

丹酚酸 B 稳定性研究进展

黄世超, 瞿海斌* (浙江大学药物信息学研究所, 杭州 310058)

摘要: 丹酚酸 B 是丹参中含量最高、活性较强的酚酸类成分, 在水溶液中不稳定。文献报道丹酚酸 B 在弱酸性、低温和低离子浓度的体系中较为稳定。此外, 一些抗氧化剂以及丹参酚酸成分的加入可以减缓丹酚酸 B 的降解。丹酚酸 B 的降解途径主要有酯键水解、呋喃环开环和脱羧反应等, 降解后产生丹参素、紫草酸及其异构体、原儿茶醛和丹酚酸 A、C、D、E、F 等产物。本文从影响丹酚酸 B 降解的因素和丹酚酸 B 的降解途径两方面对丹参酚酸 B 稳定性的研究进展进行综述。

关键词: 丹酚酸 B; 稳定性; 降解途径

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)05-0644-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.033

Advances of Stability of Salvianolic Acid B

HUANG Shichao, QU Haibin* (Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: Salvianolic acid B, an active compound, is the most abundant phenolic acid in *Salvia miltiorrhiza* Beg.. It is unstable in aqueous solution. According to the reports, salvianolic acid B is more stable in the solution with weak acid, low temperature and low ionic strength. And adding some antioxidants or salvianolic acid ingredients can reduce the degradation rate of salvianolic acid B. Hydrolysis of ester bonds, opening of furan rings and decarboxylation are the main degradation reactions of salvianolic acid B in aqueous solution, and these reactions can produce products, such as danshensu, lithospermic acid and its isomers, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid A, C, D, E, F, etc. In this review, the advances of pathway and influence factors of salvianolic acid B degradation were summarized.

KEY WORDS: salvianolic acid B; stability; degradation pathway

丹参的药效成分主要为脂溶性的二萜醌类成分和水溶性的酚酸类成分, 此外还有黄酮、三萜、甾醇等成分。丹参水溶性成分主要包括丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 A、B、C、D、E、F、G、H、I 等, 具有较强的抗脂质过氧化和清除自由基作用^[1-3]。其中丹酚酸 B 是丹参中含量最高的成分^[4], 在鼠尾草属植物中分布比较广泛, 具有抗肝损伤、抗肝纤维化以及防止动脉粥样硬化等功效, 也是丹参中抗氧化能力较强的物质之一^[5]。丹酚酸 B 在水溶液中不稳定, 易降解^[6]。药物稳定性是药物质量的重要指标, 药物若发生分解、变质, 可导致药效降低, 甚至产生不良反应。关于丹酚酸 B 的降解已有相关的研究报道^[7-23], 朱金墙等^[24]对丹酚酸 B 的稳定性进行了初步的总结。本文从影响丹酚酸 B 降解的因素和丹酚酸 B 的降解途径两方面对近年来丹酚酸 B 稳定性研究

的进展进行综述。

1 影响丹酚酸 B 稳定性的因素

根据文献报道, 影响丹酚酸 B 稳定的因素主要包括温度、pH 值、离子强度、浓度、保存时间、溶媒体系和添加剂等。

1.1 pH 值对丹酚酸 B 稳定性的影响

郭永学等^[7]在 pH 值 0.51~7.05 内, 应用 HPLC 测定丹酚酸 B 在各个时间点的浓度, 通过浓度的自然对数 $\ln C$ 对时间 t 作图求得表观降解速率常数 k_{obs} 和 $\log k_{obs}$, 获得 $\log k_{obs}$ 与降解体系初始 pH 值之间的关系。在考察的 10 个不同的 pH 值中, 丹酚酸 B 在弱酸性条件下较为稳定, 尤其 pH 值为 2 时稳定性最好。

关于 pH 值对丹酚酸 B 稳定性的产生影响的机制, 郭永学等^[7]认为当 pH 值 < 2.0 时, 反应速率常数随 pH 值减小而迅速增大, 表明丹酚酸 B 受 H^+

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273992)

作者简介: 黄世超, 女, 硕士生 Tel: (0571)87276120
(0571)88208428 E-mail: quhb@zju.edu.cn

E-mail: tracyhsc@qq.com

*通信作者: 瞿海斌, 男, 博士, 教授 Tel:

催化;当 pH>6.0 时,反应的速率常数随 pH 值增大而迅速增大,表明丹酚酸 B 受 OH⁻催化。卢召战等^[8]、岳喜典等^[9]、张军等^[10]以及朱静等^[11]均应用 HPLC 考察不同 pH 值下丹酚酸 B 的稳定性,实验结果与郭永学等所得结果相符合。

1.2 温度对丹酚酸 B 稳定性的影响

郭永学等^[7]、岳喜典等^[9]、张军等^[10]、朱静等^[11]、林青等^[12]和张文芯等^[13]采用恒温加速试验法考察不同温度下丹酚酸 B 的降解速率常数,发现丹酚酸 B 的降解速率随着温度升高而增大。

温度对药物降解速率的影响可用 Arrhenius 公式^[7](1)和(2)表示:

$$k = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (1)$$

其中, k 为速率常数, R 为摩尔气体常量, T 为热力学温度, Ea 为表观活化能, A 为前因子(也称频率因子)。也常用其另外一种对数形式表示:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT} \quad (2)$$

郭永学等^[7]通过计算获得,当 pH 值为 2.0 时,在高温段丹酚酸 B 的降解活化能为 43.75 kJ·mol⁻¹,而在低温段丹酚酸 B 的降解活化能是 72.14 kJ·mol⁻¹,是高温段降解活化能的近 2 倍。由此可知丹酚酸 B 在低温下相对更稳定。

1.3 添加剂对丹酚酸 B 稳定性的影响

卢召战等^[8]考察了 5 种添加剂对提高丹酚酸 B 水溶液稳定性的作用,发现抗坏血酸、EDTA-2Na 和亚硫酸钠这 3 种抗氧化剂的加入有利于提高丹酚酸 B 的稳定性,而亚硫酸氢钠和硫代硫酸钠的加入反而加速了丹酚酸 B 的分解。曲桂武等^[14]采用相似方法考察了 7 种添加剂对丹酚酸 B 稳定性的影响,实验结果显示酸性抗氧剂的保护作用明显,而碱性抗氧剂的效果不佳,与卢召战等^[8]的实验结果较为接近,但亚硫酸钠和亚硫酸氢钠对丹酚酸 B 稳定性的作用,两者有些出入。

郑辛甜^[15]通过对比丹酚酸 B 的对照品溶液和丹参提取液的降解速率发现丹参提取液中丹酚酸 B 更为稳定,推测丹参提取液中存在丹酚酸 B 的天然保护剂。对比纯丹酚酸 B 溶液,考察加入不同浓度丹参素以及不同浓度原儿茶醛后丹酚酸 B 的降解速率,发现丹参素和原儿茶醛都有增强丹酚酸 B 稳定性的作用,且保护作用随着加入物质的浓度升高而增强,因此,两者均为丹酚酸 B 的

天然稳定剂。相同浓度下,原儿茶醛对丹酚酸 B 稳定性的保护作用比丹参素更强。原儿茶醛和丹参素保护作用的原理与改变丹酚酸 B 降解反应平衡的方向有关。

1.4 初始浓度和保存时间对丹酚酸 B 稳定性的影响

岳喜典等^[9]采用正交试验设计考察不同丹酚酸 B 起始浓度、pH 值、温度和保存时间等条件下丹酚酸 B 稳定性的情况,根据方差分析结果,在高初始浓度、低 pH 值、低温、短时间内丹酚酸 B 的稳定性最佳。

而郭永学等^[7]检测了在一定初始浓度范围内丹酚酸 B 的降解表观速率常数,发现 k_{obs} 保持恒定,提示丹酚酸 B 的降解反应为一级反应,降解恒速,其半衰期只与反应速率常数 k_{obs} 有关,与反应物的初始浓度无关。郭永学等^[7]关于初始浓度对丹酚酸 B 稳定性的影响与岳喜典等^[9]的实验结论不同,有待进一步考证。

1.5 离子强度对丹酚酸 B 稳定性的影响

郭永学等^[7]通过实验发现丹酚酸 B 在比例相同摩尔浓度不同的磷酸缓冲盐中的降解速率会随着缓冲盐浓度的增加而增大,离子强度的影响在 pH 值为 2.0~3.0 时表现不明显,但当 pH 值>3.0 时离子强度对丹酚酸 B 降解速率的影响随着 pH 增大而逐渐显著。郭永学等^[7]推测这种影响可能与离子强度不同导致丹酚酸 B 的解离度有关。

1.6 溶媒体系对丹酚酸 B 稳定性的影响

张军等^[10]将丹参水提取液过大孔吸附树脂后用乙醇洗脱,再将丹参酚酸乙醇溶液在 50℃ 水浴中受热 5 h,发现溶液中的丹酚酸 B 含量基本不变,比丹参水提液中的丹酚酸 B 更为稳定。此实验结果提示乙醇溶媒体系更有利于丹酚酸 B 的稳定,并且这一点已在丹参酚酸的中试研究中得到了验证。

2 丹酚酸 B 降解规律

丹酚酸 B 的降解机制较为复杂,涉及多种降解产物及反应途径,且目前对丹酚酸 B 的降解途径研究的相关文献较少。已有报道的文献一般应用 HPLC 制备丹酚酸 B 的主要降解产物,结合 LC-MS 和 NMR 技术对降解产物进行结构鉴定,根据降解产物对降解机制进行推断。不同文献报道的降解途径和降解产物有所差异,本文将报道次数较多、较为可靠的丹酚酸 B 降解途径进行归纳,结果见图 1。

致产物互为同分异构体,即紫草酸和紫草酸的同分异构体Ⅲ,两者均为不稳定的中间产物,可酯水解产生共同的产物原紫草酸,或是呋喃开环,生成紫草酸的同分异构体Ⅰ和Ⅱ。

Lee等^[17]采用HPLC分离得到13种丹酚酸B降解产物,其中有3种物质是新发现的化合物,推测丹酚酸B在水溶液中发生酯键水解、脱羰基、逆oxa-Michael加成、水合和自由基反应转化而来,降解途径包括:①丹酚酸B酯键水解生成紫草酸或紫草酸异构体Ⅲ,同时生成丹参素;②紫草酸脱羰基及苯并呋喃环开环生成丹酚酸A,紫草酸脱羰基并脱水生成丹酚酸C,紫草酸经过自由基反应生成丹酚酸D;③丹酚酸A水解生成丹酚酸F,丹酚酸A合环生成丹酚酸C,丹酚酸C发生水合反应生成新化合物;④丹酚酸D、丹酚酸C以及丹酚酸C的水合物进一步水解均能生成丹参素;⑤紫草酸异构体Ⅲ进一步降解可生成丹酚酸F,也可以生成原儿茶醛。

徐曼等^[18]研究丹酚酸B和总酚酸在不同温度、不同pH值的磷酸缓冲盐体系以及生物体液(模拟胃液和模拟小肠溶液)中的稳定性。对以上不同实验条件下获得的HPLC-ESI-MSⁿ结果进行分析,推测降解途径如下:①丹酚酸B开环成丹酚酸E或丹酚酸D,丹酚酸E经过重排反应可生成丹酚酸J、丹酚酸L或异丹酚酸C;②丹酚酸B经过酯键水解反应可生成紫草酸,紫草酸进一步降解可生成丹酚酸C或丹酚酸D。

Kan等^[19]利用尖孢镰刀菌对丹酚酸B进行生物转化研究,并与丹酚酸B在碱性条件下的降解结果进行对比。研究发现尖孢镰刀菌作用下丹酚酸B降解途径与丹酚酸B在碱性环境下的降解途径类似,丹酚酸B依次发生酯键水解断裂生成紫草酸异构体以及原紫草酸,同时生成丹参素。

郑辛甜等^[20]研究丹酚酸B在碱性高温条件下的降解情况,推测丹酚酸B的降解途径为:①丹酚酸B与其异构体(丹酚酸E)互相转化;②丹酚酸B酯键水解得到紫草酸和丹参素,丹酚酸E酯键水解得到紫草酸异构体Ⅱ和丹参素;③紫草酸异构体Ⅱ脱去二氧化碳得到丹酚酸A。

周丽娜等^[21]研究丹酚酸B在高温高压灭菌条件下降解情况,推测降解途径如下:①丹酚酸B在酸性条件下转化为丹酚酸E,丹酚酸E酯键水解并脱去二氧化碳生成丹酚酸A和丹参素,丹酚

酸A酯键水解生成丹酚酸F和丹参素;②丹酚酸B酯键水解生成紫草酸和丹参素,紫草酸呋喃开环水解生成丹酚酸D和原儿茶醛,或紫草酸酯键水解生成原紫草酸和丹参素,原紫草酸呋喃开环生成咖啡酸。

此外,紫草酸开环脱羧形成丹酚酸A以及丹酚酸A可以转化为丹酚酸C,在其他文献报道中也有提及。王颖等^[22]发现丹酚酸B溶液和紫草酸的主要产物均为丹酚酸A,且相同条件下紫草酸比丹酚酸B更容易转化为丹酚酸A。艾春波等^[23]认为丹酚酸C是丹酚酸A的环化产物,郑辛甜^[15]应用MCR-ALS分析丹酚酸A可以转化为丹酚酸C、异丹酚酸C及其他几种新化合物。张东明^[25]也认为丹酚酸A转化为丹酚酸C是丹酚酸类化合物的生物合成途径之一。

综上所述,酯键水解、呋喃环开环以及脱羧反应是丹酚酸B的主要降解途径,降解后产生丹参素、紫草酸及其异构体、原儿茶醛和丹酚酸A、C、D、E、F等多种产物。

3 总结

丹酚酸B的稳定性受多种因素的影响,文献报道丹酚酸B在弱酸性、低温、低离子强度、保存时间较短以及添加一些抗氧化剂的情况下较为稳定。但不同文献的实验结果也存在一定差异。例如关于丹酚酸B的初始浓度是否对其稳定性产生一定影响,郭永学等^[7]认为丹酚酸B的降解反应为一级反应,降解恒速,其降解半衰期与反应物的初始浓度无关,而岳喜典等^[9]则认为高初始浓度下丹酚酸B更为稳定。实验结果的不同可能是由于实验设计方法不同导致。多种因素对丹酚酸B的降解具有一定影响,而一种因素的改变会导致其他因素的变化,例如丹酚酸B初始浓度改变会影响降解体系的初始pH值以及离子强度等因素的变化。

关于丹酚酸B的降解途径,研究发现丹酚酸B降解过程较为复杂,涉及多种反应。目前较为认可的反应途径包括酯键水解、呋喃环开环和脱羧等,但仍有一部分降解产物不能分析其来源及转化途径。丹酚酸B降解过程中总体趋势是丹酚酸B、丹酚酸E、紫草酸及紫草酸异构体等分子量较大的物质逐渐减少,而丹参素、咖啡酸和原儿茶醛等小分子物质逐渐增加。报道丹酚酸B降解规律研究的文章比较少,尤其是缺乏系统性、全面

性论述的文章,这主要受丹酚酸 B 降解途径较为复杂、体系中存在物质过多以及缺乏有效的研究方法等客观因素的制约,揭示丹参酚酸的降解规律需要进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 李朝霞,王地.丹参水溶性成分的研究进展[J].北京中医,2004,23(3):176-178.
- [2] 林峰,石杰.丹参活性成分的药效药理作用[J].医学信息,2011,24(6):3813-3814.
- [3] 高枫,孙桂波,马博,等.丹参活性成分作用机制研究的新进展[J].中药药理与临床,2009,25(4):90-92.
- [4] GUO Y X. Study on degradation mechanism and purification technique of lithospermic acid B [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2007.
- [5] ZHAO G R, ZHANG H M, YE T X, et al. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(1): 73-81.
- [6] QU H B, ZHAI X J, SHAO Q, et al. Simultaneous determination of seven active compounds in Radix Salviae Miltiorrhizae by temperature-controlled ultrasound-assisted extraction and HPLC [J]. Chromatographia, 2007, 66(1/2): 21-27.
- [7] GUO Y X, ZHANG D J, WANG H, et al. Hydrolytic kinetics of lithospermic acid B extracted from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(2): 435-439.
- [8] LU Z Z, ZHU J B, LIU T C. Influence of pH and additives on stability of salvianolic acid B [J]. J DALIAN Dalian Polytechnic Univ(大连工业大学学报), 2005, 27(3): 209-211.
- [9] YUE X D, QU G W, LI G S, et al. Stability of salvianolic acid B in water solution [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(2): 205-207.
- [10] 张军,王凤云,詹丽玲,等.丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察[J].中国中药杂志,2005,30(10):789-790.
- [11] ZHU J, CHEN H Q, BAI P, et al. Decomposition kinetics of salvianolic acid B's aqueous solution [J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2009, 31(4): 541-544.
- [12] LIN Q, HUANG L, XIAO X L, et al. Kinetic study on the degradation of salvianolic acid B in extract of *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2008, 10(8): 29-31.
- [13] ZHANG W X, XUAN L, NI J. Stability of salvianolic acid B in water solution [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2009, 32(12): 856-858.
- [14] 曲桂武,岳喜典,李桂生.添加剂对丹参酚酸 B 水溶液稳定性的影响[J].中草药,2005,36(11):1654-1655.
- [15] ZHENG X T. Studies on the degradation of salvianolic acid B, salvianolic acid A and baicalin [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] XU M, HAN J, LI H F. Analysis on the stability of total phenolic acids and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by HPLC and HPLC-MSⁿ [J]. Nat Prod Commun, 2008, 3(5): 669-676.
- [19] KAN S, LIN H, LI J, 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.
- [20] ZHENG X T, QU H B. Characterisation of the degradation of salvianolic acid B using an on-line spectroscopic analysis system and multivariate curve resolution [J]. Phytochem. Anal, 2012, 23(2): 103-109.
- [21] ZHOU L N, ZHANG X, XU W Z, et al. Studies on the stability of salvianolic acid B as potential drug material [J]. Phytochem. Anal, 2011, 22(4): 378-384.
- [22] WANG Y, ZHU J B, FU S P, et al. Study on chemical changes of salvianolic acid B and lithospermic acid aqueous under conditions of high temperature and high pressure [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(4): 434-438.
- [23] AI C B, LI L N. Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Nat Prod, 1988, 51(1): 145-149.
- [24] 朱金墙,闫晨,康立源.丹酚酸 B 的稳定性及其降解机理研究进展[J].中国中医药信息杂志,2010,17(12):113-115.
- [25] 张东明.酚酸化学[M].北京:化学工业出版社,2008:275-276.

收稿日期:2014-12-16

本刊投稿须知

本刊只接受网上投稿,步骤如下:

①登陆网址: www.chinajmap.com 点击“作者登录”;②首次登陆须先注册(*为必填项);③文件上传,基金项目复印件请作为附件上传;④填写稿件信息:逐项核对、更改中英文标题、关键词、摘要等信息,填写第一作者信息,点击“添加更多作者”,填写所有合写作者的信息(*为必填项),勾选通信作者;⑤您可以提供您想回避的审稿专家和推荐的审稿专家,供我们参考;⑥投稿确认。