

板蓝根、大青叶中靛蓝和靛玉红的测定方法比较

董娟娥^a, 龚明贵^a, 梁宗锁^b

(西北农林科技大学 a 林学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了筛选出合适的测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红含量的方法, 对比、分析了高效液相色谱法、双波长分光光度法和薄层扫描法测定的稳定性、精密度和加标回收率等。结果表明, 高效液相色谱法测定靛蓝、靛玉红含量的各项指标均优于其他方法; 双波长分光光度法由于无法排除提取液中其他成分对靛蓝、靛玉红的干扰, 使得测定结果偏高; 薄层扫描法不适用于板蓝根中靛蓝、靛玉红含量的测定, 而可用于大青叶中这2种成分的定量, 但测定必须在薄层板展开后3 h内完成。可见3种分析方法各有优缺点, 可用于不同精度下对靛蓝、靛玉红含量的测定。

[关键词] 板蓝根; 大青叶; 靛蓝; 靛玉红; 测定方法

[中图分类号] O 655

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0215-05

Comparison of three methods of measuring indigo and indirubin in radix isatidis and folium isatidis

DONG Juan-e^a, GONG Ming-gui^a, LIANG Zong-suo^b

(a College of Forestry; b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to obtain the suitable measure to select indigo and indirubin contained in radix isatidis and folium isatidis, three methods i.e., HPLC, DW SP and TLCS were compared from the aspects of stability, precision and recovery. The results are as follows: The HPLC is the best one. The DW SP makes the results higher than true due to the interference of the impurities. The TLCS is not suitable to measure the contents of indigo and indirubin in radix isatidis, but suitable in folium isatidis if the test can be accomplished within three hours after the development of two constituents. Each of the three methods has its advantages and disadvantages and can be adopted in different precisions.

Key words: radix isatidis; folium isatidis; indigo; indirubin; measurement

板蓝根和大青叶为十字花科(Cruciferae)菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的不同部位, 具有清热解毒、凉血、消斑的功效, 主治温病发热、发斑、发疹、风热感冒、咽喉肿痛、流行性脑脊髓膜炎、乙型脑炎、肝炎、腮腺炎、丹毒、痛肿等症^[1], 是常用的大宗中药材。近年来, 许多学者为探明板蓝根、大青叶的治病机理, 对其化学成分进行了研究, 发现其主要成分为生物碱类、有机酸类及苷类化合物等^[2-3], 并尝试以化学成分作为其质量控制指标, 加强对板蓝根、大青叶及其制剂的质量控制, 其中包括靛蓝、靛玉红、有

机酸类、氨基酸类、尿苷、腺苷等化学成分。目前, 对板蓝根中是否含有靛蓝、靛玉红以及以何种成分作为板蓝根及其制剂的质量控制指标尚没有一致的观点^[4-8], 对靛蓝、靛玉红含量的测定方法虽有文献报道^[9-10], 但尚未见对这些方法进行系统比较研究的报道。针对上述情况, 本研究对板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红含量测定的常用方法进行了系统研究, 并比较了各种方法的优缺点, 以便使测定结果更能真实、客观地反映板蓝根、大青叶质量的优劣。

° [收稿日期] 2006-01-09

[基金项目] 陕西省“十五”科技攻关项目(2001KG01-G15-03); 中科麦迪森天然药物有限公司中药现代化项目

[作者简介] 董娟娥(1968-), 女, 陕西蒲城人, 副教授, 在读博士, 主要从事天然产物提取和中药现代化理论与技术研究。

1 材料、仪器与试剂

1.1 试验材料

试验所用板蓝根、大青叶分别于2004-04和2004-09采自陕西汉阴板蓝根规范化种植基地(GAP基地)。样品采集后置烘箱内60℃鼓风干燥至恒重,粉碎,过0.36 mm筛,备用。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:高效液相色谱仪(LC-10ATVP型,日本岛津),紫外-可见分光光度计(UV-2000,上海尤尼可公司),双波长薄层扫描仪(KAMAG scanner 3,瑞士卡玛公司),半自动点样仪(Linomat 5,瑞士卡玛公司)。

试剂:高效液相色谱所用甲醇为色谱纯(美国Fisher公司),水为双蒸水,靛蓝、靛玉红标准品(中国药品生物制品检定所),薄层层析用硅胶(青岛海洋化工有限公司),羧甲基纤维素钠(天津市博迪化工有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱法(HPLC) (1) 色谱条件。流动相:甲醇-水(体积比为75:25);色谱柱:C₁₈ ODS反相柱(Shimadzu) 4.6 mm × 150 mm; SPD-10A vp 紫外检测器;检测波长:λ=280 nm;流速:1 mL/min;柱温:25℃。(2) 标准曲线绘制。精密称取于60℃烘箱干燥至恒重的靛玉红标准品4.4 mg,靛蓝标准品1.9 mg,置于25 mL棕色容量瓶中,用氯仿稀释至刻度作为标准品溶液。分别精密吸取靛蓝、靛玉红标准溶液1, 2, 4, 6, 8, 10和12 μL注入高效液相色谱仪,以色谱峰面积和对应的浓度拟合出回归方程。(3) 待测样品提取液的制备。分别精确称取备用板蓝根样品2 g,大青叶样品0.5 g,置于150 mL平底烧瓶中,加入100 mL氯仿,于80℃水浴中索氏提取(板蓝根提取8 h,大青叶提取12 h),浓缩提取液,氯仿定容至25 mL,用高效液相色谱仪测定靛蓝、靛玉红含量。(4) 稳定性试验。精密吸取靛蓝、靛玉红标准品溶液5 μL,每隔2 h用高效液相色谱仪测定1次,共测5次后,过24 h再测定1次。(5) 精密度试验。精密吸取靛蓝、靛玉红标准品溶液5 μL,注入高效液相色谱仪,测定标准品溶液浓度,重复6次。(6) 加标回收率试验。精密称取大青叶粗粉8份(每份0.5 g)进行提取,其中4份提取液中加入12.40 μg的靛蓝标准品,另4份加入12.50 μg的靛玉红标准品,高效液相色谱法测定含量,计算回收率。(7) 靛蓝、靛玉红

标准添加液的配制。精确称取靛蓝标准品1.24 mg,靛玉红标准品1.25 mg,用氯仿溶解于50 mL容量瓶中,配制成含靛蓝0.024 8 mg/mL、靛玉红0.025 0 mg/mL的标准品溶液,作为标准添加液。

1.3.2 双波长分光光度法(DWSP) (1) 标准品溶液的制备。依1.3.1中标准品溶液配制方法操作。(2) 待测样溶液的制备。依1.3.1中待测样溶液配制方法制备。(3) 靛蓝、靛玉红含量的测定。以氯仿为对照,在一定波长下测定待测样溶液的吸光度,由公式计算出待测样溶液中靛蓝、靛玉红的含量^[5]。(4) 最大吸收波长的确定。以氯仿作空白样,将标准溶液置于1 cm石英比色皿中,用分光光度计在230~800 nm变化波长,测定吸光度,确定最大吸收波长。(5) 稳定性试验。以氯仿为空白对照,分别于波长608和544 nm处测定靛蓝、靛玉红标准品溶液浓度,每隔2 h比色测定1次,测定5次后,过24 h再测定1次。(6) 精密度试验。以氯仿为空白,分别于波长608和544 nm处测定靛蓝、靛玉红标准品溶液浓度,重复6次。(7) 加标回收率试验。依1.3.1中描述的方法进行提取、加样,分光光度法测定含量,计算回收率。

1.3.3 薄层扫描法(TLCS) (1) 待测样溶液的制备。依1.3.1中相应方法操作。(2) 标准品溶液的制备。精密称取在60℃烘箱中干燥至恒重的靛蓝、靛玉红标准品,用乙醇-氯仿溶液(体积比40:60)制成0.1 mg/mL对照液。(3) 薄层色谱条件。参照《中国药典》中描述的方法^[11]。(4) 点样、扫描与计算。精密吸取待测样溶液5 μL,标准品溶液2 μL和7 μL,用半自动点样仪分别交叉点于同一硅胶薄层板上,展开后进行双波长反射法锯齿扫描,测量待测样品溶液吸收度积分值与标准品吸收度积分值,计算含量。(5) 稳定性试验。精密吸取标准品溶液5 μL点于硅胶薄层板上,展开,扫描测定,计算浓度。(6) 精密度试验。薄层板上点标准品溶液7点,每点5 μL,展开,扫描,计算浓度。(7) 加标回收率试验。参照1.3.1方法进行提取、加样,薄层扫描法测定含量,求出加标回收率。(8) 靛蓝、靛玉红标准添加液的配制。参照1.3.1中描述的方法配制。

2 结果与分析

2.1 3种检测方法的测定条件与计算结果

2.1.1 高效液相色谱法 用高效液相色谱仪测得已知浓度靛蓝、靛玉红标准品对应的色谱峰面积值,以色谱峰面积和对应的浓度拟合回归方程。靛蓝的

回归方程为:
$$Y = 1.8644 \times 10^{-8} X - 0.0032 (R = 0.9995);$$

靛玉红的回归方程为:
$$Y = 1.2376 \times 10^{-8} X + 0.0001 (R = 0.9998).$$

2.1.2 薄层扫描法 分别取靛蓝、靛玉红对照溶液, 在200~700 nm 波长内扫描, 结果见图1。

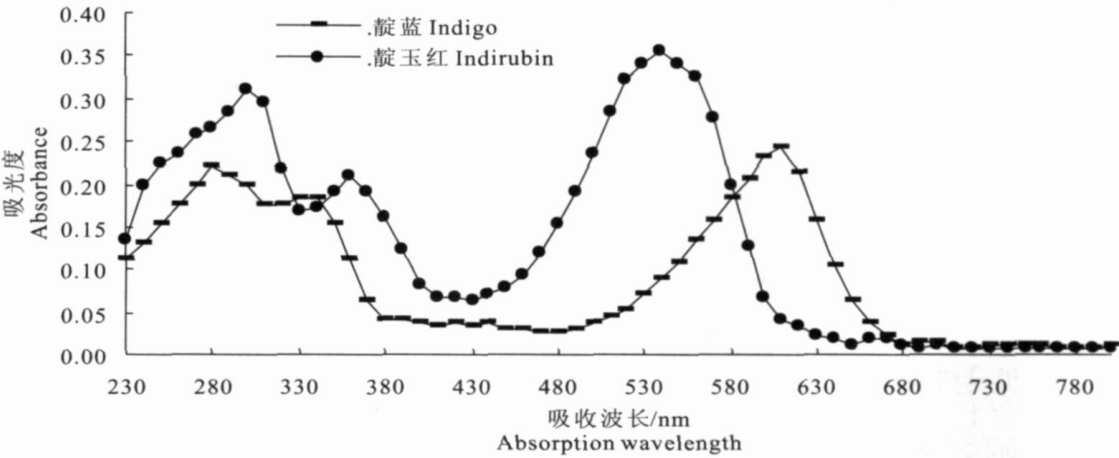


图1 靛蓝和靛玉红的吸收光谱

Fig 1 Absorption of indigotin and indirubin

图1显示,靛蓝在608 nm 处有最大吸收,靛玉红在544 nm 处有最大吸收,且相互干扰较小,2种成分在700 nm 处几乎无吸收。因此,确定 $\lambda_s = 544$ 和608 nm 分别为靛蓝、靛玉红的测定波长, $\lambda_R = 700$ nm 为参比波长。

2.1.3 双波长分光光度法 根据图1,同样选择544和608 nm 作为双波长分光光度法测定靛蓝、靛玉红的吸收波长。以氯仿作空白样,分别在544和608 nm 处测定靛蓝、靛玉红标准溶液吸光度。根据 Lambert-beer 定律: $A = EC$ (A 表示吸光度, E 表示消光系数, C 表示溶液的浓度), 分别计算出4个消光系数。靛蓝、靛玉红含量的计算公式如下:

当波长为608 nm 时, $E_{608\text{靛蓝}} = 34.6$, $E_{608\text{靛玉红}} = 6.9$; 当波长为544 nm 时, $E_{544\text{靛蓝}} = 19.6$, $E_{544\text{靛玉红}} = 44.6$ 。

当溶液为2种物质的混合溶液时:

表1 3种方法测定靛蓝和靛玉红含量的稳定性试验结果

Table 1 Results of stability test of the contents of indigo and indirubin with 3 methods		mg/L							
测定方法 Measurement method	成分 Constituent	测定时间/h Test time							
		0	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	6.0	24.0
高效液相色谱法 HPLC	靛蓝 Indigo	76.32	74.99				75.69	74.39	75.96
	靛玉红 Indirubin	174.63	173.26				175.85	174.36	174.33
双波长分光光度法 DW SP	靛蓝 Indigo	84.37	88.32				97.36	86.32	89.54
	靛玉红 Indirubin	195.62	180.26				187.85	190.62	193.66
薄层扫描法 TLCS	靛蓝 Indigo	72.58	81.26	75.33	73.25	67.32	55.21		36.24
	靛玉红 Indirubin	171.32	166.33	167.32	164.32	147.30	132.32		123.15

表1显示,用高效液相色谱法和双波长分光光度法测定靛蓝、靛玉红含量时,在24 h 内两者的浓

度均无显著变化,较稳定。鉴于在测定板蓝根、大青叶生药及其产品中靛蓝、靛玉红含量时,从提取到最终测定,完全可以在24 h内完成,故采用高效液相色谱法和双波长分光光度法时,2种成分的稳定性可以满足测定要求。采用薄层扫描法时,靛蓝、靛玉红在3 h内测定结果较稳定;3 h后测得的靛蓝、靛玉红浓度越来越小,从3 h到3.5 h靛蓝减少了5.93 mg/L,靛玉红减少了17.02 mg/L;到24 h时,靛蓝的质量浓度减少到原溶液质量浓度的50%,靛玉红减少到原溶液质量浓度的70%。这可能是由于标准品溶液点于硅胶薄层板上展开后,少量的靛蓝、靛玉红在薄层板上分解或是被薄层板的硅胶吸附的缘故。故当待测溶液在硅胶板上展开后,对薄层进行扫

描应在3 h内完成,才能保证测定结果的偏差在允许范围内。

2.2.2 精密度 表2给出了3种测定方法的精密度试验结果。表2显示,高效液相色谱法测定2种成分的相对标准偏差(RSD)均小于2%,符合《中国药典》要求,表明高效液相色谱法测定靛蓝、靛玉红含量精密度高,偏差小,测定结果可信;双波长分光光度法和薄层扫描法测定靛蓝、靛玉红精密度RSD均小于5%,符合中药材含量测定质量标准要求,但与高效液相色谱法相比,RSD稍偏大,其精密度没有高效液相色谱法高。因此,在测定方法选择上,应优先考虑采用高效液相色谱法。

表2 3种方法测定靛蓝和靛玉红含量的精密度试验结果

Table 2 Results of precision tests of the content of indigo and indirubin with 3 methods

测定方法 Measurement method	成分 Constituent	重复次数 Number of repetition							RSD/%
		1	2	3	4	5	6	平均 Mean	
高效液相色谱法 HPLC	靛蓝 Indigo	73.33	74.92	72.15	73.00	72.30	74.32	73.34	1.17
	靛玉红 Indirubin	173.62	172.66	173.36	174.97	172.04	174.69	173.58	0.50
双波长分光光度法 DWSP	靛蓝 Indigo	84.75	79.33	84.63	80.37	78.65	83.37	81.85	2.93
	靛玉红 Indirubin	184.69	180.68	175.39	189.62	172.36	174.33	179.51	3.05
薄层扫描法 TLCS	靛蓝 Indigo	77.33	76.02	75.32	82.32	81.87	78.36	78.54	3.02
	靛玉红 Indirubin	173.21	178.37	171.55	174.32	176.36	177.35	175.19	1.23

2.2.3 加标回收率 各测定方法的加标回收率试验结果见表3。加标回收率试验结果(表3)显示,当大青叶为0.5 g,加标量为12.5 μg左右时,高效液相色谱法测定靛蓝、靛玉红含量的平均加标回收率在99%~101%,薄层扫描法的平均加标回收率在97%~103%,双波长分光光度法的在95%~105%,3种

测定方法的平均加标回收率试验结果均符合要求。其中以高效液相色谱法的回收率最高,其次是薄层扫描法,双波长分光光度法的回收率最低。因此,3种方法适宜于不同精度要求下的靛蓝、靛玉红含量测定。

表3 3种方法测定靛蓝和靛玉红含量的加标回收率试验结果

Table 3 Results of recovery test of the contents of indigo and indirubin with 3 methods

测定方法 Measurement method	成分 Constituent	样品含量/ (mg · kg ⁻¹) Contents of sample	加入标品量/μg STD sample added	理论值/ (mg · kg ⁻¹) Theoretic value	测定值/ (mg · kg ⁻¹) Measuring value	回收率/% Recovery rate
高效液相色谱法 HPLC	靛蓝 Indigo	325.00	12.40	349.80	352.78	100.97
	靛玉红 Indirubin	359.35	12.50	384.35	386.00	100.43
双波长分光光度法 DWSP	靛蓝 Indigo	352.62	12.40	377.42	393.85	104.35
	靛玉红 Indirubin	394.61	12.50	419.61	405.96	96.74
薄层扫描法 TLCS	靛蓝 Indigo	314.68	12.40	339.48	345.16	101.69
	靛玉红 Indirubin	365.48	12.50	390.48	401.42	102.81

2.3 3种方法测定大青叶样品中靛蓝、靛玉红含量的比较

利用上述3种测定方法对大青叶中靛蓝、靛玉红的含量分别进行测定,结果见表4。由表4可知,3

种测定方法中,若以高效液相色谱法为标准,双波长分光光度法的测定结果偏高,而薄层扫描法的测定结果偏低。

表4 3种方法测定的大青叶样品中靛蓝、靛玉红含量的比较

Table 4 Contents of indigo and indirubin in Folium isatidis with 3 methods				mg/L
成分 Constituent	高效液相色谱法 HPLC	双波长分光光度法 DW SP	薄层扫描法 TLCS	
靛蓝 Indigo	330.49	390.28	310.22	
靛玉红 Indirubin	363.33	441.19	359.65	

3 讨 论

3种靛蓝、靛玉红测定方法各有优缺点,可用于不同精度要求的含量测定。用高效液相色谱法测定靛蓝、靛玉红含量具有稳定性好、精密度高和加标回收率高等优点,是测定工作首选的方法。《中国药典》2005版也将大青叶中靛玉红含量测定方法由以前的薄层扫描法改为高效液相色谱法,但其缺点是:测定过程中流动相消耗大,仪器、试剂较为昂贵。分光光度法不能排除提取液中其他化合物在测定波长处有吸收,从而使得测定结果高于真实值。对比试验结果表明,分光光度法精密度、重复性和加标回收率等各项指标均能达到中药材含量测定的要求,但不及高效液相色谱的好;同时,由于其所需要的仪器廉价、使用普遍,在没有高效液相色谱仪的条件下,不失为一种较为简便、快速的含量测定方法。薄层扫描法是点样、展开后,用双波长或单波长扫描,然后与对照物按同法所得的色谱图作对比,用以进行含量测定的方法,只要得到分离度和重复性好的薄层色谱,就可获得满意的结果。对比试验结果表明,薄层扫描法测定大青叶中靛蓝、靛玉红含量切实可行,稳定性、精密度、重复性和加标回收率等各项测定结果均符合要求。但该法也有一定缺陷,当原料中靛蓝、靛玉红的含量较低,待测液在薄层板上显色不明显时,测定误差较大,因而不适宜测定板蓝根中靛蓝、靛玉红含量。同时,薄层板质量、样品展开效果、待测物质的稳定性和固定相对样品的吸附能力等因素对测定结果影响也很大。在测定靛蓝、靛玉红含量时,待测液薄层板展开3h后扫描,测定的靛蓝、靛玉红含量明显降低,因此,测定工作必须在薄层展开后3h内完成。

目前,以何种成分作为板蓝根、大青叶类药材的质量控制指标观点尚不一致。有学者认为应以胞苷、尿苷、腺苷等作为质量控制指标^[4];有学者认为板蓝根中不含靛蓝、靛玉红,以往在板蓝根中测出的靛蓝、靛玉红,实际上是在采收和加工过程中混入的根茎和附带的叶柄残基所含的靛蓝和靛玉红,可以考

虑将苯甲酸、丁香酸、邻氨基苯甲酸、水杨酸等4种有机酸作为质控指标^[12]。本试验发现,板蓝根药材(没有含根茎和其附带的叶柄残基)的氯仿提取液,经高效液相色谱仪检测确实含有少量的靛蓝、靛玉红。《中国药典》(2005年版)规定了大青叶原药材的有效成分为靛玉红,并对其含量做了明确规定,而对于板蓝根的质量控制仅是以精氨酸的定性检验为标准,没有具体的含量要求。鉴于板蓝根、大青叶中的靛蓝、靛玉红具有保护肝脏、治疗白血病、抗菌、抗病毒等功效^[13],对板蓝根、大青叶的质量控制不能忽视这2种成分。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第3分册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:709-713

[2] 徐 晗,方建国,刘云海. 板蓝根最新研究进展[J]. 中草药,2003,34(4):10-11

[3] 崔树玉,薛 原,杨建莉,等. 板蓝根研究进展[J]. 中草药,2001,32(7):670-671

[4] 王邦林,王 强. 板蓝根、大青叶中靛玉红、靛蓝的高效液相色谱分析[J]. 天津药学,1996,6(3):30-34

[5] 刘 依. 板蓝根有效成分分离及含量测定[D]. 北京:中国农业大学,2002

[6] 崔 卓,王 颖. 板蓝根有效成分质量研究[J]. 辽宁中医杂志,2004,31(8):692

[7] 梁 球,李朝晖. 板蓝根药材及制剂的质量研究概况[J]. 广东微量元素科学,2003,10(11):18-22

[8] 刘晓芳,程 弘. 板蓝根质量检测应增加靛玉红、靛蓝检验项目[J]. 中国药品标准,2002,3(2):32-33

[9] 王燕恒,刘国瑞,徐 芳,等. RP-HPLC法测定板蓝根浸膏中靛蓝、靛玉红的含量[J]. 河北大学学报:自然科学版,2005,25(5):508-560

[10] 董小平,孙 波. 大青叶、板蓝根中靛玉红含量测定[J]. 南京中医药大学学报,1995,11(2):101-102

[11] 国家药典委员会. 中国药典:2005年第一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005

[12] 张汉明,张 戈,乔传卓. 板蓝根、大青叶不同部位的靛蓝、靛玉红含量测定及其部分成分的抗内毒作用比较[J]. 药学实践杂志,2000,18(5):347-348

[13] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:606