

# 紫草中 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁提取和含量测定及其稳定性研究

谢清春 陈燕忠 吕竹芬<sup>△</sup>  
广东药学院药物研究所, 广东广州 510006

**[摘要]** 目的 测定不同产地的紫草中 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁(以下简称阿卡宁)的含量, 比较不同溶剂对紫草中阿卡宁的提取率, 并对阿卡宁的乙醇溶液稳定性进行考察。方法 采用高效液相色谱法测定阿卡宁的含量, 色谱柱为Dikma Diamonsil C18柱(200 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 以乙腈-水-甲酸(700:300:0.5)为流动相, 流速1 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长275 nm。测定了内蒙紫草、新疆紫草和云南紫草中阿卡宁的含量, 考察了75%乙醇、乙醇、石油醚和液体石蜡对紫草中阿卡宁的提取率; 将阿卡宁0.1 mg · mL<sup>-1</sup>乙醇溶液于冰箱4℃存放, 定期进样测定, 并与新配制时测定的峰面积比较。结果 测定的三种紫草中, 以新疆紫草含量最高; 乙醇和石油醚对阿卡宁的提取率高而75%乙醇和液体石蜡的提取率低; 阿卡宁的乙醇溶液随存放时间的增加而峰面积变小。结论 提取溶剂对紫草中阿卡宁提取率影响较大; 由于阿卡宁溶液的不稳定性, 选择阿卡宁作为评价含紫草药材制剂的指标成分并不合适。

**[关键词]** 紫草;  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁; 提取率; 高效液相色谱法; 稳定性

**[中图分类号]** R284.2; R927.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616(2012)06-26-03

## Extraction and determination of $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin in lithospermum erythrorhizon and study on its stability

XIE Qingchun CHEN Yanzhong LV Zhufen

Institute of Material Medica, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China

**[Abstract] Objective** To determine the  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin in lithospermum erythrorhizon, compare the extracting rate of different solvents to  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin and study the stability of standard  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin solution of alcohol. **Methods** A HPLC method was used to determine the  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin. Dikma Diamonsil C18 chromatogram column(200 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) was used, Acetonitrile-water-Formic acid(700:300:0.5) as mobile phase, flow rate at 1 mL · min<sup>-1</sup>, detection wavelength at 275 nm.  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin in Arnebia euchroma (Royle) Johnst, Arnebia guttata Bunge and Osmia Paniculatum Bur. et Fr. was determined. The extracting rate of four solvents (75% alcohol, alcohol, petroleum ether and liquid paraffin) was studied. The 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> solution of standard  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin was stored at 4 °C in Refrigerator, and was injected to the HPLC system at intervals. **Results** The  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin content in Arnebia euchroma (Royle) Johnst. was the highest. Extracting rate of alcohol and petroleum ether was more than 75% alcohol and Liquid paraffin. The peak area of 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> solution of standard  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin decreased as the storage time extended. **Conclusion** Since the alcohol solution of  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin was unstable, choosing  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin as the index component in formulations concluded Lithospermum erythrorhizon was improper.

**[Key words]** Lithospermum erythrorhizon;  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin; Extracting rate; HPLC; Stability

紫草为紫草科植物新疆紫草<sup>[1]</sup> Arnebia euchroma (Royle) Johnst. 或内蒙紫草 Arnebia guttata Bunge 的干燥根。有些地区也用滇紫草 Osmia Paniculatum Bur. et Fr. 的干燥根<sup>[2]</sup>。紫草具有清热凉血, 活血解毒, 透疹消斑之功效<sup>[1]</sup>。紫草的化学成分和药理活性研究表明, 紫草含有多种生理活性成分, 这些成分具有抗菌抗炎<sup>[3]</sup>、抗生育<sup>[4]</sup>、抗免疫低下、降血糖、保肝护肝脏<sup>[5]</sup>等多种作用。目前对紫草中有效成分能否有效提取及提取后的稳定性, 尚未有深入的研究报道, 本资料重点考察了紫草中的指标成分阿卡宁的提取及其在介质中的稳定性。

<sup>△</sup>通讯作者

## 1 资料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Dionex Ultimate3000 高效液相色谱仪(Dionex Corp.), KQ-300GDV 台式恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), BA110S 电子天平(Sartorius), 冰箱(松下电器有限公司)。 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111689-200502), 新疆紫草、内蒙紫草及滇紫草(批号分别为 20060912-1、20060912-2、20060912-3, 广州致信中药饮片有限公司)经鉴定为正品。乙醇(分析纯, 广州化学试剂厂), 石油醚(60 ~ 90℃, 分析纯、天津致远化学试剂有限公司),

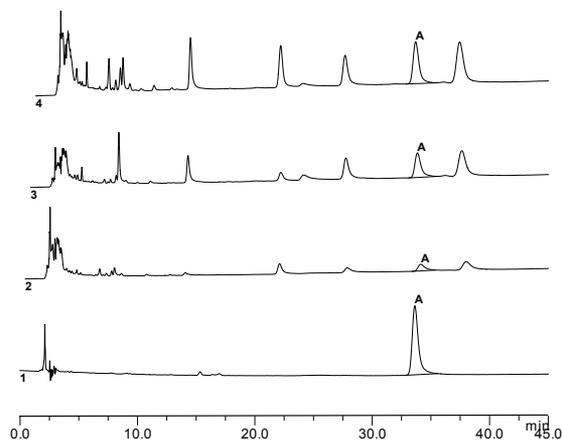
液体石蜡(分析纯、天津致远化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯、广州依能色谱有限公司),水为重蒸水。

## 1.2 含量测定方法

1.2.1 对照品溶液 精密称取阿卡宁对照品适量,加乙醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液即得。

1.2.2 供试品溶液 按中国药典方法,取紫草粉末(过四号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入石油醚(60~90℃)25 mL,称定重量,超声功率250 W,频率33 KHz,30 min,放冷,摇匀,精密称定重量,用石油醚(60~90℃)补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液10 mL,蒸干,残渣加流动相溶解并转移至10 mL量瓶中,加入流动相至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件与系统适用性 以十八烷基键合硅胶为填充剂,以乙腈-水-甲酸(700:300:0.5)为流动相,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长275 nm。在此条件下阿卡宁理论塔板数高于规定要求,对照品和样品的色谱图见图1。



1. 对照品 2. 云南紫草 3. 内蒙紫草 4. 新疆紫草 A. 阿卡宁

图1 色谱图

1.2.4 线性关系考察 精密称定阿卡宁对照品10.854 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,即得标准储备液。精密吸取标准储备液0.05、0.15、0.35、0.50、0.75 mL,置5 mL量瓶中,加流动相溶解,定容至刻度,分别取10 μL进样测定,以峰面积对溶液浓度回归分析,得回归方程为 $A=48.099C-0.0232$ , $r=0.9997$ 。表明在浓度在0.01~0.15 mg/mL范围内,线性关系良好。

1.2.5 精密度试验 取同一新疆紫草供试液10 μL,注入高效液相色谱仪,连续测定5次,记录色谱峰面积,供试品溶液峰面积RSD为1.46%。

1.2.6 重复性试验 取5份同一批次新疆紫草药材粉末各0.5 g,按供试品溶液制备方法处理,测得阿卡宁平均含量为5.421 mg/g, RSD为1.40%,表明此方法重复性良好。

1.2.7 加样回收率试验 取已知含量(5.421 mg/g)的新疆紫草药材粉末0.4 g,精密称定6份,分别精密加入乙酰阿宁对照品2 mg,按“2.1.2 供试品溶液”的制备项下操作至取续滤液10 mL,蒸干,溶解并转移至20 mL的容量瓶中,加流动相稀释至刻度,分别精密吸取10 μL进样测定,测得阿卡宁的平均回收率为97.88%, RSD为2.36%,回收率试验符合要求。

## 2 结果

### 2.1 样品含量测定

取不同品种的紫草药材样品,制备供试品溶液,进样测定,按外标法分别计算阿卡宁的含量<sup>[6]</sup>,结果表明测定的不同品种的紫草中阿卡宁的含量差异较大,其中新疆紫草和内蒙紫草的含量符合规定而云南紫草含量不符合药典“按干燥品计,阿卡宁不得少于0.3%”的规定。见表1。

表1 不同紫草中阿卡宁含量测定结果

名称	含量(mg/g)	含量(%)
云南紫草	0.802	0.08
新疆紫草	5.421	0.54
内蒙紫草	4.936	0.49

### 2.2 阿卡宁对照品的稳定性试验

在实验过程中笔者发现,阿卡宁0.1 mg/mL对照品溶液存放时间越长,色谱峰面积越小,因此笔者对阿卡宁0.1 mg/mL对照品溶液的稳定性进行了研究,存放条件为冰箱中4℃冷藏。见表2。

这表明0.1 mg/mL的阿卡宁不稳定,存放过程中含量降低,因此对照品溶液配制后不可以长期使用。结果也提示,在提取物含有阿卡宁的制剂中,随着制剂存放时间的增加,阿卡宁可能产生含量下降的变化,选择阿卡宁作为此类制剂含量评价指标并不合适<sup>[7]</sup>。

### 2.3 不同溶剂对紫草中阿卡宁提取率

为了比较不同提取溶剂对紫草中阿卡宁提取率,我们采用常用的75%乙醇、乙醇、石油醚和液体石蜡4种提取溶剂对新疆紫草的阿卡宁的提取作了比较,操作方法同1.2.2。

结果采用乙醇或石油醚提取,阿卡宁含量无明显差异,但用75%乙醇或石蜡提取则提取率较低,提示在含紫草的中药制剂中如用上述与两种溶剂提取不利于有效成分的提出。见表3。这可能因为阿卡宁是非极性物质,脂溶性强,75%乙醇极性较大,阿卡宁在75%乙醇中的溶解度较小,液体石蜡虽然为非极性溶剂,但其渗透性差,因而对阿卡宁的提取率也低。

## 3 讨论

本文研究表明液体石蜡对阿卡宁提取率低,实际生产中有些厂家采用液体石蜡提取紫草并不合适。对阿卡宁0.1 mg/mL对照品的乙醇溶液稳定性考察结果显示,阿卡宁乙醇溶液不稳定,

表2 阿卡宁对照品溶液面积随时间变化表

存放时间	0 d	5 d	25 d	60 d	90 d	180 d	270 d	300 d
峰面积(mAu·min)	15.854	15.283	13.475	11.668	9.639	7.958	6.294	5.945
相对面积(%)	100.00	96.40	84.99	73.60	60.80	50.20	39.70	37.50

(下转第34页)

蛋白(LDL)被氧化成轻度氧化低密度脂蛋白时(moxLDL)时可产生大量LPA, moxLDL中含大量LPA,且位于其分子颗粒表面,它实际上是低密度脂蛋白的活性部分<sup>[9]</sup>。

### 3 溶血磷脂酸在缺血性脑血管病中的临床应用

(1)LPA使医生有了一个可以判断体内PLT及其他细胞处于活化状态的指示。LPA使医生有了一个可以判断体内PLT血栓(包括微血栓形成)危险的指示,增加了医生进行干预处理的依据。(2)LPA有助于PLT源性无症状微栓子的诊断。(3)从更深层次上带动了研究人员对临床药物疗效机制的研究。(4)LPA使临床使用抗PLT治疗及疗效判断有了客观根据,如使用时间、停药依据等。

### 4 适宜检测溶血磷脂酸的人群

(1)所有具备缺血性脑血管病(CVD)样症状或疑有CVD症状及体征者,如头痛、头晕、心悸、胸闷、一侧肢体一过性麻木无力等。(2)血脂、血糖、血压或其他相关检查异常者。(3)50岁以上人群(包括更年期人群)可作普查项目。(4)有脑梗卒中家族史者。(5)疑短暂性脑缺血发作(TIA)或脑梗卒中正在接受治疗者定期复查。(6)有过脑梗卒中(包括TIA)病史或冠心病史者。

### 5 检测方法

用特殊的提取液将LPA从血浆中提取,分离后,在相对温和条件下进行消化,用单一的高灵敏显色液进行显色,在636nm波长测定光吸收。与标准对比,计算含量。

该项目的检测已有成品试剂盒。具体操作步骤请参照《与溶血磷脂酸极性相似总磷脂》试剂盒(北京泰福仕科技开发有限公司)操作说明书。

### 6 溶血磷脂酸检测正常参考范围

正常新鲜全血、血浆、脑脊液中几乎检测不到。血清中LPA正常范围:0~2.9 μmol/L;可疑值:3.0~3.2 μmol/L;轻度增高:3.3~4.0 μmol/L;中度增高:4.1~5.0 μmol/L;

重度增高:>5.1 μmol/L。该检测范围由全国卒中预警及早期治疗协作组提供。

LPA在PLT被激活时释放这一性质,构成了它可作为血栓形成早期的预警分子,它的增加不但本身反映一些重要的病理状态。同时,它长时间增高也可以导致重大疾病的发生<sup>[10-11]</sup>。因此,建议各医疗单位特别是医院检验科把LPA作为一项常规检查项目,广泛建立卒中预警中心或扩大现有的预警中心,为临床提供有利的干预时机,以减少一些重大疾病的发生,更好地提高人类健康水平。随着社会的发展,医学的进步,相信人民定会逐渐攻克脑血管疾病。

#### [参考文献]

- [1] 刘译霖. 血栓性疾病的诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 42-43.
- [2] 贾建平. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 9.
- [3] 王新德. 神经病系统血管性疾病[M]. 北京: 人民医学出版社, 2001: 4.
- [4] 邓家德, 李扬, 凌艳英, 等. 脑卒中患者血浆中溶血磷脂酸的检测及意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(12): 1024-1026.
- [5] 李大伟, 陈维. 老年急性脑梗死患者血浆溶血磷脂酸水平的变化[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9): 1672-1673.
- [6] 袁莎莎, 孟庆跃, 王健, 等. 溶血磷脂酸在缺血性脑卒中临床应用的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(11): 1316-1324.
- [7] 王志晔, 张作念, 顾伟, 等. 氯吡格雷对急性脑梗死患者血浆溶血磷脂酸水平的影响[J]. 中国医药, 2009, 4(4): 253-254.
- [8] 崔其福. 溶血磷脂酸与缺血性脑卒中关系的研究现状[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(9): 1079-1082.
- [9] 吴其中, 王大力, 张江. 溶血磷脂酸与急性缺血性脑卒中[J]. 华北煤炭医学院学报, 2009, 11(5): 648-649.
- [10] 王幸, 曹亚芹, 谢全社, 等. 急性缺血性脑卒中患者治疗前后血清溶血磷脂酸变化及意义[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008, 11(3): 30-32.
- [11] 韩威, 作施政. 脑血管病人血浆溶血磷脂酸水平的临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(8): 450-451.

(收稿日期: 2011-12-28)

(上接第27页)

表3 不同溶剂对紫草中阿卡宁提取率

提取溶剂	含量(mg/g)	含量(%)
75%乙醇	1.825	0.19
乙醇	5.385	0.54
石油醚	5.421	0.54
液体石蜡	1.392	0.14

容易降解。预示在制剂中阿卡宁随着存放时间的延长,也可能降解,选择阿卡宁作为含紫草类药材制剂检测的指标成分可能并不合适。尽管药典规定采用阿卡宁作为紫草含量测定的指标成分,但鉴于其在制剂中存在不稳定的可能性<sup>[8]</sup>,建议在含紫草的制剂中选择另一种相对稳定的成分作为检测的指标成分。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 320.

- [2] 张超, 何宝丰, 张庆芝. 昆明滇紫草的生药学研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(7): 32-34.
- [3] 赵雪梅, 邓文, 李莹. 紫草不同提取物抗炎及抑菌作用实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1603-1605.
- [4] 马宝华, 邢鲁军, 王哲民, 等. 中药紫草抗生育作用的研究[J]. 山东医科大学学报, 1993, 31(1): 34-36.
- [5] 刘燕, 买尔旦·马合木提, 尼加提·热合木. 新疆紫草提取物对小鼠急性四氯化碳性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1676-1678.
- [6] 姚闽, 段春玲, 胡蓉, 等. 不同产地及批次的新疆紫草中乙酰阿卡宁的含量测定[J]. 江西医药, 2010, 45(7): 690-691.
- [7] 贺金华, 芦伟华, 王芳, 等. RP-HPLC法同时测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素和β,β'-二甲基丙烯酰紫草素含量的含量[J]. 药物分析, 2010, 30(10): 1849-1851.
- [8] 葛锋, 王晓东, 王玉春, 等. 药用紫草的研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(9): 103-107.

(收稿日期: 2012-02-20)