

HPLC 法测定青黛中靛蓝和靛玉红的含量的研究

戴富宝 乔传卓 李 玲

(第二军医大学药理学系, 上海)

青黛为爵床科植物马蓝 (*Baphicacanthus cusia* Bremek.)、十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.)、豆科植物野青树 (*Indigofera suffruticosa* Mill.)、蓼科植物蓼蓝 (*Polygonum tinctorium* Ait.) 的叶或茎叶, 经加工制得的干燥粉末或团块。是一种常用中药, 有泻火、解毒、凉血的功效。青黛中的主要化学成分为靛蓝 (indigo) 和靛玉红 (indirubin)。靛玉红治疗慢性粒细胞白血病有较好疗效⁽¹⁾。

青黛中靛蓝和靛玉红的含量测定已有报道。中国药典 (1977 版) 记载高锰酸钾氧化法⁽²⁾ 测定靛蓝含量, 作为质量控制指标; 但此法操作繁冗, 终点不易辨认。也有用纸层析⁽³⁾—柱层析—比色相结合的测定方法⁽⁴⁾; 但操作仍繁琐、费时。最近报道的双波长分光光度法⁽⁵⁾, 虽然可在不分离靛蓝和靛玉红情况下分别测定两组分的含量, 但因杂质的紫外吸收影响数据的准确。

HPLC 法测定青黛中靛蓝和靛玉红含量的方法尚未见报道。该法可排除杂质的干扰, 测得的数据准确可靠, 操作简便、迅速、灵敏、重复性好。

实 验 部 分

一. 药品与试剂

靛蓝标准品 四川中药研究所提供的 E. merck 产品; 靛玉红标准品 四川中药研究所提供; 色胺酮 (tryptanthrin) 标准品 安徽医药科学研究所提供。以上标准品经面积归一化法测试其含量均在 99% 以上。

甲醇 分析纯, 上海振兴化工厂; 水 二次重蒸馏的去离子水。

二. 仪器与条件

P-E 系列 高效液相色谱仪, LC-65 T 可变波长紫外检测器。Rheodyne-7215 进样器, CDMC-1 色谱微处理机, 023 型记录仪。

不锈钢色谱柱 (250 mm 2.6 mm id), 固定相为 LiChrosorb RP-18 (10 μ m), 流动相为甲醇—水 (60:40 V/V); 流速 1.5 ml/min, 紫外检测波长 292 nm, 衰减 2; 纸速 15 cm/HR。

三. 标准液和样品液的制备

1. 靛蓝和靛玉红标准液的配制

精确称取 3.0 mg 靛蓝标准品和 4.0 mg 靛玉红标准品, 分别置于 100 ml 容量瓶, 用氯仿溶解并稀释至刻度, 避光保存。

2. 色胺酮内标液的配制

精确称取 2.0 mg 色胺酮标准品置于 100 ml 容量瓶, 用氯仿溶解并稀释至刻度, 避光保

存。

3. 青黛样品液的制备

取青黛样品适量，研磨成细粉，混匀，于 150°C 干燥 2 h，精确称取 30~80 mg，加氯仿 50 ml，置 80°C 水浴上回流提取 20~30 min；冷水冷却，静置，取出上清液。样品残渣再分次用氯仿提取至无色，合并提取液至 100 ml 容量瓶中，加氯仿至刻度。

四. 测定结果

1. 标准曲线的绘制 取靛蓝和靛玉红标准液 2.0, 1.6, 1.2, 0.8, 0.4 ml，分别置于 5 ml 容量瓶并加入色胺酮内标液 1 ml，用氯仿稀释至刻度，分别配成每 ml 含：靛蓝 12.0, 9.6, 7.2, 4.8, 2.4 μg ，靛玉红 16.0, 12.8, 9.6, 6.2, 3.2 μg ；色胺酮 4 μg 的溶液。进样 30 μl ，以 H_i/H_s 或 A_i/A_s 比值为纵坐标， W_i/W_s 比值为横坐标绘制标准曲线（图 1），测得相关系数：靛蓝为 0.9985；靛玉红为 0.999，线性关系良好。

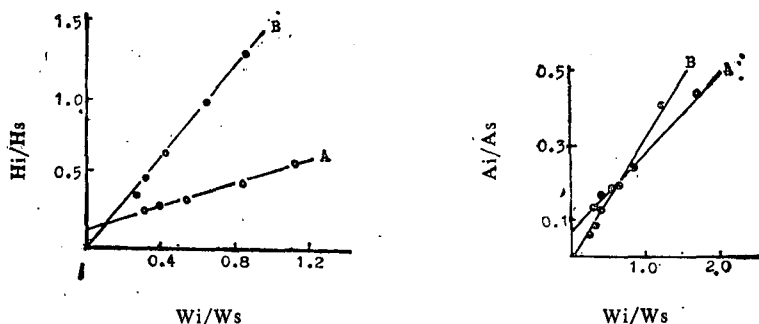


Fig 1. Standard curves of indigo and indirubin.

A. Indigo; B. Indirubin.

$$Y(A) = 0.383X + 0.1349$$

$$r = 0.9985$$

$$Y(B) = 1.58X - 0.0117$$

$$r = 0.999$$

$$Y(A) = 0.222X + 0.0628$$

$$r = 0.999$$

$$Y(B) = 0.334X - 0.019$$

$$r = 0.9999$$

2. 青黛中靛蓝、靛玉红的含量测定

由 CDMC-1 色谱微处理机，用内标法算出标样中靛蓝和靛玉红的校正因子，然后直接算出青黛样品（不同产地）中靛蓝和靛玉红的含量。其结果见表 1。

Tab 1. Results of sample analysis

Sample No	Origin	Content ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
		Indigo	Indirubin
1	Fujian Xianyou	28.03 (n=4, CV=0.53%)	5.83 (n=4, CV=0.46%)
2	Jiangsu Taixing	13.49 (n=4, CV=0.80%)	2.80 (n=4, CV=0%)
3	Sichuan	10.03 (n=4, CV=0.19%)	2.35 (n=4, CV=0.28%)
4	Xian	9.35 (n=4, CV=0.73%)	0.76 (n=4, CV=2.61%)
5	Guangdong	8.91 (n=4, CV=1.42%)	0.85 (n=4, CV=2.3%)

$$f(\text{indigo}) = 0.535 (n=5, CV=0.97\%); f(\text{indirubin}) = 1.509 (n=5, CV=0.90\%)$$

3. 回收率测定

将靛蓝和靛玉红配成不同量的溶液加入青黛中，按样品液制备法操作并测定其浓度，然后计算回收率，结果见表 2。

Tab 2. Recoveries of indigo and indirubin (n=4)

Name	Amount added (μg)	Amount determined (μg)	Recovery(%)	\bar{X}	SD	CV(%)
Indigo	0.288	0.284, 0.293, 0.290	98.61, 101.74, 100.69	100.00	0.99	0.99
	0.216	0.216, 0.221, 0.214	100.00, 102.31, 99.07	100.46	1.36	1.36
	0.144	0.149, 0.147, 0.151	104.17, 102.08, 104.86	103.70	1.44	1.0
	0.072	0.073, 0.071, 0.070	101.38, 98.61, 97.22	99.07	2.11	2.0
Indirubin	0.390	0.395, 0.394, 0.382	101.28, 101.02, 97.94	100.08	1.52	1.5
	0.289	0.291, 0.294, 0.296	100.70, 101.73, 98.96	100.46	1.4	1.0
	0.195	0.190, 0.196, 0.196	97.44, 100.51, 100.51	99.49	1.45	1.45
	0.0975	0.0993, 0.0983, 0.0985	101.84, 100.82, 101.02	101.23	0.54	0.53

讨 论

用岛津 UV-3000 双波长分光光度计检测靛蓝和靛玉红的最大吸收波长。以氯仿为参比, 靛蓝和靛玉红标准液的最大吸收波长分别为 288 nm 和 292 nm(图 2)。

在 100 ml 流动相中, 改变水的体积 (10~50 ml), 40 ml 时, 内标色胺酮与靛蓝、靛玉红分离最佳 (图 3)。

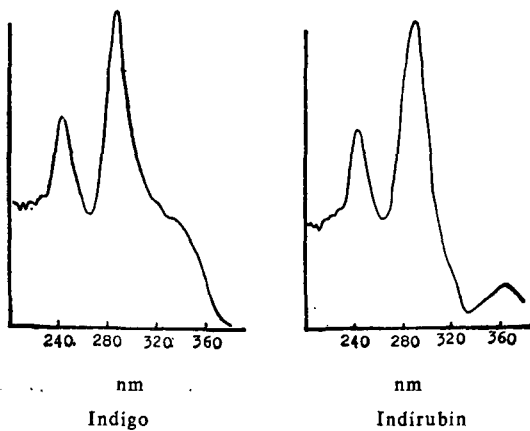


Fig 2. UV spectra of indigo and indirubin

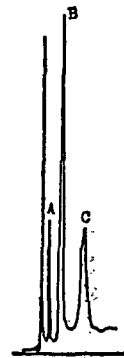


Fig 3. Chromatogram of tryptanthrin(A), indigo(B) and indirubin(C)

本法的内标物曾选用联苯、联苯胺、对甲氧基偶氮苯、偶氮苯、对氨基偶氮苯以及色胺酮。从分离角度考虑色胺酮最宜, 与靛蓝、靛玉红分离较好又较靠近, 见图 3。青黛中可能含有极微量的色胺酮, 但在本法中测试样品时, 未见色胺酮峰出现, 因此可将色胺酮作为内标物。

测定青黛中靛蓝和靛玉红含量时, 靛蓝的变异系数较小而靛玉红的变异系数较大, 这可归因于青黛中靛玉红含量较少的缘故。

致谢 本文承李修禄副教授审阅; 四川中药研究所、安徽医药科学研究所提供标准品; 本系胡敏燕同志测定紫外谱图。

关键词 靛蓝; 靛玉红; 色胺酮; 高效液相层析法

参 考 文 献

1. 吴莲明等. 青黛治疗慢性粒细胞白血病有效成分的研究(I). 中草药通讯 1978; 9:150.

2. 中华人民共和国药典. 1977年版. 一部. 北京, 人民卫生出版社, 1978:320.
3. 赵鲁青. 纸层层析—分光光度法测定中药青黛中靛玉红的含量. 中药通报 1984; 9:78.
4. 邓伯林. 柱层层析—分光光度法测定中药青黛中靛蓝与靛玉红含量. 中草药 1981; 12:251.
5. 张时行等. 双波长分光光度法测定青黛中靛蓝和靛玉红含量的研究. 药学报 1985; 20:301.

DETERMINATION OF INDIGO AND INDIRUBIN IN QINGDAI BY HPLC

DAI Fu-Bao, QIAO Chuan-Zhuo and LI Ling

(Faculty of Pharmacy, Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT A HPLC method has been established to analyze indigo and indirubin in Qingdai under the following conditions. Column: LiChrosorb RP-18 $10\ \mu\text{m}$, $2.6 \times 250\ \text{mm}$; flow rate: $1.5\ \text{ml/min}$; detector: LC-65 T (Perkin-Elmer) at $292\ \text{nm}$; sensitivity: $0.02\ \text{a.u.}$

Tryptanthrin was used as the internal standard and peak height ratio or peak area ratio was used for quantitative determination.

This method showed good linearity ($r=0.999$, $n=5$) in the range of $2.4\sim 12\ \mu\text{g/ml}$. The average recovery of indigo is $99.07\sim 103.70\%$ with $\text{CV}<2\%$ ($n=3$), and that of indirubin is $99.49\sim 101.23\%$ with $\text{CV}<2\%$ ($n=3$).

This method is sensitive, rapid, simple and showed good reproducibility.

Key words Indigo; Indirubin; Tryptanthrin; HPLC