9	1.46		0.997 5	0.067 0	10	4.92	
	90	0.978 3	0.110 7	6			0.992 0	0.329 7	2		
迷迭香酸	60	0.994 6	0.006 1	114	1.31	49.83	0.988 9	0.002 1	330	2.62	83.56
	70	0.991 8	0.008 0	87	1.4 9		0.994 3	0.005 5	126	1.90	
	80	0.991 9	0.011 9	58	2.37		0.992 0	0.010 4	67	2.60	
	90	0.991 3	0.028 2	25			0.998 8	0.027 0	26		



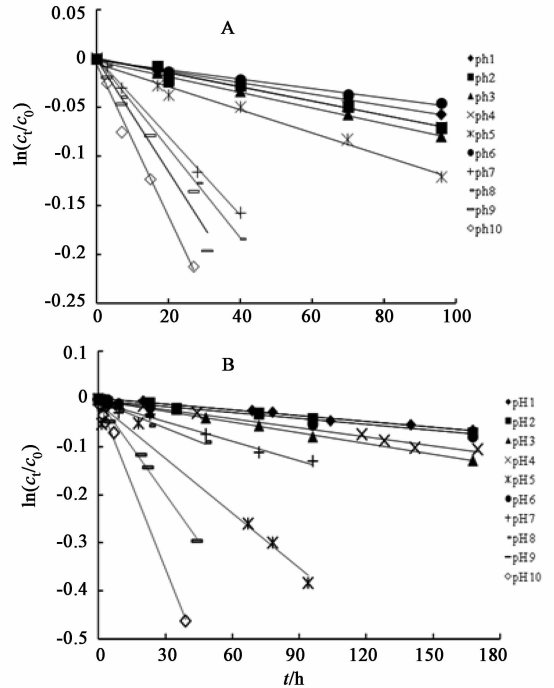
A. 丹酚酸 B; B. 迷迭香酸

图 5 丹酚酸 B 和迷迭香酸降解速率与温度间关系

6A。拟合测定结果发现,迷迭香酸的降解过程符合一级动力学,相关参数见表 1。pH 与 *k* 值的关系见图 3B(迷迭香酸在 pH 11.06, 12.02, 12.88 的缓冲溶液中迅速降解,因此未在图表中列出),说明迷迭香酸降解的整体趋势是随溶液碱性的增加,降解速率加快。

2.4.2 温度 精密量取迷迭香酸对照品储备液 500 μL,分别置于灭菌的 5 mL 量瓶中,以 pH 7.27 的超纯水定容,涡旋混匀,得样品溶液,测定 *c*₀。按 2.3.2 项下方法对样品进行测定,见图 7A。拟合测定结果发现,迷迭香酸在 60, 70, 80, 90 °C 下降解过程均符合一级动力学,相关参数见表 2。根据阿仑尼乌斯方程计算,在 pH 7.27, 温度 60 ~ 90 °C 的条件下,迷迭香酸 *E_a* = 49.83 kJ·mol⁻¹。

2.5 注射用丹参多酚酸中丹酚酸 B、迷迭香酸在不



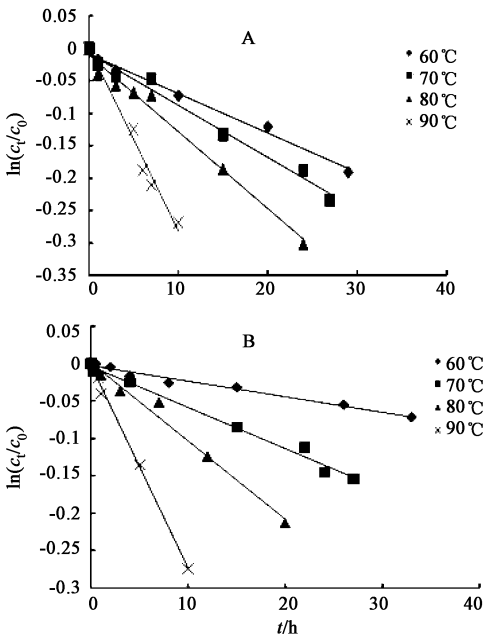
A. 对照品水溶液; B. 注射用丹参多酚酸

图 6 迷迭香酸在不同 pH 缓冲溶液中降解曲线

同条件下降解动力学研究

2.5.1 pH 精密量取注射用丹参多酚酸储备液 500 μL,分别置于灭菌的 5 mL 棕色量瓶中,加不同 pH 的缓冲液稀释至刻度,涡旋混匀,得样品溶液,采用 HPLC 测定溶液中丹酚酸 B、迷迭香酸的 *c*₀。按 2.3.1 项下方法对样品进行测定,得图 2B 和图 6B。将测定结果进行拟合,显示该制剂中丹酚酸 B 与迷迭香酸的降解过程符合一级动力学,相关降解动力学参数见表 1。pH 与 *k* 值的关系见图 3(丹酚酸 B、迷迭香酸在 pH 11.06, 12.02, 12.88 的缓冲液中迅速降解,因此未在图表中列出),表明在不同 pH 下,注射用丹参多酚酸中丹酚酸 B、迷迭香酸分别与其对照品水溶液的降解趋势一致。

2.5.2 温度 精密量取注射液样品储备液 500 μL,置于灭菌的 5 mL 棕色量瓶中,用系列缓冲溶剂定



A. 对照品水溶液;B. 注射用丹参总酚酸
图7 迷迭香酸在不同温度中降解曲线

容,涡旋混匀,得样品溶液,测定 c_0 。按 2.3.2 项下方法对样品进行测定,得图 4B 和图 7B。拟合测定结果发现,二者在 60,70,80,90 °C 下降解过程均符合一级动力学,其降解动力学参数见表 2。按 2.3.2 项下方法,由 $\ln k$ 对 $1/T$ 作图(图 5B)并计算活化能。结果在 pH 7.27,温度 60~90 °C 的条件下,注射用丹参多酚酸中丹酚酸 B、迷迭香酸降解活化能分别为 95.19,84.56 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

3 讨论

利用经典恒温加速试验研究丹酚酸 B、迷迭香酸对照品及丹参总酚酸注射液中各自的降解动力学,发现二者降解反应特点有所不同,丹酚酸 B 受 pH 影响较为明显,在强酸性和碱性条件下均不稳定,最稳定 pH 4~5;迷迭香酸受 pH 影响较丹酚酸 B 小,在酸性条件下较为稳定,随 pH 的逐渐增大,其降解速率逐渐加快,与文献报道一致^[13-14],说明该 2 种成分在制备、使用及制剂过程中应避免强酸、碱性及高温环境,以降低其发生降解的可能性,提高含量,并且保证用药的安全性。

丹酚酸 B 和迷迭香酸对照品在中性水溶液中降解活化能均 $< 50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明该降解反应可在常温下自发进行,而在注射剂中活化能均 $> 85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明丹酚酸 B 和迷迭香酸在注射用丹参多酚酸中降解反应于常温下较难发生。说明 2 种成分在注射用多酚酸中较为稳定,制剂水平使丹酚酸 B 的稳定性有所提高;报道显示丹酚酸 B^[15] 在丹参水提

液中活化能 $84.90 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,对比丹酚酸 B 对照品的活化性亦有所提高,提示可能制剂中其他酸性成分的存在会有助于提高丹酚酸 B 的稳定性。本实验为注射用丹参多酚酸中活性成分的稳定性研究提供了一定实验依据,但制剂工艺对丹酚酸 B、迷迭香酸降解反应的影响机制,2 种活性成分的降解对丹参总酚酸注射液药效及安全性的影响还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:70.
- [2] 高学敏. 中药学. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1087.
- [3] 刘静,戴忠,王钢力,等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):288.
- [4] 李认书,李永强. 丹酚酸的研究进展[J]. 时珍国医国药,2003,14(6):371.
- [5] 李霁,王阶,王师菡,等. 丹酚酸在冠心病中的研究概况与进展[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(11):1788.
- [6] 赖筱娟,刘汉清,李俊松,等. 丹酚酸药代动力学及成分相互影响研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(14):1287.
- [7] 李克明,付桂香. 丹参中丹酚酸 B 的药理研究进展[J]. 中日友好医院学报,2008,22(6):366.
- [8] 陆小华. 不同炮制方法对丹参药材中丹酚酸 B 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):103.
- [9] 周丹,刘艾林,杜冠华. 迷迭香酸的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(7):594.
- [10] REN X L, WANG G F, WANG M, et al. Kinetics and mechanism of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-(*-D*-glycoside (THSG) degradation in aqueous solutions [J]. J Pharm Biomed Anal,2011,55(1):211.
- [11] 孔令东,温尧林,黄冰,等. 升压灵注射液的加速稳定性试验[J]. 中国中药杂志,2000,25(11):695.
- [12] 吴丹,敖桂珍,韩莎,等. 酮洛芬-丹皮酚偶合物的稳定性及其降解动力学研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(15):1943.
- [13] 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.
- [14] 侯建春,吕晓玲,周平,等. 迷迭香酸的稳定性研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(3):44.
- [15] 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.

[责任编辑 仝燕]