

# 高效液相色谱-蒸发光散射检测法 测定中药板蓝根中精氨酸的含量

赵宇新, 李曼玲

(中国中医研究院 中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 目的: 建立中药板蓝根中精氨酸的含量测定方法。方法: 以 Luna C<sub>18</sub> (4.6mm × 150mm, 5μm) 色谱柱为固定相, 柱温 25℃; 以水-三氟醋酸 (99.8: 0.2) 为流动相, 流速 0.2ml·min<sup>-1</sup>; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 105℃, 气体流速 3.00L·min<sup>-1</sup>。结果: 精氨酸在 0.504μg~ 2.52μg 范围内线性关系良好,  $r = 0.9992$ 。平均加样回收率为 99.3%,  $RSD = 0.9%$  ( $n = 5$ )。结论: 该方法简便、准确、重复性好。

**关键词:** 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法; 板蓝根; 精氨酸

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)01-0008-02

## Determination of Arginine in *Isatis indigotica* Fort. Using HPLC with Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

ZHAO Yu-xin, LI Man-ling

(Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**Abstract:** Objective: To establish a method for the determination of arginine in *Isatis indigotica* Fort. Method: Chromatography was performed on a 4μm Luna C<sub>18</sub> column (4.6mm × 150mm) at 25℃. The mobile phase was composed of water-trifluoroacetic acid (99.8: 0.2) with a flow rate of 0.2ml·min<sup>-1</sup>. An Alltech-500 evaporative light-scattering detector (USA) was used with a gas flow rate of 3.00 L·min<sup>-1</sup> and tube temperature of 105℃. Result: A good relationship between logarithm of peak area and logarithm of concentration was noted at 0.504μg~ 2.52μg. Average recovery of arginine was 99.30% and the  $RSD$  was 0.87%. Conclusion: It was proved that the method was reliable, simple and accurate.

**Key words:** HPLC-ELSD; *Isatis indigotica* Fort; arginine

板蓝根 (*Isatis indigotica* Fort.) 为常用中药, 具有清热解毒、凉血利咽的功效, 主要用于治疗温毒发斑, 舌绛紫暗, 疔腮, 喉痹, 烂喉丹痧, 大头瘟疫, 丹毒及痈肿等。在《中国药典》2000 年版一部板蓝根项下, 尚无含量测定方法, 仅有以精氨酸为对照品的定性鉴别方法<sup>[1]</sup>。在对板蓝根的成分分析研究中, 鲜见对其水溶性成分的测定。在祖国传统医学中, 板蓝根大多以水煎方式入药, 其水溶性成分中含有多种氨基酸类成分, 本文对其中含量相对较高的精氨酸进行含量测定。从以往的文献报道来看, 此类成分的含量测定多采用氨基酸分析仪或采用衍生化法<sup>[2,3]</sup>。采用氨基酸分析仪进行测定, 样品处理复杂; 柱前或柱后衍生又容易产生误差。由于精氨酸没有紫外吸收, 所以选择了蒸发光散射检测法作为

检测手段, 建立了 HPLC-ELSD 的含量测定方法。

### 1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪, HP3395 积分仪 (美国, 安捷伦公司); Alltech-500 型蒸发光散射检测器 (美国, Alltech 公司); HGA-5000 空气发生器 (北京, 汇龙公司); KQ-100 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器厂)。

试剂甲醇为 GR, 水为自制高纯水, 其他试剂均为 AR。

板蓝根药材为市售, 经鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。精氨酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 经峰面积归一化法检查纯度大于 98%, 符合含量测定要求。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6mm × 150mm, 4μm), 柱温 25℃; 水-三氟醋酸 (99.8: 0.2) 为流动相,

流速  $0.2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度  $105\text{ }^\circ\text{C}$ , 气体流速  $3.00\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。此条件下, 精氨酸和样品中的其他物质可以达到良好的分离。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称定精氨酸对照品  $3.15\text{mg}$ , 置于  $25\text{ml}$  量瓶中, 加  $40\%$  乙醇至刻度, 摇匀, 即得(每  $1\text{ml}$  中含精氨酸  $0.126\text{mg}$ )。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品粉末(过  $40$  目筛)  $0.5\text{g}$ , 精密称定, 置  $50\text{ml}$  具塞锥形瓶中, 精密加入  $40\%$  乙醇  $50\text{ml}$ , 称定重量, 超声处理  $30\text{min}$ , 放至室温, 称定重量, 用  $40\%$  乙醇补足损失的重量, 摇匀, 滤过, 去续滤液过  $0.5\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

**2.4 测定方法** 分别吸取对照品溶液  $5\mu\text{l}$ 、 $15\mu\text{l}$  及供试品溶液  $5\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 将峰面积和进样质量取自然对数后用外标两点法计算供试品的含量。

**2.5 线性关系的考察** 在上述同样色谱条件下, 分别精密吸取对照品溶液( $0.126\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )  $4\mu\text{l}$ 、 $8\mu\text{l}$ 、 $12\mu\text{l}$ 、 $16\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$  注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以精氨酸进样量的常用对数值为横坐标, 以峰面积的常用对数值为纵坐标, 绘制标准曲线并计算回归方程:  $Y = 6.1435 + 1.2805X$ ,  $r = 0.9992$ , 结果表明, 精氨酸在  $0.504\mu\text{g}\sim 2.52\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

**2.6 精密度试验** 精密吸取供试品溶液  $5\mu\text{l}$ , 在上述同一色谱条件下, 连续进样  $5$  次, 测定精氨酸平均含量为  $3.55\%$ ,  $RSD = 0.3\%$ 。证明仪器的精密度良好。

**2.7 重复性试验** 用同一批药材平行制备  $5$  份供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 分别进样  $5\mu\text{l}$ , 测定精氨酸平均含量为  $3.47\%$ ,  $RSD = 0.6\%$ , 方法的重复性符合要求。

**2.8 稳定性试验** 取新鲜制备的供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 在第  $0\text{h}$ 、 $3\text{h}$ 、 $6\text{h}$ 、 $12\text{h}$ 、 $24\text{h}$ 、 $48\text{h}$  分别进样  $5\mu\text{l}$ , 测定精氨酸平均含量为  $3.6\%$ ,  $RSD = 1.3\%$ 。结果表明, 样品中的精氨酸在  $48\text{h}$  内稳定, 可以满足实验要求。

**2.9 回收率试验** 采用加样回收法, 取已知含量 ( $3.47\%$ ) 的板蓝根药材粉末  $0.25\text{g}$ , 精密称定, 分别加入精氨酸对照品, 按上述色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 1。

结果表明, 方法的回收率良好。

**2.10 样品含量测定** 按上述方法, 分别对  $4$  个不同市售的板蓝根饮片中的精氨酸的含量进行测定。

结果见表 2。

表 1 板蓝根中精氨酸的加样回收实验结果

样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
8.67	8.85	17.49	99.6		
8.72	8.85	17.40	98.0		
8.93	8.85	17.70	99.1	99.3	0.9
8.97	8.85	17.77	99.4		
8.69	8.85	17.58	100.4		

表 2 板蓝根样品测定结果

样品编号	精氨酸含量(%)
市售饮片 1	3.2
市售饮片 2	2.4
市售饮片 3	3.0
市售饮片 4	3.5

### 3 小结和讨论

**3.1** 在色谱条件的优化选择过程中, 分别试验了含  $0.2\%$  甲酸的水、含  $0.2\%$  冰醋酸的水及  $0.1\%$  三氟醋酸的水等不同的流动相体系, 最终确定为含  $0.2\%$  的三氟醋酸的水为流动相, 流速  $0.2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**3.2** 在供试品溶液制备过程中, 曾对不同的溶媒进行优选, 通过对水、 $20\%$  乙醇、 $40\%$  乙醇、 $60\%$  乙醇、 $80\%$  乙醇进行比较, 结果以  $40\%$  乙醇对精氨酸的提取效果最好, 故最终确定  $40\%$  乙醇为最佳提取溶媒。通过对超声、回流不同的提取方法进行比较, 采用超声处理的方法既有较好的提取效果, 又简便易行, 所以采用超声处理作为供试品的提取方法。

**3.3** 根据流动相的种类和比例, 通过观察在不同漂移管温度和不同载气流速进样时精氨酸的信号强度, 再结合基线的情况, 最终确定蒸发光散射检测器漂移管温度为  $105\text{ }^\circ\text{C}$ , 气体流速  $3.00\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  为检测的最佳参数。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 163.
- [2] 苗虹, 杨涛, 霍君生, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定食物中氨基酸含量[J]. 分析化学, 2000, 28(9): 1091-1095.
- [3] 王陆黎, 张甲生, 肖国拾, 等. 红景天根中氨基酸含量测定[J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 25(1): 26-27.