

板蓝根中靛蓝和靛玉红的提取及其质量分数的测定

刘 依^{1,2} 韩鲁佳^{1,2} 阎巧娟^{1,2} 刘向阳^{1,2}

(1. 中国农业大学 工学院,北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室,北京 100083)

摘 要 采用直接比色法测定板蓝根中靛蓝、靛玉红的质量分数。对靛蓝、靛玉红在 240~700 nm 波段进行扫描,确定其最大吸收波长分别为 601 和 531 nm。分别通过单因素试验和正交试验,确定提取靛蓝、靛玉红的最佳工艺参数。结果表明,乙醇体积分数为 75% 时,靛蓝和靛玉红的提取物得率最高;提取时间为 4 h 时,靛蓝和靛玉红的提取物得率最高。正交试验确定的最佳提取工艺参数为:药材粒度 40 目,提取时间 4 h,乙醇体积分数 75%,此时,提取物得率达 1.74%。

关键词 板蓝根; 靛蓝; 靛玉红; 质量分数; 提取; 测定

中图分类号 R 28

文章编号 1007-4333(2003)06-0005-04

文献标识码 A

Extraction and determination of mass ratio of Indigo and Indirubin in Indigowoad root

Liu Yi^{1,2}, Han Lujia^{1,2}, Yan Qiaojuan^{1,2}, Liu Xiangyang^{1,2}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration Research, Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract Extraction and determination of mass ratio of Indigo and Indirubin in Indigowoad root were studied. Indigo and Indirubin were scanned from 240 to 700 nm. From the spectrogram we can see that the largest absorbing wavelength of Indigo and Indirubin was 601 and 531 nm respectively. The best parameters of technology have been determined through single factor and orthogonal test on extracting indigo and Indirubin respectively, results showed that ethanol with a volume ratio of 75% was suitable solvent to extract Indigo and Indirubin and 4 hours was the proper time to extract Indigo and Indirubin. Through orthogonal test the best parameters of technology were obtained. The results are as the following: the herbal granularity is 40 eye, extraction time is 4 h, ethanol with a volume ratio of 75%. On this condition, the extracting rate was up to 1.74%.

Key words indigowoad root; indigo; indirubin; mass ratio; extraction; determine

靛蓝(Indigo)和靛玉红(Indirubin)均为板蓝根的有效成分。研究表明,靛蓝对肝有一定的保护作用,靛玉红无论对动物移植性肿瘤还是人体肿瘤均有一定治疗作用,且临床上靛玉红用于治疗慢性粒细胞性白血病的总有效率达 90% 以上^[1]。

一般情况下,板蓝根中靛蓝、靛玉红的质量分数为几到几十微克。生产中板蓝根有效成分的提取多为水煮醇沉,但试验证明,水煮法提出的靛蓝、靛玉红质量分数甚少,它们几乎全部存在于残渣中^[2];渗漉法提取时用体积分数为 70% 的乙醇作渗漉溶

媒,具有分离和提取效果好,无需加热的优点,不仅减少了药物水解和氧化的机会,而且具备工艺简单的特点^[3]。本研究首先采用回流法分别考察乙醇体积分数、提取时间对试验结果的影响,确定其最优水平,继而采用正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、药材粒度等因素对靛蓝、靛玉红提取物(靛蓝和靛玉红的混合物,全文同)得率和质量分数的影响。

目前,靛蓝、靛玉红质量分数的测定方法有氧化滴定法、直接比色测定法、薄层色谱法、双波长分光光度法、正交函数分光光度法、导数光谱法、柱色谱

收稿日期:2003-06-20

基金项目:国家“九五”重点攻关专题

作者简介:刘 依,硕士,主要研究方向为农产品加工与贮藏

—比色法、反相高效液相色谱法等^[4,5]。这些方法有的灵敏度及准确性虽好,但需经分离,操作繁琐、费时^[6]。本试验研究采用直接比色法,无需对板蓝根中靛蓝、靛玉红进行分离,而直接测定其质量分数。

1 试验材料与仪器

材料:板蓝根,河北菘蓝,购于北京市同仁堂医药经营公司。

试剂:靛蓝、靛玉红,标准品,中国药品生物制品检定所;三氯甲烷,分析纯,北京化工厂;吡啶,分析纯,中国人民解放军第九零六六工厂;乙醇,分析纯,北京化工厂;双重蒸馏水,采用 SZ-93 自动双重纯水蒸馏器自制。

仪器:回流提取装置,实验室自制;98-1-B 型电子控温电热套,天津市泰斯特仪器有限公司生产;AB204-B 型电子分析天平,瑞士梅特勒公司生产;101A-2 型电热恒温干燥箱,上海实验仪器总厂生产;TU1800SPC 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司生产;金叶牌 RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;F-160 型药物粉碎机,河北省黄骅市新兴电器厂生产;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂生产。

2 试验方法

2.1 分析方法

1) 靛蓝和靛玉红最大吸收波长的确定。精密称取靛蓝和靛玉红对照品各 10 mg,加氯仿溶解于 100 mL 的容量瓶中,定容,制成 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。分别吸取靛蓝、靛玉红对照品溶液 0.6 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加氯仿至刻度,摇匀。在紫外分光光度计上用氯仿做空白,对靛蓝在 240 ~ 700 nm 波段进行扫描,对靛玉红在 240 ~ 600 nm 波段进行扫描。

2) 吸光系数的确定。在液层厚度为 1 cm 时,精密吸取靛蓝、靛玉红标准溶液 0.6 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加氯仿至刻度,用分光光度计以氯仿为空白,分别在 601 和 531 nm 处测其吸光度,再根据公式 $A = Ec$ 分别计算出 4 个吸光系数,其中, A 为吸光度, E 为吸光系数, c 为靛蓝、靛玉红标准溶液的体积分数。

3) 靛蓝和靛玉红质量分数的测定。由于靛蓝和靛玉红的光谱互相重叠,根据吸光度加和性原理分

别测定靛蓝和靛玉红提取物在 601 和 531 nm 处的吸光度值,再求解联立方程式,计算提取物中靛蓝、靛玉红的质量分数^[7]。

2.2 提取方法

1) 提取时间对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响。

精密称取 4 份各为 60 g 的干燥板蓝根粗粉,加入体积分数为 75% 的乙醇溶液 480 mL,分别回流提取 2, 4, 6, 8 h,过滤,减压回收乙醇溶液直至无醇味,用氯仿萃取直至氯仿层透明。取氯仿层,减压回收氯仿直至浸膏状,在 60 °C 的恒温干燥箱中烘干、称其质量、粉碎,测定靛蓝、靛玉红提取物得率。

2) 乙醇体积分数对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响。

精密称取 4 份各为 60 g 的干燥板蓝根粗粉,分别加入体积分数为 90%, 75%, 60% 和 45% 的乙醇溶液 480 mL,回流提取 4 h,过滤;将滤液减压浓缩至无醇味,用氯仿萃取,直至氯仿层透明。取氯仿层,减压回收氯仿,在 60 °C 的恒温干燥箱中烘干、称其质量、粉碎,得靛蓝、靛玉红提取物,测定得率。

3) 靛蓝、靛玉红最佳提取工艺参数的确定。

分别从药材粒度、提取时间及乙醇体积分数 3 方面对使用回流法从板蓝根中提取靛蓝和靛玉红进行试验研究。试验因素水平分别为:A 药材粒度,40 目,80 目,120 目;B 提取时间,3 h,4 h,5 h;C 乙醇体积分数,65%,75%,85%。

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,研究提取靛蓝、靛玉红的最佳工艺参数。

3 试验结果与分析

3.1 靛蓝、靛玉红最大吸收波长的确定

图 1 为靛蓝、靛玉红光谱图。可以看出,当靛蓝具有最大吸收峰时,波长为 285 和 601 nm,当靛玉红具有最大吸收峰时,波长为 292 和 531 nm。虽然

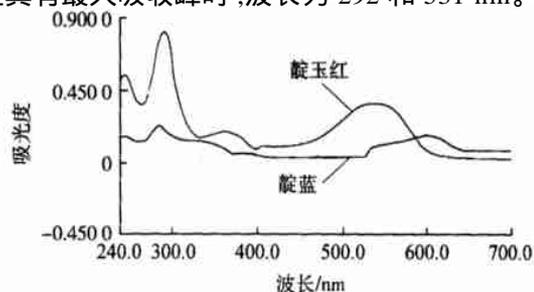


图 1 靛蓝、靛玉红光谱图

Fig. 1 The spectrogram of Indigo and Indirubin

靛蓝和靛玉红分别在 285 和 292 nm 处灵敏度最高, 但两者同时存在的条件下, 在 285 nm 处, 靛玉红对靛蓝的影响很大, 而在 531 和 601 nm 处, 两者的吸收光谱互相重叠, 符合紫外可见分光光度计的定量方法。因此, 选择 601 和 531 nm 分别作为靛蓝、靛玉红的最大吸收波长。

3.2 吸光系数的确定

根据试验及吸光定律计算出吸光系数值, 分别为: 当波长为 601 nm 时, $E_{601}^{\text{靛蓝}} = 29.5$, $E_{601}^{\text{靛玉红}} = 8.8$; 当波长为 531 nm 时, $E_{531}^{\text{靛蓝}} = 15.2$, $E_{531}^{\text{靛玉红}} = 39.2$ 。

3.3 提取时间对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响

图 2 示出提取时间对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响。可见, 当提取时间为 4 h 时, 靛蓝、靛玉红提取物得率最高。这是由于提取时间过长, 一些脂溶性成分如靛甙会产生水解而导致提取物得率降低。

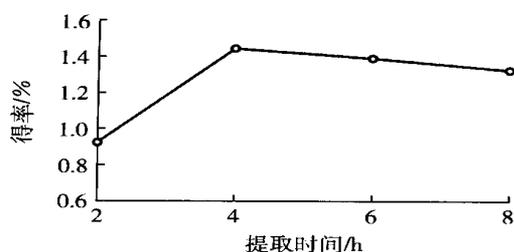


图 2 提取时间对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响

Fig. 2 Effect of different extracting time on the yield of Indigo and Indirubin

3.4 乙醇体积分数对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响

图 3 示出乙醇体积分数对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响。可以看出, 当乙醇体积分数为 75 %

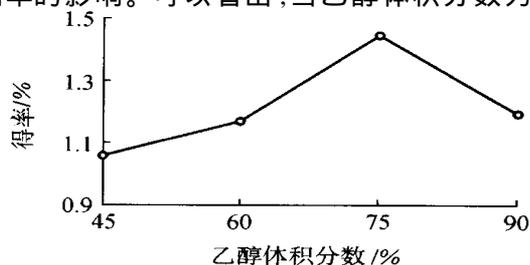


图 3 乙醇体积分数对靛蓝、靛玉红提取物得率的影响

Fig. 3 Effect of different volume ratio of ethanol on the yield of Indigo and Indirubin

时, 提取物得率最高。这是由于当乙醇体积分数过高时, 溶剂亲脂性增强, 一些脂溶性成分会被除去; 而当乙醇体积分数过低时, 溶剂偏向于亲水性, 靛蓝、靛玉红等脂溶性成分不能被充分提取出来, 只有在乙醇体积分数为 75 % 时, 靛蓝、靛玉红提取效果最好。

3.5 靛蓝、靛玉红最佳提取工艺参数的确定

正交试验提取靛蓝、靛玉红结果见表 1。

1) 各因素对提取物(靛蓝和靛玉红的混合物)得率影响的大小次序为: 药材粒度 > 乙醇体积分数 > 提取时间。这是由于用有机溶剂进行提取时, 物料的粉碎状态对提取结果有很大的影响。提取过程包括渗透、溶解、扩散等过程, 药粉越细, 这一过程就越快, 提取效率越高, 但过细时, 药粉表面积太大, 吸附作用增强, 反而影响扩散速度。

2) 综合靛蓝、靛玉红提取物得率及各自质量分数 3 项指标来考虑, 各因素的影响顺序为: 提取时间 > 药材粒度 > 乙醇体积分数, 这主要是因为提取时间越长, 靛蓝和靛玉红溶出越充分。

3) 由于本试验研究主要考虑靛蓝、靛玉红的提取, 因此应以提取物得率作为首要考察目标。综合提取物质量、靛蓝和靛玉红的质量分数 3 项指标来考虑, 靛蓝、靛玉红的最佳提取工艺参数为 $A_1B_2C_2$, 即药材粒度 40 目, 提取时间 4 h, 乙醇体积分数 75 %。

4) 在最佳工艺条件下, 提取物得率为 1.74 %。利用直接比色测定法对提取物进行质量分数的测定, 靛蓝和靛玉红的质量分数分别为 53.028 和 42.002 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4 结 论

1) 通过光谱扫描确定靛蓝、靛玉红的最大吸收波长分别为 601 和 531 nm。

2) 单因素试验表明乙醇体积分数为 75 % 时, 靛蓝、靛玉红提取物得率最高; 提取时间为 4 h 时, 靛蓝、靛玉红提取物得率最高。

3) 通过正交试验确定的提取靛蓝、靛玉红的最佳工艺参数为: 药材粒度 40 目, 提取时间 4 h, 乙醇体积分数 75 %。此时, 靛蓝、靛玉红提取物的得率为 1.74 %。

表 1 正交试验提取靛蓝、靛玉红结果分析

Table 1 Analyzing tabulation of extracting Indigo and Indirubin through orthogonal test

试验号	A 药材粒度/目	B 提取时间/h	C 乙醇体积分数/%	提取物 质量/g	质量分数/(mg·g ⁻¹)	
					靛蓝	靛玉红
1	40	3	65	0.6571	5.279	10.711
2	40	4	75	1.0438	53.028	42.002
3	40	5	85	0.8364	20.511	22.300
4	80	3	85	0.6740	13.509	16.521
5	80	4	65	0.4602	52.386	62.805
6	80	5	75	0.7061	30.744	27.448
7	120	3	75	0.6717	26.113	28.489
8	120	4	85	0.9056	42.242	44.197
9	120	5	65	0.8502	42.909	46.506
<hr/>						
提取物质量	M_1	2.5373	2.0028	1.9675		
	M_2	1.8403	2.4096	2.4216		
	M_3	2.4275	2.3927	2.4160		
	R_j	0.2324	0.1356	0.1514	$j = 1, 2, 3$	
较优水平	A_1	B_2	C_2			
<hr/>						
靛蓝质量 分数	M_1	78.818	44.901	100.574		
	M_2	96.639	147.656	109.885		
	M_3	111.264	94.164	76.262		
	R_j	10.815	34.252	11.207	$j = 1, 2, 3$	
较优水平	A_3	B_2	C_2			
<hr/>						
靛玉红质 量分数	M_1	75.013	55.721	120.022		
	M_2	106.774	149.004	97.959		
	M_3	119.192	96.254	83.018		
	R_j	14.727	31.094	12.334		
较优水平	A_3	B_2	C_1			

参 考 文 献

- [1] 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1993.606
- [2] 张建军,薄少英,张玉霞,等. 板蓝根提取工艺的探讨[J]. 中国中药杂志,1990,15:31~33
- [3] 温博栋. 板蓝根制剂提取工艺及检测方法研究概况[J]. 中成药,1995,17(6):8~9
- [4] 孙立新,唐虹,尹瓶,等. RP-HPLC法测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(3):191~192
- [5] 马丽,赵昕,杨丽,等. 板蓝根大青叶青黛及其制剂的药物分析研究进展[J]. 时珍国药研究,1998,9(2):186
- [6] 金文详,燕恩慈,吴玉田. 青黛中靛蓝及靛玉红含量的褶合曲线分析测定[J]. 中国医药工业杂志,1996,27(6):257~259
- [7] 刘依,韩鲁佳,阎巧娟,等. 直接比色法测定板蓝根中靛蓝、靛玉红质量分数的试验研究[A]. 韩鲁佳. 2002农业工程青年科技论坛论文集[C]. 北京:中国农业科学技术出版社,2002.203~205