

Determinación cuantitativa de indigotina e indirubina en el índigo natural mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Quantitative HPLC determination of indigotin and indirubin in indigo naturalis

QIAN B¹, PANICHAYUPAKARANANT P²*, SIRIKATITHAM A², ZHANG RP¹, GUO YD¹ y WU YQ¹

¹ Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Colegio médico de Kunming, Kunming 650031, República Popular China

² Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Príncipe de Songkla, Hat-Yai, Songkla 90112, Tailandia

*Remitir correspondencia al profesor adjunto P. Panichayupakaranant, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112 Thailand.
correo electrónico: pharkphoom.p@psu.ac.th

RESUMEN

Se desarrolló un método de cromatografía líquida de alto rendimiento cuantitativa y de separación utilizando una columna RP-18 eluida isocráticamente con metanol y agua (73:27, v/v) para analizar los compuestos activos isoméricos indigotina e indirubina presentes en el extracto de cloroformo del índigo natural. Se utilizaron soluciones estandarizadas de indigotina e indirubina para evaluar la linealidad, la precisión (replicabilidad), la exactitud y la especificidad del método. Los resultados mostraron una linealidad ($r^2 > 0,999$) de entre 1,8 y 16,2 $\mu\text{g/ml}$ para la indigotina y entre 1,6 y 14,4 $\mu\text{g/ml}$ para la indirubina. También se obtuvo un alto grado de especificidad, robustez, replicabilidad (desviación estándar relativa inferior al 5% para estándares y extractos) y exactitud (% de recuperaciones superior al 95%).

PALABRAS CLAVE: *Baphicacanthus cusia*. HPLC. Índigo natural. Indigotina. Indirubina.

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatographic separation and quantitative method using a RP-18 column eluted isocratically with methanol and water (73:27, v/v) was developed to analyze the isomeric active compounds, indigotin and indirubin, present in the chloroform extract of indigo naturalis. Standardized solutions of indigotin and indirubin were used to evaluate linearity, precision (repeatability), accuracy and specificity of the method were evaluated. The results exhibited a linearity ($r^2 > 0.999$) of between 1.8 - 16.2 $\mu\text{g/ml}$ and 1.6 - 14.4 $\mu\text{g/ml}$ for indigotin and indirubin, respectively. A high degree of specificity and robustness, as well as repeatability (relative standard deviation less than 5% for both standards and the extracts) and accuracy (% recoveries greater than 95%) were also achieved.

KEY WORDS: *Baphicacanthus cusia*. HPLC. Indigo naturalis. Indigotin. Indirubin.

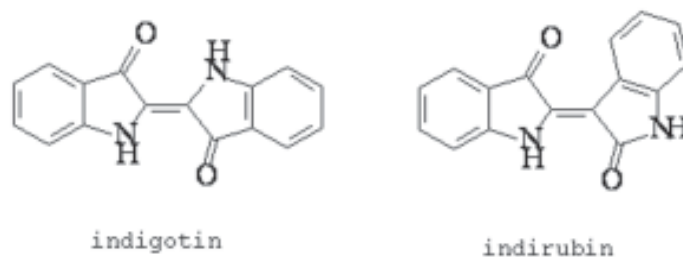
INTRODUCCIÓN

El índigo natural es un polvo de color azul oscuro que se extrae de las hojas y los tallos de las plantas *Baphicacanthus cusia* (Ness) Bremek (familia de las acantáceas), *Polygonum tinctorium* Ait (familia de las poligonáceas), *Isatis tinctoria* Fort (familia de las crucíferas) o *Indigofera tinctoria* L. (familia de las leguminosas) mediante procesos de fabricación. Se utiliza en la medicina tradicional china para el tratamiento de infecciones virales respiratorias y otras enfermedades inflamatorias¹. El polvo contiene un alto nivel de colorante azul, la indigotina (índigo)^{2,3}, pero la actividad antiviral⁴, antiinflamatoria⁵ y antileucémica⁶⁻⁹ se atribuye al isómero de color rojo, la indirubina (isoindigotina o índigo carmín, figura 1). La calidad del índigo natural varía a menudo según los distintos recursos, lugares de cultivo y procesos de fabricación. Se han empleado varios métodos para el análisis cuantitativo del índigo natural, entre los que se incluyen la densitometría-cromatografía de capa fina (TLC)¹⁰, la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) seguida de análisis densitométrico¹¹, la espectrofotometría¹² y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)¹³⁻¹⁴. Aunque se ha desarrollado el método HPLC para el análisis cuantitativo del índigo natural, aún no se ha realizado una validación del procedimiento analítico. Como parte de nuestro interés por el control cualitativo de la materia prima del índigo natural, hemos buscado un método fácil y robusto para el análisis cuantitativo. En este estudio se utilizó índigo natural extraído de la planta *B. cusia*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de la indigotina y la indirubina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

INTRODUCTION

Indigo naturalis is a dark blue powder prepared from the leaves and stems of *Baphicacanthus cusia* (Ness) Bremek. (Fam. Acanthaceae), *Polygonum tinctorium* Ait (Fam. Polygonaceae), *Isatis tinctoria* Fort. (Fam. Cruciferae) or *Indigofera tinctoria* L. (Fam. Leguminosae) through manufacturing processes. It is used in traditional Chinese medicine to treat respiratory viral infection and other inflammatory diseases¹. The powder contains a high level of the blue dye, indigotin (indigo)^{2,3}, but the antiviral⁴, anti-inflammatory⁵ and antileukemic⁶⁻⁹ activities are attributed to the red color isomer, indirubin (isoindigotin or indigo red (Figure 1). The quality of indigo naturalis often varies due to the different resources, cultivation places and manufacturing processes. Several analytical methods for quantitative analysis of indigo naturalis, including TLC-densitometry¹⁰, HPTLC followed by densitometric analysis¹¹, spectrophotometry¹² and high-performance liquid chromatography (HPLC)¹³⁻¹⁴ have been reported. Although the HPLC method for quantitative analysis of indigo naturalis has been developed, validation of the analytical procedure is not yet established. As part of our interest in the quality control of indigo naturalis raw materials, we have searched for an easy and robust method for quantitative analysis. In this study, indigo naturalis prepared from *B. cusia* was used. The aim of this work was to develop and validate an analytical method for the quantification of indigotin and indirubin through HPLC.

FIGURA 1. Estructuras químicas de la indigotina y la indirubina.
FIGURE 1. Chemical structures of indigotin and indirubin.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Material de la planta*

El índigo natural se adquirió de la compañía de materiales médicos de Yunnan, República Popular China.

2. *Productos químicos y reactivos*

La indigotina y la indirubina se recibieron de institutos de pruebas biológicas y farmacéuticas de China. De Labscan Asia (Tailandia) se adquirió metanol (grado HPLC), cloroformo, y acetato de etilo y metanol (grado analítico). El ácido acético se obtuvo de J.T. Baker (EE.UU.). El agua se purificó en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

3. *Solución estándar*

Se prepararon soluciones madre independientes en cloroformo de los estándares de referencia, indigotina e indirubina. Posteriormente, se preparó una solución de trabajo en cloroformo de los estándares combinados. Esta solución se diluyó para obtener una serie de concentraciones de indigotina e indirubina comprendida entre 1,8 y 16,2 µg/ml y 1,6 y 14,4 µg/ml, respectivamente, que se utilizó para construir las curvas de calibración de cada uno de los analitos determinados.

4. *Extracción de muestras*

4.1 *Disolvente adecuado para la extracción*

Se realizó un estudio preliminar para obtener un disolvente adecuado para la extracción de muestras. Se extrajeron 20 mg de índigo natural con 20 ml de diferentes disolventes, incluidos el metanol, el acetato de etilo y el cloroformo, en condiciones de reflujo durante 4 horas. Los extractos se filtraron con un filtro PVDF de 0,5 µm antes de realizar la inyección. Los experimentos se realizaron por triplicado.

MATERIAL AND METHODS

1. *Plant material*

Indigo naturalis was purchased from the Material Medic Company of Yunnan, P.R.China.

2. *Chemicals and reagents*

Indigotin and Indirubin were received from Chinese Pharmaceutical and Biological Tested Institutes. Methanol (HPLC grade), chloroform, methanol and ethyl acetate (analytical grade) were purchased from Labscan Asia (Thailand). Acetic acid was from J.T. Baker (USA). Water was purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

3. *Standard solution*

Separate stock solutions of the reference standards, indigotin and indirubin were made in chloroform. Working solution of the combined standards was subsequently prepared in chloroform and diluted to provide a series of indigotin and indirubin concentrations ranging from 1.8 - 16.2 µg/ml and 1.6 - 14.4 µg/ml, respectively, for use in constructing calibration curves for each of the target analytes.

4. *Sample extraction*

4.1 *Suitable solvent for extraction*

A preliminary study was performed in order to obtain a suitable solvent for sample extraction. Indigo naturalis (20 mg) was extracted with different solvents (20 ml), including methanol, ethyl acetate, chloroform under reflux condition for 4 hours. The extracts were filtered through a 0.5 µm PVDF filter before injecting. The experiments were in triplicate.

4.2 *Extraction procedure*

Indigo naturalis (20 mg) was extracted with chloroform (20 ml) under reflux condition (65°C) for 4 hours. The extract was then fil-

4.2 Procedimiento de extracción

Se extrajeron 20 mg de índigo natural con 20 ml de cloroformo en condiciones de reflujo (65 °C) durante 4 horas. A continuación, el extracto se filtró y se ajustó a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico. A fin de evitar una posible degradación química, las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C y protegidas de la luz y se analizaron inmediatamente después de la extracción.

5. Condiciones de HPLC

Para realizar el análisis de HPLC se utilizaron bombas Waters 600 equipadas con un procesador de muestras automático y un detector de matriz de fotodiodos Waters 966. El análisis de los datos se realizó con el software Millennium 2.0 (Waters, EE.UU.). La separación se consiguió isocráticamente a 25 °C en una columna TSK-gel ODS-80Ts de 150 mm x 4,6 mm i.d. La fase móvil, compuesta de metanol-agua (73:27, v/v), se bombeó a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 5 µl. La longitud de onda de cuantificación se estableció en 290 nm.

6. Método de validación

6.1 Curva de calibración

Las curvas de calibración se construyeron en tres días consecutivos mediante el análisis de una mezcla que contenía cada uno de los compuestos estándar con cuatro concentraciones y el trazado del área pico en relación a la concentración de cada estándar de referencia. La linealidad de la respuesta del detector para los estándares se evaluó mediante regresión lineal. Las curvas mostraron un coeficiente de correlación (r^2) $\geq 0,999$.

6.2 Exactitud

Para evaluar la exactitud del ensayo, se añadió una cantidad de los compuestos estándar antes de la extracción. Se determinó la cantidad de cada analito por triplicado y se calcularon a continuación las recuperaciones porcentuales.

tered and adjusted to 25 ml with chloroform in a volumetric flask. In order to avoid possible chemical degradation, the samples were kept at 4°C, protected from light, and analyzed immediately after extraction.

5. HPLC Conditions

HPLC analysis was carried out using Waters 600 pumps equipped with a Waters 966 photodiode-array detector (PDA) and autosampler. Data analysis was performed using Millennium 2.0 software (Waters, USA). Separation was achieved isocratically at 25°C on a 150 mm x 4.6 mm i.d. TSK-gel ODS-80Ts column. The mobile phase consisted of methanol-water (73:27, v/v) and was pumped at a flow rate of 1 ml/min. The injection volume was 5 µl. The quantitation wavelength was set at 290 nm.

6. Method validation

6.1 Calibration curve

Calibration curves were constructed on three consecutive days by analysis of a mixture containing each of the standard compounds at four concentrations and plotting peak area against the concentration of each reference standard. The linearity of the detector response for the standards was assessed by means of linear regression. The curves showed coefficient of correlation (r^2) ≥ 0.999 .

6.2 Accuracy

Spiking an amount of the standard compounds before extraction assessed the accuracy of the assay. The amount of each analytes was determined in triplicate and percentage recoveries were then calculated.

6.3 Repeatability

The repeatability was determined for both standards and the sample. Each solution was injected six times. The mean amount and the relative standard deviation (%R.S.D.) were calculated for both standards and sample.

6.3 Replicabilidad

Se determinó la replicabilidad tanto de los estándares como de la muestra. Cada solución se inyectó seis veces. Se calculó la desviación estándar relativa (% DER) y la cantidad media de los estándares y de la muestra.

6.4 Especificidad

La identificación de los picos se llevó a cabo utilizando los estándares y el detector de matriz de diodos. Se midió el espectro de radiación UV en varios puntos de los picos para comprobar la homogeneidad de los picos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Disolvente adecuado para la extracción

Se examinaron el metanol, el acetato de etilo y el cloroformo como disolventes adecuados para la extracción de índigo natural. Los resultados mostraron que el cloroformo permitía la extracción de las mayores cantidades de indigotina e indirubina del índigo natural (Tabla 1). Aunque se consiguió una extracción total de indirubina con acetato de etilo, este disolvente sólo permitió la extracción de una pequeña cantidad de indigotina. El metanol sólo permitió la extracción de pequeñas cantidades de indigotina e indirubina debido a la elevada polaridad de este disolvente. La temperatura de extracción también constituye un factor importante que afecta a la extracción de la indigotina y la indirubina. La extracción ultrasónica condujo a una extracción incompleta (datos no mostrados). Por lo tanto, el reflujo con cloroformo se utilizó en la práctica para la extracción de índigo natural en otros estudios.

6.4 Specificity

The identification of the peaks was carried out using the standards and diode-array detector. The UV spectra were taken at various points of the peaks to check the homogeneity of the peaks.

RESULTS AND DISCUSSION

Suitable solvent for extraction

Methanol, ethyl acetate and chloroform were examined as suitable solvents for indigo naturalis extraction. The results showed that chloroform was capable of extracting the highest amount of indigotin and indirubin from indigo naturalis (Table 1). Although indirubin was completely extracted by ethyl acetate, indigotin was only slightly extracted. Both indigotin and indirubin were slightly extracted by methanol due to the high polarity of the solvent. An extraction temperature is also an important factor affecting indigotin and indirubin extraction. Ultrasonic extraction led to an incomplete extraction (data not show). Thus, refluxing with chloroform was practically used for indigo naturalis extraction in further studies.

Tabla 1 Efecto de los disolventes en la extracción de indigotina e indirubina del índigo natural.
Table 1 Effect of the solvents on extraction of indigotin and indirubin from indigo naturalis.

Disolventes <i>Solvents</i>	Contenido (% p/p) <i>Content (% w/w)</i>	
	Indigotina <i>Indigotin</i>	Indirubina <i>Indirubin</i>
Metanol <i>Methanol</i>	1,21 ± 0,052	0,13 ± 0,003
Acetato de etilo <i>Ethyl acetate</i>	1,48 ± 0,030	0,18 ± 0,002
Cloroformo <i>Chloroform</i>	2,70 ± 0,026	0,17 ± 0,006

Datos expresados como la media ± la variación estándar de tres mediciones.
 Data were expressed as mean ± standard variation of three measurements.

Optimización de la separación cromatográfica

Se examinaron las condiciones óptimas para el análisis de la indigotina y la indirubina presentes en el extracto de índigo natural mediante un sistema isocrático de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa. Se examinaron las mezclas de metanol y agua como fase móvil y se optimizó su composición. La proporción metanol-agua necesaria para obtener una buena resolución de indigotina e indirubina fue de 73:27 v/v (Figura 2). También se examinaron diferentes longitudes de onda y temperaturas de columna para mejorar la resolución, la sensibilidad y la especificidad del sistema HPLC. La separación de referencia del índigo y la indirubina se consiguió al cabo de 10 minutos a una temperatura de 25 °C. Se observó que el componente principal del índigo natural procedente de la planta *B. cusia* era la indigotina, cuyo contenido ascendía al 2,65% p/p. A pesar de ser un componente secundario (0,15% p/p), la indirubina constituye el componente activo biológico y debe representar un marcador importante para el control de calidad del índigo natural.

Optimization of chromatographic separation

We examined the optimal conditions for the analysis of indigotin and indirubin in indigo naturalis extract using isocratic reverse phase HPLC system. Mixtures of methanol and water were examined as the mobile phase and its composition was optimized. The ratio of methanol to water required to obtain a good resolution of indigotin and indirubin was 73:27 v/v (Figure 2). In addition, different wavelengths and column temperatures were examined to improve the resolution, sensitivity and specificity of the HPLC system. Baseline separation of indigo and indirubin was achieved within 10 minutes at 25°C. It was found that the major constituent of indigo naturalis produced from *B. cusia* is indigotin, which was up to 2.65% w/w. Although indirubin is a minor constituent (0.15% w/w), it is the biological active constituent and should be an important marker for the quality control of indigo naturalis.

FIGURA 2. Análisis HPLC de indigotina e indirubina en el extracto de índigo natural; (1) indirubina (TR = 6,1 min) e (2) indigotina (TR = 9,0 min). Los cromatogramas se registraron a 290 nm. El análisis HPLC se realizó tal como se describe en Materiales y métodos.

FIGURE 2. HPLC analysis of in indigo naturalis extract; (1) indirubin (RT = 6.1 min) and (2) indigotin (RT = 9.0 min). Chromatograms were recorded at 290 nm. HPLC analysis was performed as described in Material and Methods.

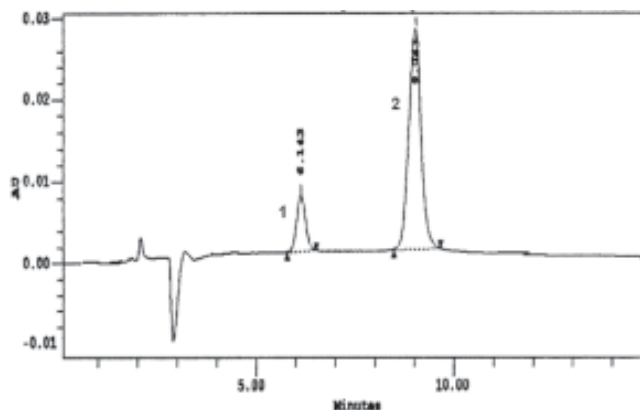


TABLA 2. Contenido de indigotina e indirubina en el índigo natural analizado mediante HPLC.

TABLE 2. Indigotin and indirubin content in indigo naturalis analyzed by HPLC.

Componentes <i>Constituents</i>	Contenido (% p/p) <i>Content (% w/w)</i>
Indigotina <i>Indigotin</i>	2,65 ± 0,083
Indirubina <i>Indirubin</i>	0,15 ± 0,002

Datos expresados como la media ± la variación estándar de tres mediciones.
 Data are expressed as mean ± standard variation of three measurements.

Las ventajas de este método son la determinación cuantitativa simultánea de la indigotina y la indirubina y la relativa rapidez del procedimiento. Las condiciones de cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HP-TLC) descritas por Oberthür *et al.* no permitieron separar la indigotina de la indirubina. El método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) anteriormente expuesto sólo permitió determinar el contenido de indigotina¹³. Además, el método HPLC descrito por Maugard *et al.* es relativamente lento, ya que requiere un tiempo de ejecución total de unos 40 minutos. El contenido de indigotina analizado mediante nuestro método también concuerda con el informe anterior. El contenido de indigotina e indirubina analizado mediante espectrofotometría¹⁰ y densitométría-cromatografía de capa fina (TLC)¹² es inferior

The simultaneous quantitative determination of indigotin and indirubin and relatively fast method are the advantage of this method. The HPTLC conditions described by Oberthür *et al.* could not separate indigotin from indirubin. The previously reported HPLC method determined only the content of indigotin¹³. In addition, the HPLC method described by Maugard *et al.* is relatively slow; a total run time of about 40 minutes is required. The indigotin content analyzed by our method is also agreeable to the previous report. The content of indigotin and indirubin analyzed by spectrophotometric¹⁰ and TLC-densitometric method¹² is lower than that analyzed by HPLC due to complex extraction procedures and ease of indigotin and indirubin decomposition in light.

al analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) debido a los complejos procedimientos de extracción y a la facilidad de descomposición de la indigotina y la indirubina en presencia de luz.

Método de validación

La validación del método HPLC se realizó mediante la definición de la linealidad, la exactitud, la reproducibilidad, la especificidad y la robustez. Para evaluar la linealidad se utilizaron muestras estándar con cuatro puntos de calibración (desde 1,8 - 16,2 mg/ml y 1,6 - 14,4 mg/ml para la indigotina y la indirubina, respectivamente) con seis mediciones para cada punto de calibración (Tabla 3). La indigotina y la indirubina mostraron linealidad por encima de los rangos evaluados con unos coeficientes de correlación de 0,9998 y 0,9999, respectivamente.

Method validation

Defining the linearity, accuracy, repeatability, specificity and robustness validated the HPLC method. Linearity was evaluated using standard samples over four calibration points (from 1.8 - 16.2 mg/ml and 1.6 - 14.4 mg/ml for indigotin and indirubin, respectively) with six measurements for each calibration points (Table 3). Indigotin and indirubin exhibited linearity over the evaluated ranges with correlation coefficients 0.9998 and 0.9999, respectively.

TABLA 3. Rangos lineales y coeficientes de correlación de las curvas de calibración.

TABLE 3. Linear ranges and correlation coefficients of calibration curves.

Componentes <i>Constituents</i>	$Y = aX + b$ modelo lineal ^a $Y = aX + b$ linear model ^a	Linealidad ^b <i>Linearity</i> ^b	Concentración (µg/ml) <i>Concentration</i> (µg/ml)
Indigotina <i>Indigotin</i>	$Y = 1485,7 X - 11353$	0,9998	1,8 - 16,2
Indirubina <i>Indirubin</i>	$Y = 81809,0 X - 51858$	0,9999	1,6 - 14,4

^a Y = área pico; X = concentración

^b La linealidad se expresó como el coeficiente de correlación de cada curva de calibración, que se determinó mediante cuatro puntos de calibración con tres mediciones.

^a Y = peak area; X = concentration

^b Linearity was expressed as the correlation coefficient of each calibration curve, which was determined by four calibration points with three measurements.

Para evaluar la replicabilidad se utilizó tanto el extracto de índigo natural como el estándar. La muestra estándar y la preparación de índigo natural se analizaron en seis ocasiones distintas. La replicabilidad se calculó mediante la desviación estándar relativa de seis mediciones, que fueron inferiores al 5% (Tabla 4). Para evaluar la exactitud del método se analizó el extracto de índigo natural añadido con una concentración conocida de los compuestos estándar. Antes de la adición, se de-

Repeatability was evaluated using both standard and indigo naturalis extract. Standard sample and the preparation of indigo naturalis were analyzed on six separate occasions. Repeatability was estimated by the relative standard deviation of six measurements, all of which were less than 5% (Table 4). Accuracy of the method was evaluated by analyzing the indigo naturalis extract spiked with a known concentration of the standards. Prior to spiking, the background levels of indigotin and

terminaron los niveles de fondo de indigotina e indirubina del extracto de índigo natural a fin de calcular las recuperaciones reales. Se observaron recuperaciones superiores al 95% para ambos compuestos (Tabla 4).

indirubin in the extract of indigo naturalis were determined in order to calculate actual recoveries. Recoveries greater than 95% were observed for both compound (Table 4).

TABLA 4. Replicabilidad y recuperaciones de la indigotina y la indirubina del índigo natural.
TABLE 4. Repeatability and recoveries of indigotin and indirubin from indigo naturalis.

Componentes <i>Constituents</i>	Replicabilidad ^a <i>Repeatability</i> ^a		% recuperación ^b <i>% Recovery</i> ^b
	Estándar <i>Standard</i>	Extracto <i>Extract</i>	
Indigotina <i>Indigotin</i>	1,79	2,00	96,17 ± 3,60
Indirubina <i>Indirubin</i>	1,85	3,14	98,72 ± 4,40

^a Datos expresados como la desviación estándar relativa (%) de seis mediciones.

^b Datos expresados como la media ± la variación estándar de tres mediciones.

^a Data are expressed as relative standard deviation (%) of six measurements.

^b Data are expressed as mean ± standard variation of three measurements.

Finalmente, se evaluó la robustez mediante el examen de los efectos de los cambios en la composición de la fase móvil, la columna y la longitud de onda para detección. Cualquier alteración en la concentración de metanol de la fase móvil del 73% al 70%, de la columna de TSK-gel ODS-80Ts a Spherisorb C18 y de la longitud de onda de 290 a 295 nm no tuvo influencia alguna en el análisis cuantitativo. Estos resultados confirmaron la validez de este método analítico.

Finally, to evaluate robustness, we examine the effects of changes in the mobile phase composition, column and wavelength for detection. Any alteration in methanol concentration of the mobile phase from 73% to 70%, a change of column from TSK-gel ODS-80Ts to Spherisorb C18 column, and a change of wavelength from 290 to 295 nm had no influence on the quantitative analysis. These results confirmed the validity of this analytical method.

CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) sencillo, específico, preciso, exacto, rápido y reproducible para cuantificar los principios activos isoméricos presentes en el índigo natural. La determinación cuantitativa simultánea de indigotina e indirubina proporciona una información de referencia útil para el control de calidad del índigo natural.

CONCLUSION

A simple, specific, precise, accurate, rapid and reproducible HPLC method has been developed to quantify the isomeric active principles in indigo naturalis. The simultaneous quantitative determination of indigotin and indirubin provides useful marker information for the quality control of indigo naturalis.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Bensky D, Clavey S, Stoger E, Gamble A. *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica* (3rd edn). 1986; Eastland Press. Seattle.
2. Chen DH, Xie JX. Chemical constituents of traditional Chinese medicine Qing Dai. *Chinese Trad Herb Drugs* 1984; 15: 6-8.
3. Zhang SX. Studies on the chemical constituents of *Isatis indigotica* root. *Chinese Trad Herb Drugs* 1983; 14: 247-248.
4. Mak N, Leung C, Wei X, Shen X, Wong RN, Leung K, Fung M. Inhibition of RNATES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 167-174.
5. Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delay-type hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 2000; 410: 93-100.
6. Wu LM, Yang YP, Zhu ZH. Studies on the active principles of *Indigofera tinctoria* in the treatment of CML. *Comm Chinese Herb Med* 1979; 9: 6-8.
7. Zheng QT, Lu D J, Yang SL. Pharmacological studies of indirubin. I. Antitumor effect. *Comm Chinese Herb Med* 1979; 10: 35-39.
8. Zheng QT, Qi SB, Cheng ZY. Pharmacological studies of indirubin. II. Absorption, distribution and excretion of ³H-indirubin. *Comm Chinese Herb Med* 1979; 10:19 – 21.
9. Wu GY, Fang FD, Liu JZ, Chang A, Ho YH. Study on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effect on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells. *Chinese Med J* 1980; 60: 451-454.
10. Tang Y. Determination of indirubin in Indigo naturalis and its Chinese patent medicines. *Chinese J. Pharm Anal* 1987; 7(1): 24.
11. Oberthür C, Graf H, Hamburger M. The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves-a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. *Phytochemistry* 2004; 65: 3261-3268.
12. Lu R. Determination of indirbin and indigotin in Indigo naturalis with dual wave length. *Chinese Pharm Bull* 1986; 21(2): 72.
13. Li H, liu H, Wu G. Determination of indirubin in Indigo naturalis with HPLC. *Chinese Trad Herb Drugs* 1992; 23(5): 244.
14. Maugard T, Enaud E, Choisy P, Dominique L. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry*. 2001; 58: 897-904.