# 大青葉

**圖 1**　大青葉外觀圖

## 1. 名稱

藥材正名：Isatidis Folium

中文名：大青葉

漢語拼音名：Daqingye

## 2. 來源

本品為十字花科植物菘藍 *Isatis indigotica* Fort. 的乾燥葉。夏、秋二季分2-3次採收，除去雜質，曬乾。

## 3. 性狀

本品多皺縮捲曲，有的破碎，上表面暗灰綠色，下表面葉中脈明顯凸出。完整葉片展平後呈長橢圓形至長圓狀倒披針形，長 5-20 cm，寬 1.5-7 cm；基部狹窄漸下延至葉柄呈耳狀；全緣或波狀，先端鈍；葉柄長 2-11 cm，淡棕黃色。質脆。氣微，味微酸、苦、澀（圖 1）。

## 4. 鑒別

### 4.1 顯微鑒別 *（附錄 III）*

**橫切面**

上下表皮均由1列類長方形細胞組成，葉肉柵欄組織和海綿組織分化不明顯。維管束外韌形，4-9個，中間1個較大，每個維管束木質部和韌皮部均可見厚壁組織。薄壁細胞可見藍黑色素粒及不規則粒狀物（圖 2）。

**粉末**

綠棕色。藍黑色素粒存在於葉肉細胞中。不規則粒狀物，直徑30-110 µm，存在於葉肉細胞中。厚壁細胞成束。螺紋導管或網紋導管成群，直徑7-55 µm。表皮細胞垂周壁稍彎曲，成連珠狀增厚；氣孔不等式，副衛細胞 3-4 個（圖 3）。

## 4.2 薄層色譜鑒別 *[附錄 IV (A)]*

**對照品溶液**

*靛藍對照品溶液*

取靛藍對照品（圖 4）0.1 mg，溶解於 1 mL 甲醇與二氯甲烷的混合溶液（1:9, v/v）中。

*靛玉紅對照品溶液*

取靛玉紅對照品（圖 4）0.1 mg，溶解於 1 mL 甲醇與二氯甲烷的混合溶液（1:9, v/v）中。

**展開劑**

製備二氯甲烷 – 丙酮（97:3, v/v）的混合溶液。

**供試品溶液**

取本品粉末 2.0 g，置 50-mL 錐形瓶中，加石油醚（60-80ºC）20 mL，超聲（240 W）處理 15 分鐘，濾過，棄去濾液。取殘渣加二氯甲烷 20 mL，超聲（240 W）處理 15 分鐘，濾過。取濾液轉移於 50-mL 圓底燒瓶中，用旋轉蒸發器減壓蒸乾，殘渣溶於 3 mL 甲醇與二氯甲烷的混合溶液（1:9, v/v），即得。

**操作程序**

照薄層色譜法 [附錄 IV (A)] 進行。分別吸取靛藍對照品溶液 60 µL、靛玉紅對照品溶液 10 µL 和供試品溶液 9 µL，點於同一高效硅膠 $F_{254}$ 薄層板上。用上述新製備的展開劑展開約 6 cm，取出，標記溶劑前沿，晾乾。置可見光下檢視，並計算 $R_f$ 值。

供試品色譜應顯出與靛藍和靛玉紅色澤相同、$R_f$ 值相應的特徵斑點或條帶。

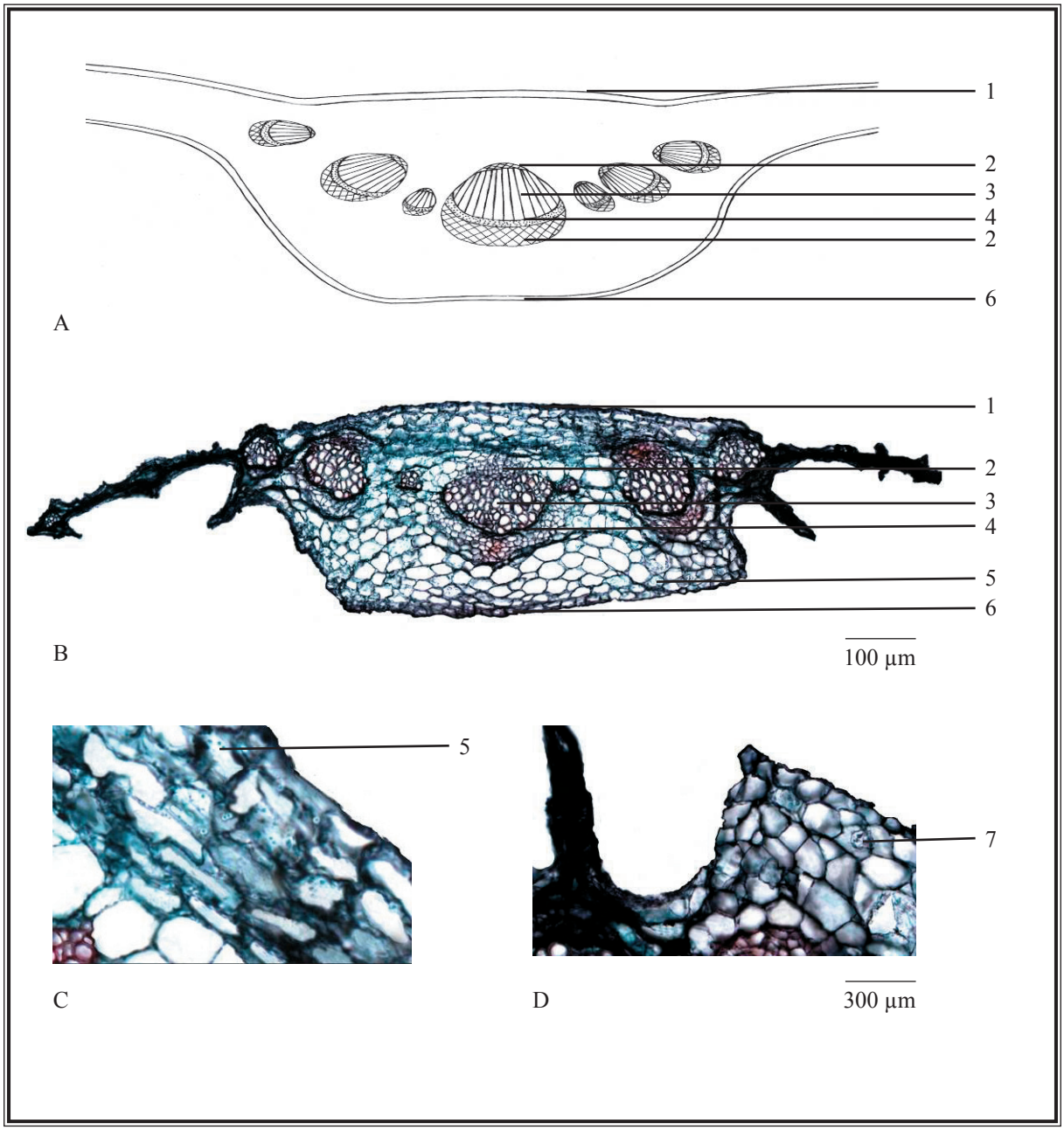



**圖 2**　大青葉橫切面顯微特徵圖

A. 簡圖　B. 橫切面圖　C. 藍黑色素粒　D. 不規則粒狀物

1. 上表皮細胞　2. 厚壁組織　3. 木質部　4. 韌皮部　5. 藍黑色素粒
6. 下表皮細胞　7. 不規則粒狀物

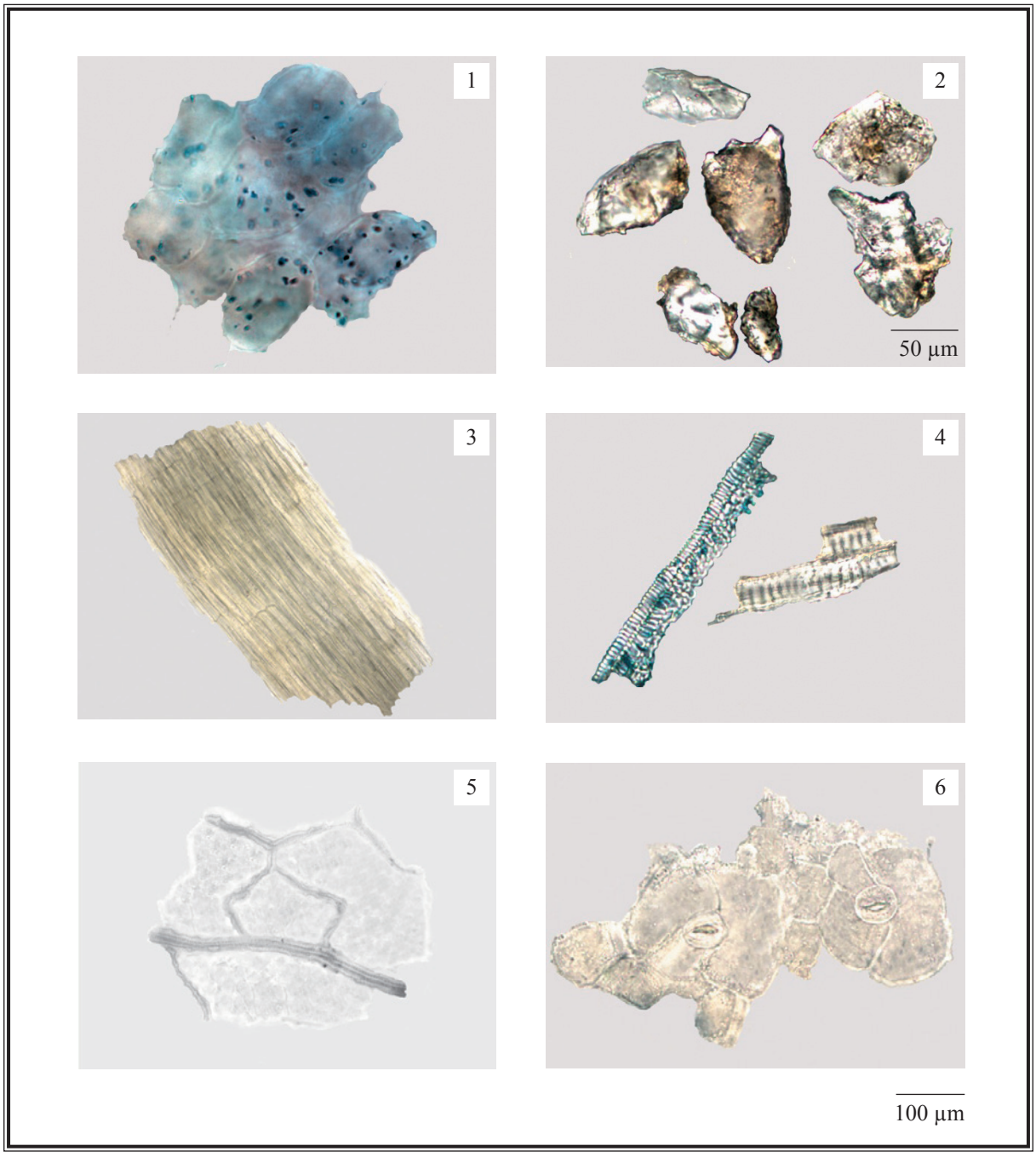
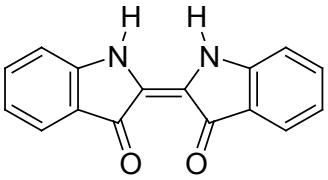



**圖3**　大青葉粉末顯微特徵圖（光學顯微鏡下）

1. 藍黑色素粒　2. 不規則粒狀物　3. 厚壁細胞
4. 螺紋導管　5. 表皮細胞　6. 不定式氣孔

(i)



(ii)

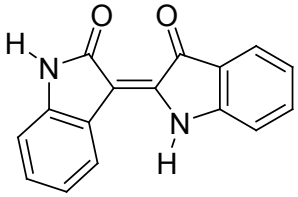


**圖4** 化學結構式 (i) 靛藍 (ii) 靛玉紅

## 4.3 高效液相色譜指紋圖譜法*(附錄XII)*

**對照品溶液**

*靛藍對照品溶液Std-FP (2 mg/L)*

取靛藍對照品 0.2 mg，置 50-mL 量瓶中，溶解於 5 mL 甲醇與二氯甲烷的混合溶液(1:9, v/v) 中，加甲醇至刻度。精密吸取 1 mL 溶液於 2-mL 量瓶中，加甲醇至刻度。

*靛玉紅對照品溶液 Std-FP (6 mg/L)*

取靛玉紅對照品 0.3 mg，溶解於 50 mL 甲醇中。

**供試品溶液**

取本品粉末0.6 g，置50-mL離心管中，加乙酸乙酯40 mL，超聲(240 W)處理1小時，離心10分鐘(約3000 × *g*)。取上清液轉移於250-mL圓底燒瓶中，用旋轉蒸發器減壓蒸乾。殘渣溶於25 mL甲醇，用0.45-μm微孔濾膜(PTFE)濾過，即得。

**色譜系統**

液相色譜：二極管陣列檢測器，檢測波長250 nm；4.6 × 250 mm十八烷基鍵合硅膠(5 μm)填充柱；流速約1.0 mL/min。色譜洗脫程序如下(表1)：

**表1** 色譜洗脱條件

| 時間（分鐘） | 水（%, v/v） | 乙腈（%, v/v） | 洗脱 |
|---|---|---|---|
| 0 – 10 | 80 → 78 | 20 → 22 | 綫性梯度 |
| 10 – 20 | 78 → 45 | 22 → 55 | 綫性梯度 |
| 20 – 45 | 45 → 43 | 55 → 57 | 綫性梯度 |
| 45 – 60 | 43 → 40 | 57 → 60 | 綫性梯度 |

**系統適用性要求**

吸取靛藍對照品溶液 Std-FP 和靛玉紅對照品溶液 Std-FP 各 20 μL，注入液相色譜儀，至少重複 5 次。系統適用性參數的要求如下：靛藍和靛玉紅的峰面積相對標準偏差均應不大於 5.0%；靛藍峰和靛玉紅峰的保留時間相對標準偏差均應不大於 2.0%；理論塔板數按靛藍峰和靛玉紅峰計算分別應不低於 60000 和 40000。

供試品測試中 2 號峰和 3 號峰分別與其鄰近峰之間的分離度均應不低於 1.0（圖 5）。

**操作程序**

分別吸取靛藍、靛玉紅對照品溶液 Std-FP 和供試品溶液各 20 μL，注入液相色譜儀，並記錄色譜圖。測定對照品溶液 Std-FP 色譜圖中靛藍峰和靛玉紅峰的保留時間，及供試品溶液色譜圖中 3 個特徵峰（圖 5）的保留時間。在相同液相色譜條件下，與相應對照品溶液 Std-FP 色譜圖中二成份峰的保留時間比較，鑒定供試品溶液色譜圖中靛藍峰和靛玉紅峰。二色譜圖中靛藍峰和靛玉紅峰的保留時間相差均應不大於 2.0%。按附錄 XII 公式計算特徵峰的相對保留時間。

大青葉提取液 3 個特徵峰的相對保留時間及可變範圍見表 2。

**表2** 大青葉提取液 3 個特徵峰的相對保留時間及可變範圍

| 峰號 | 相對保留時間 | 可變範圍 |
|---|---|---|
| 1 | 0.71 | ± 0.03 |
| 2（靛藍） | 0.87 | ± 0.03 |
| 3（指標成份峰，靛玉紅） | 1.00 | - |

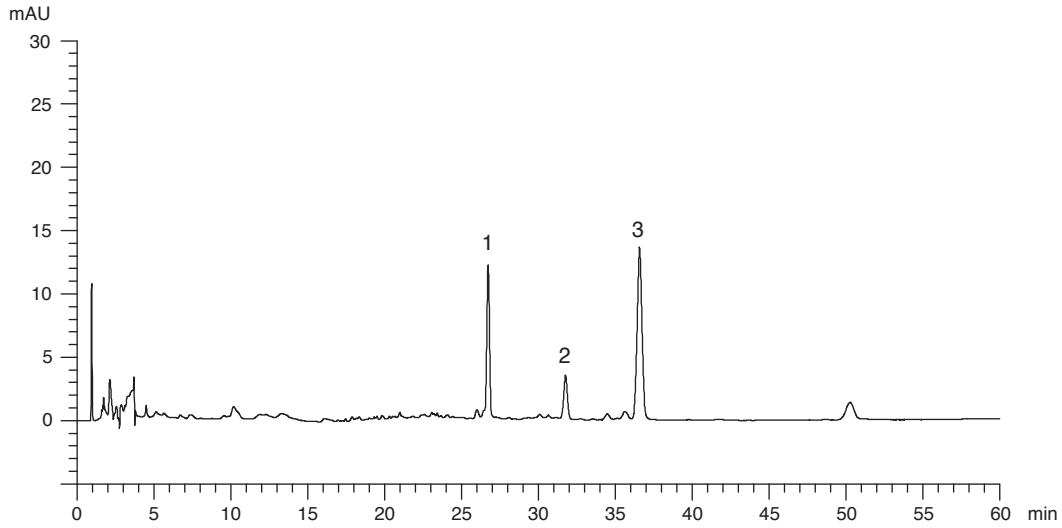



**圖5**　大青葉提取液對照指紋圖譜

供試品色譜圖中應有與對照指紋圖譜相對保留時間範圍內一致的3個特徵峰(圖5)。

## 5. 檢查

**5.1 重金屬**（*附錄V*）：應符合有關規定。

**5.2 農藥殘留**（*附錄VI*）：應符合有關規定。

**5.3 霉菌毒素－黃曲霉毒素**（*附錄VII*）：應符合有關規定。

**5.4 二氧化硫殘留**（*附錄XVIII*）：應符合有關規定。

**5.5 雜質**（*附錄VIII*）：不多於2.0%。

**5.6 灰分**（*附錄IX*）

總灰分：不多於21.0%。
酸不溶性灰分：不多於7.5%。

**5.7 水分**（*附錄X*）

烘乾法：不多於13.0%。

## 6. 浸出物 *(附錄 XI)*

水溶性浸出物(冷浸法)：不少於3.0%。
醇溶性浸出物(冷浸法)：不少於22.0%。

## 7. 含量測定

照附錄IV(B)進行。

### 7.1 靛玉紅含量測定

**對照品溶液**
*靛玉紅對照品儲備液 Std-Stock (30 mg/L)*
精密稱取靛玉紅對照品 1.5 mg，溶解於50 mL 甲醇中。
*靛玉紅對照品溶液 Std-AS*
精密吸取靛玉紅對照品儲備液適量，以甲醇稀釋製成含靛玉紅分別為0.1、1、1.5、3、4 mg/L 系列的對照品溶液。

**供試品溶液**
精密稱取本品粉末0.25 g，置50-mL離心管中，加甲醇20 mL，超聲(240 W)處理30分鐘，離心10分鐘(約3000 × *g*)。取上清液轉移於50-mL 量瓶中，重複提取1次，合併上清液，加甲醇至刻度，用0.45-μm微孔濾膜(PTFE)濾過，即得。

**色譜系統**
液相色譜：二極管陣列檢測器，檢測波長291 nm；4.6 × 250 mm十八烷基鍵合硅膠(5 μm)填充柱；流速約1.0 mL/min。流動相為乙腈 − 水(60:40, v/v) 的混合溶液；流程約30 分鐘。

**系統適用性要求**
將靛玉紅對照品溶液Std-AS(1.5 mg/L )20 μL，注入液相色譜儀，至少重複5次。系統適用性參數的要求如下：靛玉紅的峰面積相對標準偏差應不大於5.0%；靛玉紅峰的保留時間相對標準偏差應不大於2.0%；理論塔板數按靛玉紅峰計算應不低於12000。

供試品測試中靛玉紅峰與鄰近峰之間的分離度應不低於1.5。

**標準曲綫**

將靛玉紅系列對照品溶液Std-AS各20 μL，注入液相色譜儀，並記錄色譜圖。以靛玉紅的峰面積與相應濃度作圖。從相應5點的標準曲綫得斜率、截距與相關系數。

**操作程序**

將供試品溶液20 μL，注入液相色譜儀，並記錄色譜圖。與靛玉紅對照品溶液Std-AS色譜圖中靛玉紅峰的保留時間比較，鑒定供試品溶液色譜圖中靛玉紅峰。二色譜圖中靛玉紅相應峰的保留時間相差應不大於2.0%。測定峰面積，按附錄IV（B）公式計算供試品溶液中靛玉紅的濃度（mg/L），並計算樣品中靛玉紅的百分含量。

**限度**

按乾燥品計算，本品含靛玉紅（$C_{16}H_{10}N_2O_2$）不少於0.020%。

## 7.2 靛藍含量測定

**對照品溶液**

*靛藍對照品儲備液Std-Stock（27 mg/L）*

精密稱取靛藍對照品2.7 mg，溶解於100 mL 2%水合氯醛二氯甲烷溶液中。

*靛藍對照品溶液Std-AS*

精密吸取靛藍對照品儲備液適量，以2%水合氯醛二氯甲烷溶液稀釋製成含靛藍分別為0.44、1.76、4.40、6.60、8.80 mg/L系列的對照品溶液。

**供試品溶液**

精密稱取本品粉末0.1 g，置50-mL錐形瓶中，加2%水合氯醛二氯甲烷溶液25 mL，超聲（240 W）處理90分鐘。濾過，取濾液轉移於25-mL 量瓶中，加2%水合氯醛二氯甲烷溶液至刻度，用0.45-μm微孔濾膜（PTFE）濾過，即得。

**色譜系統**

液相色譜：二極管陣列檢測器，檢測波長604 nm；4.6 × 250 mm十八烷基鍵合硅膠（5 μm）填充柱；流速約1.0 mL/min。流動相為甲醇 – 水（62:38, v/v）的混合溶液；流程約20分鐘。

**系統適用性要求**

將靛藍對照品溶液Std-AS（4.40 mg/L）10 μL，注入液相色譜儀，至少重複5次。系統適用性參數的要求如下：靛藍的峰面積相對標準偏差應不大於5.0%；靛藍峰的保留時間相對標準偏差應不大於2.0%；理論塔板數按靛藍峰計算應不低於6000。

供試品測試中靛藍峰與鄰近峰之間的分離度應不低於1.5。

**標準曲綫**

將靛藍系列對照品溶液Std-AS各10 μL，注入液相色譜儀，並記錄色譜圖。以靛藍的峰面積與相應濃度作圖。從相應5點的標準曲綫得斜率、截距與相關系數。

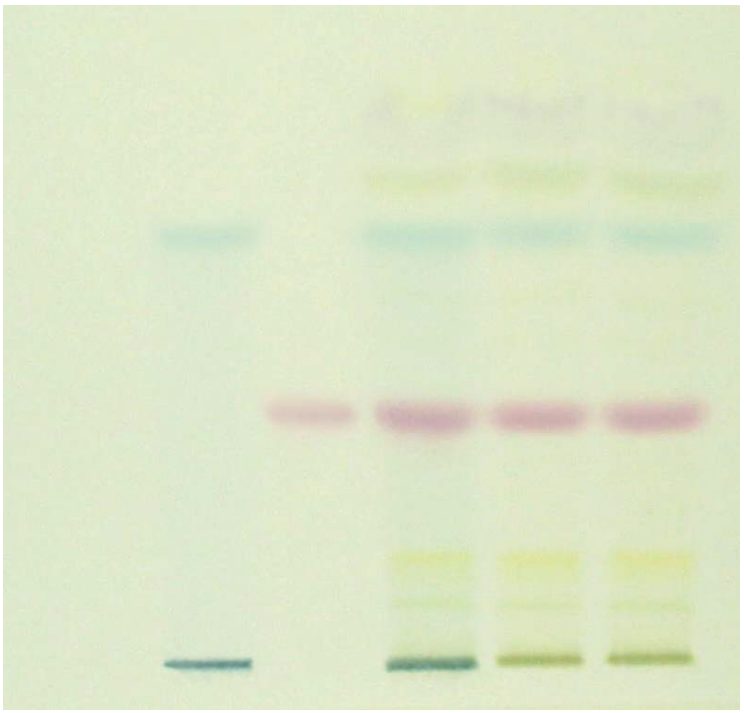
**操作程序**

將供試品溶液10 μL，注入液相色譜儀，並記錄色譜圖。與靛藍對照品溶液Std-AS色譜圖中靛藍峰的保留時間比較，鑒定供試品溶液色譜圖中靛藍峰。二色譜圖中靛藍相應峰的保留時間相差應不大於2.0%。測定峰面積，按附錄IV（B）公式計算供試品溶液中靛藍的濃度（mg/L），並計算樣品中靛藍的百分含量。

**限度**

按乾燥品計算，本品含靛藍（$C_{16}H_{10}N_2O_2$）不少於0.030%。

**Isatidis Folium　(大青葉)**




| 編號 | 樣品 | 結果 |
|---|---|---|
| 1 | 空白對照 [甲醇與二氯甲烷的混合溶液 (1:9, v/v)] | 陰性 |
| 2 | 對照品<br>(靛藍) | 靛藍<br>陽性 |
| 3 | 對照品<br>(靛玉紅) | 靛玉紅<br>陽性 |
| 4 | 加標樣品<br>(樣品加靛藍和靛玉紅) | 靛藍和靛玉紅<br>陽性 |
| 5 | 樣品<br>(大青葉) | 靛藍和靛玉紅<br>陽性 |
| 6 | 平行樣品<br>(大青葉) | 靛藍和靛玉紅<br>陽性 |

**圖 1**　大青葉提取液的薄層色譜圖 (在可見光下檢視)