

RP-HPLC法分析白花前胡中 Pd-Ia 和紫花前胡中 Pd-C-I的含量

孔令义 李 意¹ 闵知大

(中国药科大学天然药物化学教研室, 南京 210009; 南京师范大学理化实验中心, 南京 210097)

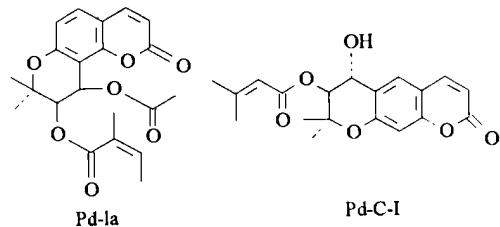
摘要 建立了 RP-HPLC 测定白花前胡根中 $3'(R)$ -angeloyloxy- $4'(R)$ -acetoxy- $3'$ -, $4'$ -dihydroseselin (Pd-Ia) 和紫花前胡根中 $3'(R)$ -senecioyloxy- $4'(S)$ -hydroxy- $3'$ -, $4'$ -dihydroxyanethyletin (Pd-C-I) 含量的方法。色谱柱为 ODS, 甲醇水 (71: 29 v/v) 为流动相, 流速为 0.4 ml/min, 紫外检测波长 320 nm, 线性范围分别为 0.02~0.06 μ g 和 0.01~0.05 μ g, 相关系数分别为 $r=0.9990$ 和 $r=0.9996$, 平均回收率分别为 99.53% 和 100.93%。本法结果准确, 步骤简便, 灵敏度高, 分析速度快, 重现性好, 为常用中药前胡的质量检测提供了现代可靠手段。

关键词 白花前胡；紫花前胡；Pd-Ia；Pd-C-I；反相高效液相色谱法

前胡为历次版本的《中华人民共和国药典》收载的常用中药,具有散风清热,降气化痰的功效。正品为伞形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 和紫花前胡 *Peucedanum decursivum* (Miq) Maxim. 的根,主要有有效成分和化学成分为香豆素类化合物,我国药典及文献中对其质量的检测只有其乙醚提取液在紫外光下观察荧光,以及甲醇提取液与冰醋酸,乙酰氯和氯化锌的显色反应等方法^[1],这些实验无法检测代表前胡功效的有效成分含量,难以控制药材的真伪和优劣,而用 HPLC 分析前胡中有效成分的含量,国内外均未见报道。

白花前胡的特征性成分为角型二氢吡喃香豆素类化合物^[2],尤以3'(R)-angeloyloxy-4'(R)-acetoxy-3',4'-dihydroseselin(Pd-Ia)具有显著的钙离子拮抗活性^[3],具有平滑肌松弛作用及抗过敏介质游离的抑制作用这和前胡的平喘镇咳,祛痰等作用,可应用于支气管炎,风热感冒,上呼吸道感染等症的传统中医记载及现代生理活性研究的结果颇为相符。紫花前胡的特征性成分为

线型二氢吡喃香豆素类化合物^[2] ,这类成分也具有一定的钙离子拮抗活性,以 3' (R) -senecioyloxy-4' (S) -hydroxy-3', 4'-dihydroxyanthyletin (Pd-C-I) 为代表成分。本文首次用反相 HPLC 法分别将白花前胡和紫花前胡根中香豆素成分进行分离,并以此为基础,建立了用 RP-HPLC 法分析白花前胡中 Pd-Ia 和紫花前胡中 Pd-C-I 含量的新方法。此法不仅结果准确,而且步骤简便,灵敏度高,分析速度快,重现性好,可望成为检测前胡的新方法,这对前胡的质量控制有重要意义。



1 实验材料

1.1 仪器与色谱条件

日本 Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪；

收稿日期 1995-06-29

SPD-6AV 紫外可见分光光度检测器; C-R3A 数据处理系统; 色谱柱 Shimadzu SBC-ODS(5 μ m, 15 cm \times 2.5 mm ID); 流动相甲醇水(71: 29, v/v); 柱温 28°C。

1.2 试剂 对照品及样品

甲醇(HPLC 级); 水(双蒸去离子水); Pd-Ia 和 Pd-C-I 对照品均为作者从白花前胡和紫花前胡中分离得到, 并经各种理化常数和波谱数据鉴定; 样品白花前胡和紫花前胡均采自南京中山植物园, 其根洗净 50°C 干燥切碎后至恒重, 过 40 目筛。

2 实验方法

2.1 检测波长的选择

分别用甲醇将 Pd-Ia 和 Pd-C-I 配制成立对照品溶液, 浓度均为 100 μ g/ml, 用 Shimadzu UV-26 紫外分光光度计进行扫描, 测定吸收波长, 它们在 320 nm 处均有最大吸收, 故确定 320 nm 为检测波长。

2.2 流动相选择

选用 ODS 柱, 更换甲醇和水的比例, 经反复试验, 甲醇水(71: 29 v/v) 为流动相时, 能同时使白花前胡和紫花前胡的香豆素成分得到较好分离, 特别是 Pd-Ia 及 Pd-C-I 和其它结构相似的成分得到最佳分离。

2.3 样品提取方法的选择

2.3.1 不同溶媒提取效果的比较 称取白花前胡根和紫花前胡根的细粉(40 目)各 0.5 g, 分别用甲醇、氯仿、环己烷热回流提取样品 5 次, 每次 1 h, 按上述色谱条件测得白花前胡根中 Pd-Ia 含量在 3 种溶媒提取液的含量分别为 0.05%, 0.15%, 0.07%。紫花前胡根中 Pd-C-I 含量在 3 种溶媒提取液的含量分别为 0.06%, 0.12%, 0.08%。由此可见采用

氯仿提取为佳。

2.3.2 不同提取方法的比较 对氯仿冷浸、氯仿热回流和氯仿超声振荡 3 种方法进行了考察。测试结果表明, 3 种方法得白花前胡根中 Pd-Ia 含量分别为 0.07%, 0.13%, 0.09%, 紫花前胡根中 Pd-C-I 含量分别为 0.05%, 0.10%, 0.08%, 氯仿热回流法提取最为完全, 故本实验采取此方法。

2.3.3 提取率考察 精密称取白花前胡和紫花前胡根细粉各 0.5 g, 加入氯仿热回流提取 3 次(5, 5, 5 ml), 3 次结果白花前胡中 Pd-Ia 含量分别为 0.12%, 0.037%, 0.0012%, 紫花前胡中 Pd-C-I 含量分别为 0.093%, 0.03%, 0.0010%。进样测定结果表明 3 次即已提取完全。

2.4 检出限

按信噪比 3: 1 计, 测得白花前胡根中 Pd-Ia 的检出限为 0.0381 μ g; 紫花前胡根中 Pd-C-I 的检出限为 0.0190 μ g。

2.5 柱效

以 Pd-Ia 的色谱峰测得的理论塔板数为 1.7 \times 10⁴。

2.6 标准曲线制备

精密称取 Pd-Ia 对照品和 Pd-C-I 对照品各 20 mg, 各用甲醇 50 ml 溶解后配成标准贮备液, 其浓度为 400 μ g/ml, 分别取不同量的标准贮备液配制 Pd-Ia 和 Pd-C-I 的系列对照品溶液, 各进样 1 μ l, 其测定结果见表 1。

由此得出 Pd-Ia 在 0.02~0.06 μ g 范围内峰面积与进样量(μ g)的回归方程为 $y = -1.581 \times 10^3 + 2.690 \times 10^3 C, r = 0.9990 (n = 5)$; Pd-C-I 在 0.01~0.05 μ g 范围内峰面积与进样量(μ g)的回归方程为 $y = 1.240 \times 10^3 + 5.117 \times 10^3 C, r = 0.9996 (n = 5)$ 。

Tab 1. The data of the standard curves($n = 5$)

Quantities injected, μ g	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
Areas of Pd-Ia		52447	77345	106899	135526	157849
Areas of Pd-C-I	52733	101394	158135	204463	257061	

2.7 待测液的制备和含量测定

精密称取白花前胡根和紫花前胡根的细粉各 0.5 g, 分别用氯仿 5 ml 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 蒸干氯仿, 加甲醇溶解过滤后定容至 5 ml 容量瓶中, 精密吸取 1.0 ml 稀释再定容至 5 ml 容量瓶中, 经 0.20 μ m 微孔滤膜过滤, 即为供试液。进样 1 μ l, 按上述色谱条件进行分离测定, 测得峰面积按外标法计算含量。

3 结果

3.1 稳定性试验

分别取白花前胡和紫花前胡根供试液, 各自进样 (进样量为 1 μ l), 按上述色谱条件进行测定, 并将测得的各自试液中的含量分别换算成白花前胡根中 Pd-Ia 和紫花前胡根中 Pd-C-I 的含量, 分别考察它们的日内及日间稳定性, 结果见表 2。

3.2 精密度试验

白花前胡和紫花前胡根试液, 各自进样 1 μ l, 按上述色谱条件进行测定, 连续重复操作 5 次, 分别测得 Pd-Ia 和 Pd-C-I 的峰面积, 各自换算成白花前胡根中 Pd-Ia 的含量和紫花前胡根中 Pd-C-I 的含量, 结果见表 3。

3.3 回收率试验

将浓度分别为 20, 40, 60 μ g/ml 的 Pd-Ia 对照液和浓度分别为 10, 20, 40 μ g/ml 的 Pd-C-I 对照液 1 μ l 各自加入已知含量的白花前胡根 0.5 g 和紫花前胡根 0.5 g 的细粉中, 各加入氯仿 5 ml 回流 2 次, 每次 1 h, 过滤吹干后加甲醇定容于 2 ml 容量瓶中, 经 0.20 μ m 微孔滤膜过滤, 各自吸取滤液 1 μ l。

进样, 测得加样回收率结果见表 4。

由此可知, 白花前胡根中 Pd-Ia 的平均回收率为 99.53%, RSD 为 0.97% (n=3); 紫花前胡根中 Pd-C-I 的平均回收率为 100.93%, RSD 为 1.0% (n=3)。

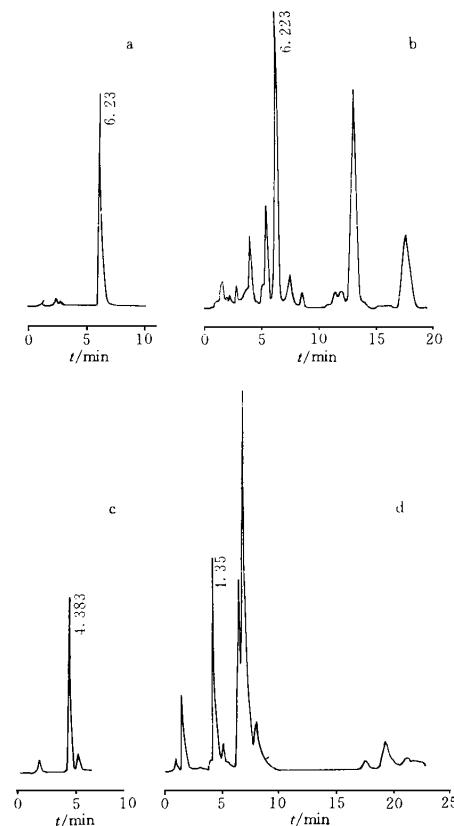


Fig. 1. HPLC chromatograms

a. Pd-Ia b. Chloroform extract of *Peucedanum praeruptorum*
c. Pd-C-I d. Chloroform extract of *Peucedanum decursivum*

Tab 2. The stability determination of the method (n=5)

	Within-day			Between-day				
	Content, %	Average, %	RSD, %	Content, %	Average, %	RSD, %		
Pd-Ia in PP [*]	0.167 0.158	0.155 0.163	0.159	3.8	0.151 0.154	0.168 0.160	0.160	4.5
Pd-C-I in PD ^{**}	0.152	0.119	0.128	0.124	0.127	0.119	0.122	3.7
	0.125	0.126	0.122	0.125	0.124	0.116		

* *Peucedanum praeruptorum* ** *Peucedanum decursivum* 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Tab 3. The precision determination of the method($n=5$)

Sample	1	2	3	4	5	Average	RSR %
Pd-Ia in PP ,%	0.165	0.153	0.156	0.158	0.161	0.159	2.9
Pd-C-I in PD [†] ,%	0.125	0.126	0.121	0.120	0.123	0.123	2.1

* *Peucedanum praeruptorum* ** *Peucedanum decursivum*Tab 4. Measured results of recoveries of the method($n=5$)

Sample	Blank μg	Added μg	Total μg	Found μg	Recovery %	RSR %
Pd-Ia in PP	0.3981	0.2000	0.5985	0.2004±0.0048	100.20±2.4	2.4
	0.4002	0.4000	0.7939	0.3937±0.0153	98.43±3.9	3.9
	0.3964	0.6000	0.9962	0.5998±0.0185	99.97±2.1	2.1
Pd-C-I in	0.3066	0.1000	0.4085	0.1019±0.0033	101.90±3.2	3.2
	PD [†]	0.3098	0.2000	0.5094	0.1996±0.0051	99.80±2.6
PD [†]	0.3021	0.4000	0.7064	0.4043±0.0142	101.08±3.5	3.5

* *Peucedanum praeruptorum* ** *Peucedanum decursivum*

4 讨 论

1) 在天然药物化学研究中,氯仿是角型和线型二氢吡喃香豆素的良好溶剂,本文的加样回收率结果表明,在前胡的质量分析中氯仿也是从药材中提取该类化合物的理想溶剂。

2) 角型和线型二氢吡喃香豆素类化合物均在紫外 320 nm 处显示最大吸收^[3],在该波长下 Pd-Ia 和 Pd-C-I 及前胡中其他类似香豆素成分均有最大吸收,故选择 320 nm 作为紫外检测波长能真正反映 Pd-Ia 及 Pd-C-I

与其他类似成分的分离情况

3) 本实验选择甲醇水(71:29, v/v)作为流动相,使 Pd-Ia 和 Pd-C-I 与其他成分得到最佳分离,流动相简单,价廉,易得,有益于一般实验室常规应用。

致谢 南京中山植物园袁昌齐教授鉴定白花前胡和紫花前胡原植物,并与作者进行有益的讨论。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 237
- 2 Shibata S, Okuyama T. Chemistry and Pharmacology of Qianhu. *Abstracts of Chinese Medicines*, 1989, 3: 24
- 3 孔令义, 裴月湖, 李锐等. 凯林内酯类香豆素的研究进展. *天然产物研究与开发*, 1994, 6(1): 50

Study on Analysis of Pd-Ia in *Peucedanum Praeruptorum* and Pd-C-I in *Peucedanum Decursivum* by RP-HPLC

Kong Lingyi, Li Yi¹, Min Zhida

Department of Phytochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; Physico-chemical Analysis Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097

Abstract A new method for quantitative analysis of Pd-Ia in root of *Peucedanum praeruptorum* and Pd-C-I in root of *Peucedanum decursivum* by RP-HPLC was developed. The chromatographic system consists of ODS column and mobile phase of methanol-water(71:29 v/v), the flow rate was 0.4 ml/min, the column temperature was 28°C and the detection wavelength was 320 nm. The calibration curves showed good linearity over the range of 0.02~0.06 μg and 0.01~0.05 μg, $r=0.9990$ and 0.9996, and the average recoveries were 99.53% and 100.93%. The method is simple, sensitive and reproducible, and can be used for the quality control of Chinese medicine Qianhu.

Key words *Peucedanum praeruptorum*; *Peucedanum decursivum*; Pd-Ia; Pd-C-I; RP-HPLC; quantitative analysis