

双波长分光光度法测定青黛中靛蓝和靛玉红含量的研究

张时行 万邦莉*

(江苏省药品检验所, 南京)

提要 本文采用双波长分光光度法不经分离直接测定中药青黛中靛蓝和靛玉红的含量, 并在普通单波长分光光度计上进行双波长法测定。本法操作简便、快速, 准确度和精密度较好, 为青黛的质量控制提供新的分析方法。

关键词 双波长分光光度法; 青黛; 靛蓝; 靛玉红

青黛为十字花科植物靛青(*Isatis indigotica* Fort.)、爵床科植物马蓝(*Baphicacanthus cusia* Bremek.)、豆科植物野青树(*Indigofera suffruticosa* Mill.)和蓼科植物蓼蓝(*Polygonum tinctorium* Ait.)等的叶或茎叶, 经加工制得的干燥粉末或团块, 是一种常用中药, 有清热解毒凉血功效。化学成分主要为靛蓝(indigo)和靛玉红(indirubin)。靛玉红是抗慢性粒细胞白血病的有效成分⁽¹⁾。

关于青黛的质量控制, 中国药典(1977年版)采用高锰酸钾氧化法⁽²⁾测定靛蓝含量作为指标, 但该法操作繁复, 终点难以掌握, 重现性差。有用氯仿提取测定青黛中靛蓝含量的直接比色法⁽³⁾, 但提取液中含有靛蓝、靛玉红和其它少量棕褐色成分, 测定的为其混合物的含量。也有用纸层析法⁽⁴⁾分离后测定青黛中靛玉红含量或用溶剂处理一柱层析—比色相结合的方法⁽⁵⁾测定青黛中靛蓝和靛玉红的含量, 但这些方法都很繁琐、费时, 不够理想。

双波长分光光度法^(6,7)在药物分析上的应用已日渐广泛, 我们应用双波长分光光度计和单波长分光光度计探讨了双波长法在测定青黛中靛蓝和靛玉红含量的应用, 获得了较满意的结果。本法可以在不分离的情况下, 消除共存组分的干扰吸收, 而分别测定两组分的含量, 操作简便快速, 易于掌握, 且准确度和精密度较好。

实 验 部 分

一. 仪器和试剂

岛津UV-300型双波长记录式分光光度计(以下简称UV-300); 国产751-G型分光光度计(以下简称751-G)。

靛玉红对照品, 自青黛中提取分离精制所得的纯品, 并经鉴定⁽⁸⁾。靛蓝对照品, E. Merck, 经重新精制, 薄层检查呈单一色点。青黛样品: 江苏省如皋县等地的产品, 原植物经本所滕建昌同志鉴定为十字花科植物靛青(*Isatis indigotica* Fort.)。氯仿等均为分析试剂。

二. 实验条件的选择

本文于1984年9月7日收到

* 南京中医学院中药系84届毕业生

1. 吸收曲线 分别取一定浓度的靛蓝和靛玉红的氯仿溶液,以氯仿为空白,在UV-300型仪上用同一张记录纸分别绘制吸收光谱,结果见图1。

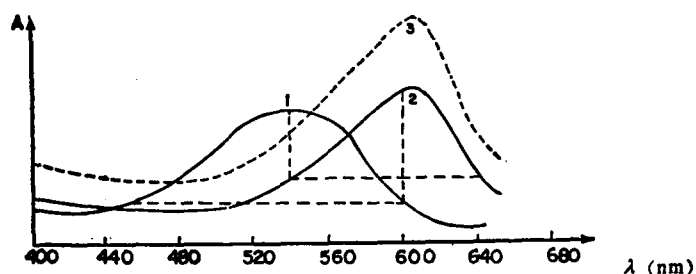


Fig 1. Absorption spectrum of indirubin and indigo in chloroform. 1. Indirubin (10.9 $\mu\text{g/ml}$) 2. Indigo (9.8 $\mu\text{g/ml}$) 3. Mixture (indirubin+indigo)

2. 测定波长的选择 分别配制五个不同浓度的靛玉红和靛蓝的氯仿溶液,在UV-300型仪上分别按作图法、一波长固定一波长扫描法⁽⁹⁾和精密选定法⁽¹⁰⁾进行试验,确定测定靛蓝时采用波长组合为601~450 nm,测定靛玉红时采用538~638 nm。其一波长固定一波长扫描的吸收光谱见图2及图3。在751-G型仪上仍用上述溶液进行试验,结果表明可采用上述波长组合进行测定。

三. 标准曲线的绘制

精密称取经105°C干燥至恒重的靛蓝对照品约7 mg和靛玉红对照品约10 mg,分别置250 ml容量瓶中,各加入氯仿适量,于80°C左右的水浴上振摇使溶解,放冷,用氯仿稀释至刻度,摇匀。以这两种标准溶液按一定比例配制成不同浓度的混合溶液,按上述选定条件分别在UV-300和751-G型仪上进行测定,结果见表1及表2。

Tab 1. Data for standard curve of indigo

| Exp No. | Standard solution ($\mu\text{g/ml}$) | UV-300 | 751-G | | |
|---------|--|------------|-------|-------|------------|
| | | ΔA | A_1 | A_2 | ΔA |
| 1 | 2.56 | 0.200 | 0.244 | 0.034 | 0.210 |
| 2 | 5.12 | 0.316 | | | |
| 3 | 7.68 | 0.392 | 0.483 | 0.079 | 0.404 |
| 4 | 10.24 | 0.460 | 0.574 | 0.110 | 0.464 |
| 5 | 12.80 | 0.497 | 0.631 | 0.134 | 0.497 |
| 6 | 15.36 | 0.563 | 0.711 | 0.157 | 0.554 |
| 7 | 17.92 | 0.618 | 0.780 | 0.174 | 0.606 |

Tab 2. Data for standard curve of indirubin

| Exp No. | Standard solution ($\mu\text{g/ml}$) | UV-300 | 751-G | | |
|---------|--|------------|-------|-------|------------|
| | | ΔA | A_1 | A_2 | ΔA |
| 1 | 4.08 | 0.081 | 0.087 | 0.009 | 0.078 |
| 2 | 8.16 | 0.163 | 0.170 | 0.013 | 0.157 |
| 3 | 12.24 | 0.243 | 0.251 | 0.018 | 0.233 |
| 4 | 16.32 | 0.324 | 0.319 | 0.027 | 0.292 |
| 5 | 20.40 | 0.406 | 0.410 | 0.026 | 0.384 |
| 6 | 24.48 | 0.489 | | | |

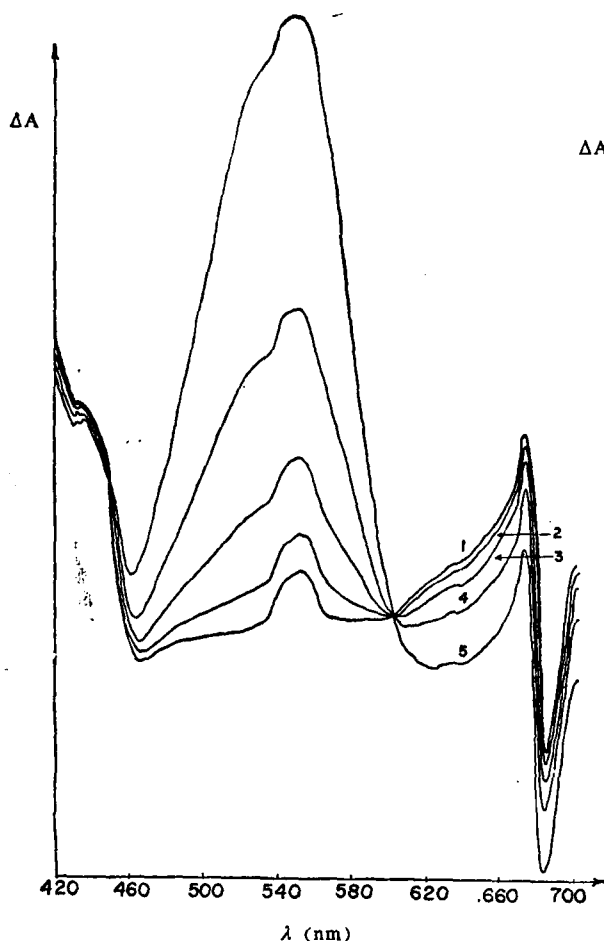


Fig 2. Selection of λ_1 and λ_2 with λ_2 fixed (601 nm) and λ_1 as the scanning wavelength. Indirubin concentration: 1. 1.925 $\mu\text{g/ml}$ 2. 3.850 $\mu\text{g/ml}$ 3. 7.70 $\mu\text{g/ml}$ 4. 15.40 $\mu\text{g/ml}$ 5. 30.80 $\mu\text{g/ml}$

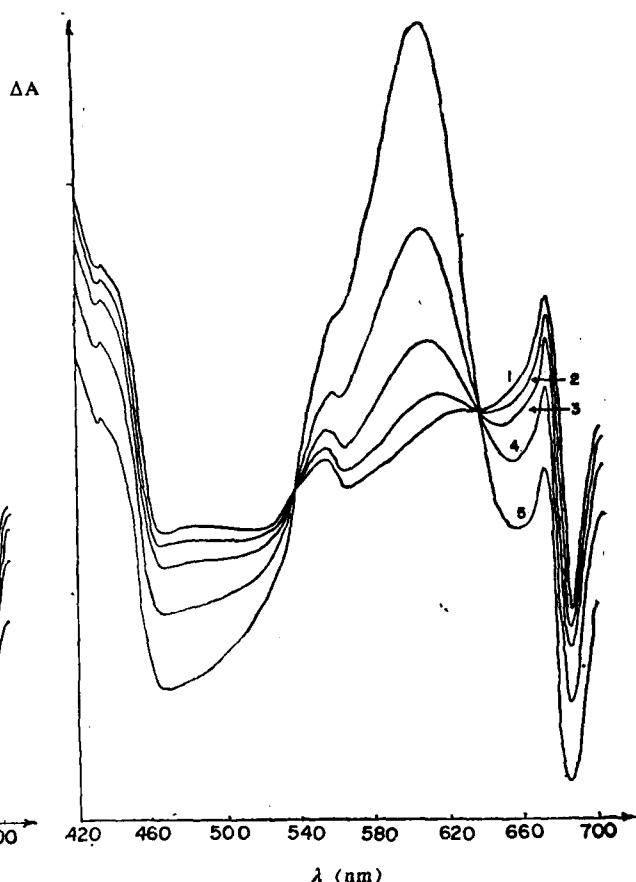


Fig 3. Selection of λ_1 and λ_2 with λ_2 fixed (538 nm) and λ_1 as the scanning wavelength. Indigo concentration: 1. 2.468 $\mu\text{g/ml}$ 2. 4.935 $\mu\text{g/ml}$ 3. 9.870 $\mu\text{g/ml}$ 4. 19.74 $\mu\text{g/ml}$ 5. 39.48 $\mu\text{g/ml}$

按回归处理原则，将测得数据进行数学处理，求得回归方程如下：

| | | | |
|-----|--------|--------------------------------------|--------------|
| 靛 蓝 | UV-300 | $\Delta A = 0.1704 + 0.02585 C$ | $r = 0.9882$ |
| | 751-G | $\Delta A = 0.18147 + 0.02473 C$ | $r = 0.9816$ |
| 靛玉红 | UV-300 | $\Delta A = 0.00003023 + 0.019882 C$ | $r = 0.9999$ |
| | 751-G | $\Delta A = 0.0033395 + 0.018398 C$ | $r = 0.9989$ |

四. 回收率

精密量取一定量的靛蓝和靛玉红标准溶液，再加入已知靛蓝和靛玉红含量的青黛样品，按样品测定项下的操作方法提取测定，分别求算靛蓝和靛玉红两组分的加样回收率，结果见表 3。

五. 样品测定

取青黛样品适量，研磨成细粉，混匀，于 105°C 干燥 2 小时，精密称取 20~50 mg，加氯仿 50 ml，于 80°C 左右水浴上回流提取 20~30 分钟，冷水冷却，静置，取出上清液，样品残渣再分次用适量氯仿提取至提取液无色，合并提取液置 100 ml 容量瓶中，加氯仿至刻

Tab 3. Recovery of indigo and indirubin added to crude drugs

| Exp No. | Added (μg) | UV-300 | | | | | | 751-G | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|----------------------------|------------|-------------------------|----------|---------------|--------|----------------------------|-------|-------|------------|-------------------------|----------|---------------|--------|------|
| | | Original (μg) | ΔA | Found (μg) | Rec. (%) | \bar{X} (%) | CV (%) | Original (μg) | A_1 | A_2 | ΔA | Found (μg) | Rec. (%) | \bar{X} (%) | CV (%) | |
| (A) | 1 | 236.5 | 423.4 | 0.34 | 232.7 | 98.39 | 99.62 | 2.80 | 423.4 | 0.412 | 0.067 | 0.345 | 237.9 | 100.6 | 100.7 | 1.70 |
| | 2 | 236.5 | 423.4 | 0.343 | 244.3 | 103.3 | | | 423.4 | 0.414 | 0.070 | 0.344 | 233.8 | 98.96 | | |
| | 3 | 473.0 | 376.3 | 0.390 | 473.2 | 100.0 | | | 376.3 | 0.441 | 0.046 | 0.395 | 487.1 | 103.0 | | |
| | 4 | 473.0 | 376.3 | 0.386 | 457.5 | 96.77 | | | 376.3 | 0.443 | 0.051 | 0.392 | 475.0 | 100.4 | | |
| (B) | 1 | 340.0 | 58.7 | 0.078 | 333.5 | 98.09 | 99.74 | 1.25 | 71.7 | 0.195 | 0.115 | 0.080 | 345.0 | 101.5 | 100.9 | 2.39 |
| | 2 | 340.0 | 58.7 | 0.080 | 343.5 | 101.0 | | | 71.7 | 0.191 | 0.113 | 0.078 | 334.1 | 98.26 | | |
| | 3 | 680.0 | 52.2 | 0.146 | 682.0 | 100.3 | | | 63.7 | 0.252 | 0.112 | 0.140 | 679.1 | 99.87 | | |
| | 4 | 680.0 | 52.2 | 0.145 | 677.0 | 99.55 | | | 63.7 | 0.258 | 0.113 | 0.145 | 706.3 | 103.9 | | |

(A) indigo; (B) indirubin

度, 摇匀, 依法测定, 分别求得靛蓝和靛玉红两组分的百分含量, 结果见表 4。

Tab 4. Results of sample analysis

| Sample No. | Origin | Dual-wavelength spectrophotometry | | | | Method of Chinese Pharmacopoeia (1977) content of indigo (%) |
|------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--|
| | | UV-300 | | 751-G | | |
| | | Content of indigo (%) | Content of indirubin (%) | Content of indigo (%) | Content of indirubin (%) | |
| 1 | Jiangsu Rugao | 1.60 | 0.46 | 1.24 | 0.45 | 0.89 |
| 2 | Jiangsu Rugao | 3.12 | 0.51 | 3.03 | 0.53 | 2.36 |
| 3 | Jiangsu Taixian | 1.82 | 0.55 | 1.56 | 0.55 | 1.27 |
| 4 | Jiangsu Taixian | 2.21 | 0.39 | 2.28 | 0.37 | 1.34 |
| 5 | Jiangsu Wujin | 3.54 | 0.28 | 3.42 | 0.31 | 2.71 |

讨 论

1. 鉴于双波长分光光度计在国内尚未普及, 根据等吸收的原理探讨了在普通单波长分光光度计上进行双波长法的测定, 结果可行, 有利于双波长法的推广应用。

2. 等吸收波长的选择必须注意满足两个基本条件: (1) 共存(干扰)组分在所选波长处的吸收值相等; (2) 被测组分在所选波长处的吸收值差应足够大。为确保共存组分的 $\Delta A = 0$, 在精密选定测定波长及参比波长组合时, 应该配制几个浓度的标准溶液进行测试。另外, 所选测定波长与参比波长应尽可能地靠近, 以保证两波长处的光散射或背景吸收等接近相等。

3. 靛玉红的氯仿溶液呈色稳定, 在 8 小时内保持不变, 而靛蓝的氯仿溶液稳定性较差, 但在制备后 2 小时内对测定结果无影响。

4. 应用本法测定了我省所产青黛样品五批, 并与中国药典法比较。结果表明, 本法测定结果较药典法为高。曾用靛蓝纯品进行试验, 则两种方法测定结果基本相符。因市售青黛含有大量碳酸盐等杂质, 对磺化反应有影响, 造成药典法结果偏低, 误差大。另外青黛中靛玉红对滴定终点有干扰, 高锰酸钾先氧化靛蓝后氧化靛玉红, 溶液先由蓝色变为污绿色或棕色, 继续滴定时, 当靛蓝的蓝色消失时, 溶液呈绯红色, 很难区别是高锰酸钾过量或是靛玉红的颜色, 终点不明确, 很难掌握, 因而造成误差, 且药典法操作繁复, 冗长, 因此建议药典会

应对该法进行研究改进。

致谢 本所仪器室王桂珍、杨钻芷同志协助双波长仪器测定；药材原植物由中药室滕建昌同志鉴定。

参 考 文 献

1. 吴连明等. 青黛治疗慢性粒细胞白血病有效成分的研究(I)报. 中草药通讯 1978;9:150.
2. 中华人民共和国药典. 1977年版(一部). 1979:320.
3. 上海医工院中药分析研究室. 青黛中靛蓝含量测定方法的改进. 药学通报 1979; 14:205.
4. 赵鲁青. 纸层层析一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.
5. 邓伯林. 柱层层析一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.
6. 柴田正三, 他. 二波长分光光度法とその応用. 講談社サイエンティファイブ, 1979:100.
7. 曹雨震. 双波长分光光度法的基本原理及其在药品检验中的应用. 药学通报 1981; 16:751.
8. 张时行. 靛青根化学成分的研究. 中草药 1983; 14:248.
9. 柴田正三、古川正道. 二波长分光测光法の基礎と応用. 分析化学 1974;23:1548.
10. Porro T.J. Double-wavelength spectroscopy. *Anal Chem* 1972; 44:99 A.

DETERMINATION OF INDIGO AND INDIRUBIN IN QINGDAI (*ISATIS INDIGOTICA* FORT.) BY DUAL WAVELENGTH SPECTROPHOTOMETRY

ZHANG Shi-Hang and WAN Bang-Li

(*Jiangsu Provincial Institute for Drug Control, Nanjing*)

ABSTRACT The present paper is concerned with the application of dual wavelength spectrophotometry to the determination of indigo and indirubin in Qingdai (*Isatis indigotica* Fort.) without preliminary separation. Satisfactory results were obtained. The average recovery of indigo was 99.62~100.7% with $CV < 2.80\%$, that of indirubin was 99.74~100.9% with $CV < 2.39\%$. Five batches of samples were determined, the results were compared with those obtained by the method of Chinese Pharmacopoeia (1977). The method described is simple, rapid and accurate.

Key words Dual wavelength spectrophotometry; Qingdai (*Isatis indigotica* Fort.); Indigo; Indirubin