

HPLC测定青黛中的靛蓝和靛玉红

谌立巍, 廖婉, 杨明, 贾东艳, 何鹏, 陈思敏, 傅超美
(成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 建立青黛中靛蓝和靛玉红含量的测定方法。方法 采用 HPLC法定量分析, 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 水 (80 : 20), 流速为 1.0 ml·min⁻¹, 柱温为 30 ; 靛蓝的检测波长为 287 nm, 靛玉红的为 292 nm。结果 靛蓝 0.07 ~ 0.52 μg (r = 0.9996)、靛玉红 0.02 ~ 0.20 μg (r = 0.9999) 与峰面积的线性关系良好 (r = 0.9996), 其平均回收率分别为 100.9% (RSD = 1.42%, n = 6)、101.3% (RSD = 1.87%, n = 6)。结论 所建方法可用于青黛中靛蓝和靛玉红的含量测定, 为完善青黛的质量标准提供了依据。

关键词: 青黛; 靛蓝; 靛玉红; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2008) 06 - 0714 - 02

Determination of indigo and indirubin in Indigo Naturalis by HPLC

CHEN Li - wei, LIAO Wan, YANG Ming, JIA Dong - yan, HE Peng, CHEN Si - min, FU Chao - mei
(Pharmacy College of Chengdu University of TCM, Chengdu 611730, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To determine the contents of indigo and indirubin in *Indigo Naturalis*. **METHODS** The contents of indigo and indirubin were determined by HPLC. The chromatographic column was Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol - water (80 : 20). The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ with detection wavelength of 287 nm for indigo and 292 nm for indirubin. **RESULTS** The linear correlation of the indigo was good in the range of 0.07 - 0.52 μg and the recovery was 100.9% with RSD of 1.42% (n = 6). The linear correlation of the indirubin was good in the range of 0.02 - 0.20 μg and the recovery was 101.3% with RSD of 1.87% (n = 6). **CONCLUSION** The method can be applied to determine the contents of indigo and indirubin in *Indigo Naturalis*. It can ensure the stability of the quality control of *Indigo Naturalis*.

Key words: Indigo Naturalis; Indigo; Indirubin; HPLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2008) 06 - 0714 - 02

青黛作为常用中药饮片, 具有清热解毒、凉血、定惊的功效, 主要用于温毒发斑、血热吐血、胸痛咳血、口疮、疔瘡、喉痹、小儿惊痫的治疗。文献^[1]中的青黛为爵床科植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek、蓼科植物蓼蓝 *Polygonum tinctorum* Ait 或十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort 的叶或茎叶经加工制得的干燥粉末或团块。靛蓝 (indigo)、靛玉红 (indirubin) 是青黛的主要有效成分, 两者为同分异构体^[2]。因此, 参考文献^[3], 采用 HPLC 法测定青黛中的靛蓝和靛玉红, 制定了相应的含量测定限度, 为提高青黛的质量标准提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 LC - 10AT 型高效液相色谱仪系统 (日本岛津)。靛蓝对照品 (批号: 110716 - 200509)、靛玉红对照品 (批号: 110717 - 200204) (中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯; 青黛样品 (四川江油恒源药业集团有

限公司) 均为爵床科植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek, 来源于马蓝道地产区四川省江油市太平镇让水村、大康镇星火村、因明村, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定, 符合 1990 年版《广西中药材标准》马蓝项下的有关规定。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 - 水 (80 : 20); 流速为 1.0 ml·min⁻¹; 柱温为 30 ; 靛蓝的检测波长为 287 nm, 靛玉红的为 292 nm。理论板数分别按靛蓝峰和靛玉红峰计算均应不低于 3 × 10³。

1.2.2 溶液的制备 取 11.65 mg 靛蓝对照品, 精密称定, 加二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解并稀释成 35 μg·ml⁻¹ 的靛蓝对照品溶液。另取 10.01 mg 靛玉红对照品, 精密称定, 加 DMF 溶解并稀释成 10 μg·ml⁻¹ 的靛玉红对照品溶液。取 0.1 g 青黛样品, 加 75 ml DMF, 精密称定, 超声处理 (250 W, 33 kHz) 30 min, 补足减失的重量, 过滤; 精密吸取 3 ml 续滤液,

作者简介: 谌立巍 (1973 -), 男, 四川西昌, 硕士, 讲师, 从事中药新制剂、新剂型的研究。E - mail: suwwei@tcm.com

用 DMF定容至 10 ml的量瓶中,即得靛蓝供试品溶液;精密吸取 6 ml续滤液,用 DMF定容至 10 ml的量瓶中,即得靛玉红供试品溶液。

1.2.3 阴性干扰试验 分别吸取 10 μ l DMF,按“1.2.2 的方法制成阴性溶液、靛蓝、靛玉红对照品溶液和供试品溶液,进样。在靛蓝、靛玉红对照品相应色谱峰位置处无其他色谱峰出现(图 1)。

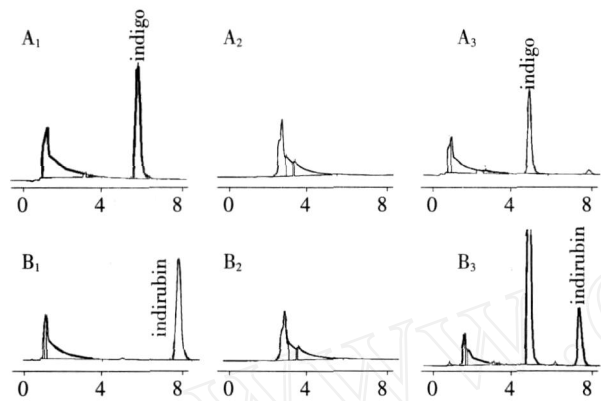


图 1 靛蓝、靛玉红对照品溶液 (A₁、B₁)、阴性供试品溶液 (A₂、B₂) 和供试品溶液 (A₃、B₃) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of indigo and indirubin control solution (A₁, B₁), negative solution (A₂, B₂) and sample solution (A₃, B₃)

1.2.4 线性关系的考察 精密吸取 2、4、6、8、10、12、15 μ l 35 μ g·ml⁻¹靛蓝对照品溶液,依次进样,按“1.2.1 项的色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标、靛蓝进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $Y_{\text{靛蓝}} = 2.000 \times 10^6 X - 5.406 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明,靛蓝 0.07 ~ 0.52 μ g 与峰面积呈良好的线性关系。精密吸取 2、4、6、8、10、12、15、20 μ l 10 μ g·ml⁻¹靛玉红对照品溶液,依次进样,同法操作,得回归方程为: $Y_{\text{靛玉红}} = 1.366 \times 10^6 X - 2.320 \times 10^4$ ($r = 0.9996$)。结果表明,靛玉红 0.02 ~ 0.20 μ g 与峰面积呈良好的线性关系。

1.2.5 稳定性试验 取青黛样品溶液,配制后于 0、2、4、6、8 h 时分别进样,记录峰面积值,测定靛蓝和靛玉红峰面积的 RSD 分别为 1.97%、0.81%。结果表明,供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

1.2.6 精密度试验 分别精密吸取 10 μ l 靛蓝、靛玉红对照品溶液,进样,重复 6 次,计算峰面积。靛蓝、靛玉红峰面积的 RSD 分别为 0.59%、1.30%。表明仪器精密度良好。

1.2.7 重复性试验 取同一批样品 6 份,分别按“1.2.9 项的方法测定。靛蓝的平均含量为 6.83%, RSD = 1.92%; 靛玉红的平均含量为 0.14%, RSD = 0.90%。

1.2.8 回收率试验 精密称取约 50 mg 已知含量

的样品(靛蓝含量为 6.83%),精密加入靛蓝对照品溶液适量,按“1.2.2 项的方法制备供试品溶液,计算回收率。测得靛蓝的平均回收率为 100.9%, RSD = 1.42% (表 1)。精密称取约 500 mg 已知含量的样品(靛玉红含量为 0.14%),精密加入靛玉红对照品溶液适量,按“1.2.2 项的方法制备供试品溶液,计算回收率,测得靛玉红的平均回收率为 101.4%, RSD = 1.87% (表 1)。

表 1 靛蓝和靛玉红的加样回收率结果 (mg, n = 6)

Table 1 Results of recovery test of indigo and indirubin (mg, n = 6)

Component	Original	Added	Detected	Recovery/%	$\bar{X}/\%$	RSD/%
Indigo	3.4287	3.3690	6.8760	102.3	100.9	1.42
	3.4218	3.3690	6.8913	103.0		
	3.3809	3.3690	6.6177	96.08		
	3.4150	3.3690	6.6745	96.75		
	3.4423	3.3690	6.9093	102.9		
	3.4423	3.3690	6.9581	104.4		
Indirubin	0.7305	0.721	1.4736	103.1	101.3	1.87
	0.7298	0.721	1.4695	102.6		
	0.7249	0.721	1.4512	100.7		
	0.7238	0.721	1.4375	99.0		
	0.7287	0.721	1.4728	103.2		
	0.7242	0.721	1.4404	99.3		

1.2.9 样品的测定 取 10 批青黛样品进行测定。分别精密吸取 10 μ l 对照品溶液与供试品溶液,按“1.2.1 项的色谱条件测定,以外标法计算含量。10 批青黛中靛蓝的平均含量为 6.72%、靛玉红的为 0.14%。考虑到药材产地、加工、贮藏等因素,并参考文献^[3]青黛项下的有关规定,暂定青黛中靛蓝和靛玉红的含量不得低于平均含量的 80%,即应不低于 5.3%、0.13%。

2 讨论

试验发现,同时测定青黛中靛蓝和靛玉红时,峰面积相差约 15 倍,可能造成积分误差大,无法准确计算其含量,故选择文中方法测定。作者曾用文献^[1]青黛项下的方法测定靛蓝的含量,灵敏度低、重复性差、误差大。故选用 HPLC 法测定靛蓝、靛玉红,可为《中国药典》青黛质量标准的修订提供科学依据。

靛蓝和靛玉红互为同分异构体,对光线较敏感,在样品提取和测定过程中应注意避光操作。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005

[2] 罗巍伟,贺英菊,王凌,等. HPLC测定板蓝根提取物中靛蓝和靛玉红的含量[J]. 华西药理学杂志,2004,19(6): 455 - 456

[3] 王艳,杨明. 靛蓝与异构体靛玉红的量子化学研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2004,41(1): 143 - 147.

收稿日期:2008 - 03