

鼠尾草酸在人工体液中的稳定性考察

曹 伟, 冀思华, 刘 芳, 曾光尧, 周应军*

中南大学药学院, 长沙 410013

摘要: 考察了鼠尾草酸(carnosic acid, CA)在人工体液中的稳定性及其降解产物。采用高效液相色谱法对鼠尾草酸在不同体液中的含量变化进行检测分析, 同时使用制备型高效液相色谱对鼠尾草酸在人工体液中的降解产物进行分离。结果显示鼠尾草酸在人工胃液中未发生明显变化, 而在人工肠液中发生了明显降解, 主要产生 4 个降解产物, 通过分离得到其中三个降解产物: 迷迭香酚、表迷迭香酚和鼠尾草酚。实验表明碱性环境对鼠尾草酸的稳定性具有显著影响, 制剂研究时必须考虑肠液对鼠尾草酸的降解作用。

关键词: 鼠尾草酸; 人工体液; 稳定性; 降解产物

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.015

Stability of Carnosic Acid in Simulated Body Fluid

CAO Wei, JI Si-hua, LIU Fang, ZENG Guang-yao, ZHOU Ying-jun*

College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: This study investigated the stability of carnosic acid (CA) in simulated body fluid using HPLC and preparative HPLC. The body fluid, including simulated gastric juice, simulated intestinal juice, blank simulated gastric juice and blank simulated intestinal juice, was prepared according to "Chinese Pharmacopoeia". It was revealed that no significant changes of carnosic acid content was observed in simulated gastric juice and blank simulate juice, while several degradation products, such as rosmanol, epirosmanol, and carnosol, were detected in simulated intestinal juice and blank simulated intestinal juice. Specifically, the pH value exerted a significant impact on the stability of CA in body fluid, which guided further development of CA.

Key words: carnosic acid; simulated body fluid; stability; degradation products

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* L.) 是唇形科迷迭香属植物, 原产欧洲及北非地中海沿岸, 目前在世界多个地区都有种植。迷迭香是公认的具有较高抗氧化活性的植物, 其抗氧化活性的主要物质基础为二萜酚类成分, 包括鼠尾草酸、鼠尾草酚、迷迭香酚、表迷迭香酚、异迷迭香酚、7-甲氧基迷迭香酚、7-乙氧基迷迭香酚等^[1]。除抗氧化活性之外, 该类成分还具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、神经保护等其它多种药理活性^[2]。

作为迷迭香中最主要的二萜酚类成分, 鼠尾草酸具有高效、安全、耐高温等特性, 被广泛应用于食品添加剂、化妆品、保健品、食用油等行业^[3]。但是鼠尾草酸在溶剂中不稳定, 尤其是在极性溶剂中^[4], 这使鼠尾草酸的利用受到了限制。为了进一

步明确鼠尾草酸的稳定性, 评价鼠尾草酸的成药性, 我们对其在人工体液条件下的稳定性进行了考察, 为鼠尾草酸的制剂研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 紫外检测器 (上海市安亭电子仪器厂), KQ5200DB 数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), Discovery DV215CD 型电子天平 (奥豪斯仪器上海有限公司), PHS-3C 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂), 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司), 真空干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司), 制备型高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司)。

1.2 试剂

鼠尾草酸样品 (95%, 长沙三友医药科技有限公司); 胃蛋白酶 (1: 3000, 美国 GenView 公司); 胰蛋白酶 (1: 250, 北京鼎国品盛生物科技有限公司);

甲醇、乙腈为色谱纯;实验用水为超纯水;其它试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 鼠尾草酸含量测定方法

2.1.1 HPLC 分析条件

采用高效液相色谱法检测样品中鼠尾草酸的含量。色谱条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸水(70:30);流速:1 mL/min;检测波长:284 nm;进样量:10 μL;柱温:25 °C。

2.1.2 对照品溶液的配制

精密称取鼠尾草酸对照品 176.02 mg(含量为 95%),置于 10 mL 棕色容量瓶中,加乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀即得。配制成为浓度为 16.72 mg/mL 的对照品储备液,置于 4 °C 冰箱冷藏,待用。

2.1.3 线性关系考察

取 2.1.2 项中制备的对照品储备液,用超纯水分别稀释至浓度为 0.21、0.42、0.84、1.67、2.09、3.34 mg/mL。根据选定的色谱条件进样检测,以峰面积 Y 对质量浓度(ρ)绘制标准曲线,得到回归方程为 $Y = 3.0 \times 10^6 \rho + 5.5 \times 10^5$, $R^2 = 0.9991$ 。结果表明,鼠尾草酸浓度在 0.21 ~ 2.09 mg/mL 间与吸收峰面积线性关系良好。

2.1.4 精密度实验

取 2.1.2 中制备的鼠尾草酸对照品储备液,连续进样 6 次,记录色谱图,鼠尾草酸峰面积的 RSD 为 0.15%,表明仪器等整个检测系统的精密度良好。

2.1.5 重复性实验

精密称取鼠尾草酸 95% 含量的样品,置于 5 mL 棕色容量瓶中,加乙腈溶液溶解并稀释至刻度。精密吸取样品溶液 10 μL,按照选定的色谱方法由始至终平行操作 6 次,测得的鼠尾草酸峰面积的 RSD 为 0.54%。结果表明,鼠尾草酸 95% 含量的样品分析结果稳定,该方法重复性良好。

2.1.6 加样回收率实验

精密量取同批次的迷迭香制备的供试品溶液,按照测定方法测定三次,取平均值,得到该批供试品鼠尾草酸的含量为 2.77 mg/mL,精密吸取已知含量的供试品溶液九份,分别精密加入不同浓度的鼠尾草酸对照品溶液,定容至 10 mL,用选定的色谱条件进行测定,记录峰面积,结果见表 1。

2.2 人工体液的配制

2.2.1 人工胃液的配制

按照《中国药典》2015 版第四部,取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀使其充分溶解后,调节 pH 值至 1.3,加水稀释定容至 1000 mL,即为人工胃液。空白人工胃液的配制:除不含胃蛋白酶,其余与人工胃液配制相同。

2.2.2 人工肠液的配制

按照《中国药典》2015 版第四部,取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 使其溶解,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8;另外称取 10 g 胰蛋白酶加适量水溶解,将两液混合后,加水定容至 1000 mL,即为人工肠液。空白人工肠液的配制:除不含胰蛋白酶,其余与人工肠液配制相同。

2.3 降解实验

精密称取鼠尾草酸对照品 50.50 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈定容并摇匀,而后精密吸取对照品储备液 1 mL 置于 5 mL 棕色容量瓶中,分别用模拟人工胃液、模拟人工肠液、空白人工胃液、空白人工肠液稀释定容至刻度,摇匀。分别将配置好的样品溶液放置于 37 °C 水浴中,每 0.5 h 取样,经 0.45 μm 滤膜过滤后,按照进样 20 μL 进行测定,记录峰面积。

2.4 空白人工肠液中降解产物的分离

精密称取含量为 95% 的鼠尾草酸样品 100.02 mg,置于 500 mL 棕色容量瓶中,加入 10 mL 乙腈使其充分溶解,而后加入空白人工肠液稀释定容至刻度,摇匀,将配置好的样品溶液放置于 37 °C 水浴中,分别在 0、3、6、9、12、24 h 取样,经 0.45 μm 滤膜过滤后,根据 2.1.1 中的色谱条件,进样 20 μL 进行测定,记录峰面积。

降解完全后,对主要的降解产物进行分离。先用 10% H₃PO₄ 将降解的反应液调至 pH = 2.5 ~ 3.0,过滤得到沉淀部分,用少量乙腈溶解,经 0.45 μm 滤膜过滤后,通过制备型高效液相色谱(Prep-HPLC)进行分离,流动相:乙腈-0.1% 磷酸水(60:40);流速:10 mL/min;检测波长:284 nm;进样量:2 mL,分别收集不同保留时间的流分,减压浓缩后,用 Lipophilic Sephadex LH-20 进行纯化。

3 实验结果

3.1 加样回收率实验结果

表 1 鼠尾草酸含量的加样回收率测定结果 ($n=9$)
Table 1 The result of recovery test of carnosic acid ($n=9$)

编号 No.	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	相对标准差 RSD (%)
1	2.09	4.83	98.56		
2	2.12	4.88	99.52		
3	2.10	4.85	99.05		
4	2.82	5.60	100.35		
5	2.80	5.54	98.93	98.99	0.68
6	2.71	5.43	98.15		
7	3.29	6.03	99.09		
8	3.36	6.10	99.11		
9	3.33	6.04	98.19		

3.2 降解实验结果

鼠尾草酸在不同的人工体液中的稳定性存在差异:在人工胃液中以及空白人工胃液中,鼠尾草酸的含量没有明显变化;在人工肠液和空白人工肠液中,

鼠尾草酸不稳定,随着时间延长,鼠尾草酸的含量不断下降,具体实验数据见表 2。而比较人工肠液以及空白人工肠液测得的结果,可知胰蛋白酶对鼠尾草酸稳定性的影响较小。

表 2 模拟体液中鼠尾草酸的含量变化

Table 2 The content variation of carnosic acid in simulated body fluid

取样时间 Sampling time (h)	CA 含量 Convent of CA (μg)			
	人工胃液 Simulated gastric juice	空白人工胃液 Blank simulated gastric juice	人工肠液 Simulated intestinal juice	空白人工肠液 Blank simulated intestinal juice
0.0	19.39	18.87	19.48	19.79
0.5	18.82	18.26	19.21	18.64
1.0	18.68	18.90	18.73	17.67
1.5	18.80	18.40	18.15	17.44
2.0	18.62	18.43	15.81	16.65
2.5	19.01	18.75	15.59	15.90
2.5	19.11	18.27	15.37	15.05
3.0	19.20	18.80	15.37	14.54
3.5	18.51	18.73	14.18	13.03
4.5	18.57	18.61	11.62	12.46
5.0	18.58	18.31	9.42	9.76
6.0	18.72	18.24	7.78	8.94

3.3 模拟空白人工肠液中降解产物分离结果

由于胰蛋白酶对于鼠尾草酸的稳定性影响较小,因此选择空白人工肠液进行 CA 降解过程的考察。为了使鼠尾草酸充分降解,模拟的降解过程持续了 24 h。鼠尾草酸在空白人工肠液中随着时间不

断的降解,产生四个主要的降解产物,结果见图 1。对其降解产物进行研究,分离鉴定了其中的三个化合物,分别为迷迭香酚 (rosmanol)、表迷迭香酚 (epi-rosmanol)、鼠尾草酚 (carnosol)。

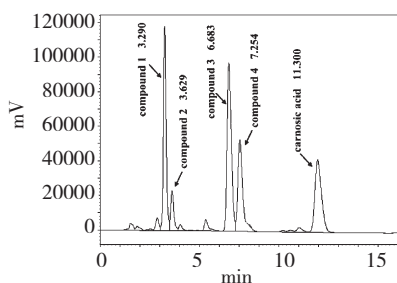


图1 CA在空白人工肠液中降解24 h的HPLC谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of CA in blank simulated intestinal juice after 24 h' degradation

化合物1 白色晶体;易溶于乙醇,三氯化铁反应阳性提示含有酚羟基。ESI-MS显示分子离子峰 m/z :347 [M + H]⁺。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.82 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, d, $J = 6.80$ Hz, H-17), 1.14 (3H, d, $J = 6.80$ Hz, H-16), 1.18 (1H, m, H-3_α), 1.28 ~ 1.38 (1H, m, H-3_β), 1.28 ~ 1.39 (1H, m, H-2_α), 1.54 (1H, m, H-2_β), 1.82 (1H, td, $J = 14.00, 5.00$ Hz, H-1_α), 2.23 (1H, br. s, 5-H), 3.16-3.19 (1H, m, H-1_β), 3.21 (1H, sept, 15-H), 4.45 (2H, d, H-6, 7), 6.74 (1H, s, H-14); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 19.28 (C-2), 22.21 (C-19), 22.95 (C-16), 23.27 (C-17), 26.60 (C-15), 27.83 (C-1), 31.50 (C-18), 31.60 (C-4), 38.31 (C-3), 46.85 (C-10), 49.92 (C-5), 67.79 (C-7), 78.30 (C-6), 119.20 (C-14), 124.04 (C-9), 129.29 (C-8), 136.30 (C-13), 142.24 (C-12), 144.54 (C-11), 178.22 (C-20)。以上数据与文献报道^[5,6]的迷迭香酚基本一致,确定化合物1为迷迭香酚。

化合物2 黄色固体;溶于乙醇,三氯化铁反应阳性提示含有酚羟基。ESI-MS显示分子离子峰 m/z :346 [M]⁺。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.83 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, d, $J = 6.80$ Hz, H-17), 1.13 (3H, d, $J = 6.80$ Hz, H-16), 1.16 (1H, m, H-3_α), 1.31 ~ 1.34 (1H, m, H-3_β), 1.31-1.34 (1H, m, H-2_α), 1.53 (1H, m, H-2_β), 1.79 (1H, td, $J = 14.00, 5.00$ Hz, H-1_α), 1.93 (1H, br. s, 5-H), 3.16-3.18 (1H, m, H-1_β), 3.21 (1H, m, 15-H), 4.62-4.63 (2H, br. s, H-6, 7), 6.84 (1H, s, H-14); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 19.18 (C-2), 22.07 (C-19), 22.96 (C-16), 23.36 (C-17), 26.63 (C-15), 27.72 (C-1), 31.64 (C-18), 31.79 (C-4),

37.94 (C-3), 47.92 (C-10), 54.71 (C-5), 69.25 (C-7), 79.40 (C-6), 117.41 (C-14), 123.37 (C-9), 130.44 (C-8), 136.06 (C-13), 141.86 (C-12), 144.30 (C-11), 178.21 (C-20)。以上数据与文献报道^[6]的表迷迭香酚基本一致,因此鉴定化合物2为表迷迭香酚。

化合物3 无色晶体;易溶于乙醇, FeCl₃ 反应阳性提示含有酚羟基。ESI-MS显示分子离子峰 m/z :331 [M + H]⁺。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.79 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-18), 1.13 (6H, d, $J = 6.80$ Hz, H-16, 17), 1.23 (1H, m, H-3_α), 1.44 (1H, d, $J = 12.50$ Hz, H-2_α), 1.53 (1H, m, H-3_β), 1.61 (1H, dd, $J = 6.00, 10.50$ Hz, H-5), 1.72-1.79 (2H, m, H-2_β, H-6_β), 2.07 (1H, m, H-6_α), 2.45 (1H, td, $J = 14.00, 5.00$ Hz, H-1_α), 2.65 (1H, br. d, H-1_β), 3.22 (1H, sept, H-15), 5.47 (1H, d, $J = 4.50$ Hz, H-7), 6.70 (1H, s, H-14); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 18.67 (C-2), 19.54 (C-17), 22.77 (C-16), 22.89 (C-17), 26.32 (C-15), 28.90 (C-1), 29.39 (C-6), 31.49 (C-18), 34.27 (C-4), 40.68 (C-3), 45.10 (C-5), 48.01 (C-10), 77.06 (C-7), 111.42 (C-14), 122.06 (C-9), 131.69 (C-8), 134.38 (C-13), 143.20 (C-11), 143.34 (C-12), 175.60 (C-20)。以上数据与文献报道^[6]鼠尾草酚基本一致,因此鉴定化合物3为鼠尾草酚。

4 讨论与结论

实验考察了鼠尾草酸在人工体液中的稳定性,研究发现其在人工肠液中不稳定。HPLC结果显示,降解进行至3.0 h,降解过程中产生了中间产物,

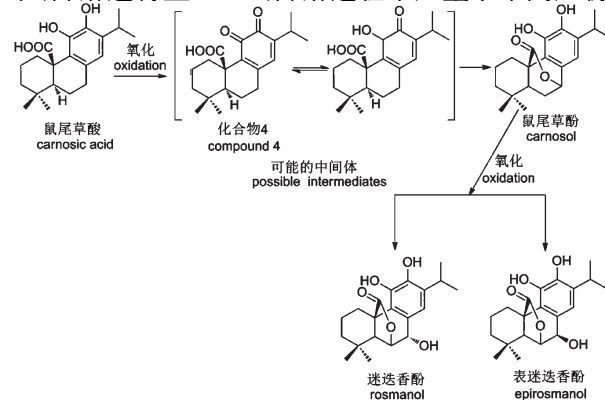


图2 人工肠液中鼠尾草酸可能的降解途径

Fig.2 Conjectural degradation pathway of CA in simulated intestinal juice

根据文献报道^[4,7]推测可能是鼠尾草酸酐。由于鼠尾草酸酐结构极其不稳定,因此在降解产物的研究中,并未对此中间体进行分离,而此酐或者半酐的的中间体形式能通过氧化生成鼠尾草酚。因此推测鼠尾草酸通过中间体生成鼠尾草酚,而后鼠尾草酚进一步氧化,生成另外两个降解产物,推测鼠尾草酸在空白人工肠液中的降解途径见图2。

对鼠尾草酸在人工体液环境中的稳定性进行研究,结果表明碱性环境对鼠尾草酸稳定性有显著影响。这就提示我们在制剂研究时,应尽量避免口服制剂,可以使用粉针剂等来避免肠液对鼠尾草酸的降解,或者对鼠尾草酸的两个活性基团进行结构改造,以增加药物在肠液中的稳定性。

参考文献

- 1 Tu PF(屠鹏飞), Xu ZH(徐占辉), Zheng JT(郑家通), et al. The chemical constituents and aplyment of rosemary. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1997, 10(3): 62-68.
 - 2 Ibañez E, Kubatova A, Senorans FJ, et al. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 375-382.
 - 3 Simona B, Pierre D, Francois XP, et al. Carnosic acid. *Phytochemistry*, 2015, 115: 9-19.
 - 4 Liu XJ, Du JQ, Ou YW, et al. Degradation pathway of carnosic acid in methanol solution through isolation and structural identification of its degradation products. *Eur Food Res Technol*, 2013, 237: 617-626.
 - 5 Nakatani N, Inatani R. Structure of rosmanol, Anew antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 2385-2386.
 - 6 Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 665-609.
 - 7 Schwarz K, Ternes W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1992, 195: 99-103.
-
- (上接第 443 页)
- 5 Liu J, Hu XG, Yang Q, et al. Comparison of the immunoregulatory function of different constituents in Radix Astragali and Radix Hedysari. *Biomed Res Int*, 2010, 2010 (1110-7243): 103-105.
 - 6 Dang Z, Feng D, Liu X, et al. Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from Radix Hedysari. *Fitoterapia*, 2013, 89(1): 20-32.
 - 7 Song AH(宋爱华), Ma CR(马翠荣), Wang YS(王英淑). The relationship of traditional Chinese medicine and Trace elements. *Stud Trace Element Health*(微量元素与健康), 2010, 27(5): 69.
 - 8 Yang B(杨波), Wang ZG(王振国). Literature study on relationship between Cold-Heat nature of plant-based Chinese herbs and inorganic elements. *J Nanjing TCM Univ*(南京中医药大学学报), 2011, 27: 109-111.
 - 9 Konieczynski P, Arceusz A, Wesolowski M. Essential elements and their relations to phenolic compounds in infusions of medicinal plants acquired from different European regions. *Biol Trace Element Res*, 2016, 170: 466-475.
 - 10 Szymański M, Witkowska-Banaszczak E, Klak N, et al. Effects of trace elements on polyphenolic compounds in Millefolii Herba. *Polish J Environ Stud*, 2014, 23: 459-466.
 - 11 Li CY(李成义), Qing ZZ(强正泽), Wang MW(王明伟), et al. Quantitative determination of trace elements in Hedysari Radix from different places in Gansu province. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(12): 47-53.
 - 12 Qing ZZ(强正泽), Wang Y(王燕), Li CY(李成义), et al. Correlation analysis between contents of active ingredients and trace elements in Hedysari Radix from Gansu province. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1801-1810.
 - 13 Qiang ZZ(强正泽), Li CY(李成义), Li S(李硕), et al. Identification of wild and cultivated Hedysari Radix based on trace elements. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(12): 47-53.
 - 14 Li CY(李成义), Qiang ZZ(强正泽), Wang Y(王燕), et al. Study on quality evaluation of Hedysari Radix from different producing areas in Gansu province based on the contents of 12 trace elements. *Chin J Inf TCM*(中国中医药信息杂志), 2016, 23(6): 92-98.
 - 15 Li CY(李成义), Qiang ZZ(强正泽), Wang MW(王明伟), et al. Study on locality identify and characteristics of trace elements in Radix Isatidis from Gansu province. *J Chin Med Mater*(中药材), 2015, 38: 2301-2305.
 - 16 Ma PL(马鹏里), Pu JY(蒲金涌), Dang B(党冰). Assessment on meteorological condition of Radix hedysari growing area in Gansu province. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2010, 38: 18742-18743.
 - 17 The Official Committee of Hygiene Department of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典, 2015年, 一部). Beijing: China Medical Science Press, 2015. 302.