

HPLC 法筛查百花定喘制剂中前胡投料

王珺¹, 韩晓萍², 卜晨琛² (青海省药品检验检测院, 西宁 810000)

摘要 **目的:** 通过测定白花前胡甲素、白花前胡乙素和紫花前胡苷的含量, 建立筛查百花定喘制剂中投料为前胡还是紫花前胡的HPLC方法。**方法:** 采用Symmetry-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相: 甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 检测波长为321 nm, 流速为1.0 mL·min⁻¹。**结果:** 5批药材的标示名称与试验判断结果不一致; 47批百花定喘制剂的筛查结果表明, 未见紫花前胡投料, 前胡存在投料不足的情况。**结论:** 该方法专属性良好, 可作为定性筛查白花定喘制剂中投料前胡的方法。

关键词: 百花定喘制剂; 前胡; 紫花前胡; 白花前胡甲素; 白花前胡乙素; 紫花前胡苷; HPLC

中图分类号: R917; R284 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0281-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.009

Screening of *Peucedanum praeruptorum* in Baihua Dingchuan Preparations by HPLC

Wang Jun¹, Han Xiaoping², Bu Chenchen² (Qinghai Province Drug Inspection and Testing Institution, Xining 810000, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for the determination of Praeruptorin A, Praeruptorin B and Nodakenin, so as to screen *Peucedanum praeruptorum* or *Peucedanum decursivum* in Baihua Dingchuan Preparations. **Methods:** The separation was performed with Waters Symmetry-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. A gradient elution of methanol and 0.1% phosphoric acid solution were adopted as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 321 nm. **Results:** The 5 batches of medicinal materials were inconsistent with experimental result. In addition, *Peucedanum decursivum* was not found in 47 batches of Baihua Dingchuan Preparations, but *Peucedanum praeruptorum* was in shortage. **Conclusion:** The established method was specific, reliable and simple, which is adoptable for quality control of *Peucedanum praeruptorum* in Baihua Dingchuan Preparations.

Keywords: Baihua Dingchuan Preparations; *Peucedanum praeruptorum*; *Peucedanum decursivum*; Praeruptorin A; Praeruptorin B; Nodakenin; HPLC

百花定喘片/丸是由款冬花、陈皮、前胡、天花粉、桔梗、苦杏仁、薄荷、麻黄等药材经加工制成的中药复方制剂,具有疏风解热、止咳定喘的功效,方中前胡降气化痰、散风清热,是重要的组成药味^[1-2]。

《中国药典》2015年版规定:前胡为伞形科植物白花前胡*Peucedanum praeruptorum* Dunn的干燥根。紫花前胡为伞形科植物紫花前胡*Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim.的干燥根^[3]。

《中国药典》2010年版与2015年版一致^[4]。但在《中国药典》2000年版及之前,将白花前胡和紫花前胡统一作为前胡而用,无含量测定项^[5-8];《中国药典》2005年版未收载紫花前胡,仅白花前胡作为前胡载入药典^[9]。

文献分析表明,白花前胡以角型二氢吡喃香豆素类化合物为主,白花前胡香豆素类成分在防治心血管疾病方面有显著疗效,其中白花前胡甲素为主要的有效成分^[10-11];紫花前胡以线型二氢吡喃香豆素和线型呋喃香豆素类化合物为主,具有明显的抗血小板聚集作用^[12-13],其中紫花前胡苷为主要成分。这两味药中主要成分的药理作用有明显区别^[14]。

此外,由于紫花前胡价格低于前胡,并结合前胡在历版《中国药典》中收载情况的变化,因此,可能存在用紫花前胡代替前胡投料的情况。本研究就此情况展开实验,建立科学合理的方法,对收集的8批药材和3家企业共47批百花定喘制剂中前胡投料情况进行筛查。

文献资料表明:前胡的指标性成分为白花前胡甲素、白花前胡乙素;紫花前胡的指标性成分为紫花前胡苷。徐勤在《高效液相色谱法测定前胡属植物中紫花前胡苷的含量》一文中指出“白花前胡及其他品种前胡中紫花前胡苷含量甚微,紫花前胡苷不能作为评价前胡属的药用指标之一,但可以作为控制紫花前胡的标准”^[15]。根据前胡和紫花前胡化学成分的差异性,本研究建立了筛查处方中前胡与紫花前胡投料的方法,该方法简便、准确,能够定性筛查百花定喘制剂中前胡的投料情况。

1 仪器与试剂

Agilent 1260高效液相色谱仪(安捷伦公司,包括G1315D紫外检测器,LC open LAB工作站); KQ5200B超声波清洗器(昆山市超声仪器

有限公司); METTLER TOLEDO XS105DU电子天平(上海梅特勒有限公司); BSA224S-CW电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司), Waters Symmetry-C18色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 沃特斯公司)。

前胡对照药材(批号:120951-201205)、前胡(紫花前胡)对照药材(批号:121406-200401)[因《中国药典》2005年版把紫花前胡收载在前胡项下,故写作前胡(紫花前胡)],白花前胡甲素(批号:111711-200602)、白花前胡乙素(批号:111904-201203)、紫花前胡苷(批号:111821-201303,纯度:97.4%),均购于中国食品药品检定研究院。

百花定喘片(企业1,天津中新药业隆顺榕制药厂,批号:140401、10201、140301、141101、141201、150201、150205、150701;企业2,广东万方制药有限公司,批号:BJ36024、BJ36027、BJ36028、BK36030、CD36031、CD36032、CE36033、DD36035),百花定喘丸(企业3,陕西汉王药业,批号:001301、001404);另收集前胡5批(辽宁省药品检验检测院1批、天津中新隆顺榕药业1批、亳州康美中药城1批、青海八一路药材市场2批)、紫花前胡3批(山东菏泽市舜王城中药材市场1批,亳州康美中药城1批,青海八一路药材市场1批)。水为屈臣氏蒸馏水,甲醇为Merck公司生产(色谱纯),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry-C18柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~50 min, 35%→50%A; 50~70 min, 50%→70%A; 70~100 min, 70%→95%A);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温30℃;检测波长为321 nm;进样量:10 μL。理论板数按各对照品峰计算应不低于5000,分离度大于1.5。

2.2 溶液的制备

对照品溶液的配制:精密称取紫花前胡苷8.91 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得浓度为0.0868 mg·mL⁻¹的紫花前胡苷对照品溶液。精密称取白花前胡甲素5.08 mg,白花前胡乙素5.09 mg,分别置25 mL量瓶中,加甲醇

定容至刻度，摇匀，即得白花前胡甲素对照品溶液（ $0.2032 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）和白花前胡乙素对照品溶液（ $0.2036 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）。精密吸取上述配制好的紫花前胡苷对照品溶液5 mL、白花前胡甲素对照品溶液2 mL、白花前胡乙素对照品溶液5 mL，置25 mL量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，即得浓度分别为紫花前胡苷 0.0174 、白花前胡甲素 0.0163 、白花前胡乙素 $0.0407 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

对照药材溶液的配制：精密称取前胡对照药材、紫花前胡对照药材，各0.5 g，同供试品溶液的配制方法，制成对照药材溶液。

供试品溶液的配制：取百花定喘片粉末0.5 g或白花定喘丸2 g（1/4的口服量），精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定重量，超

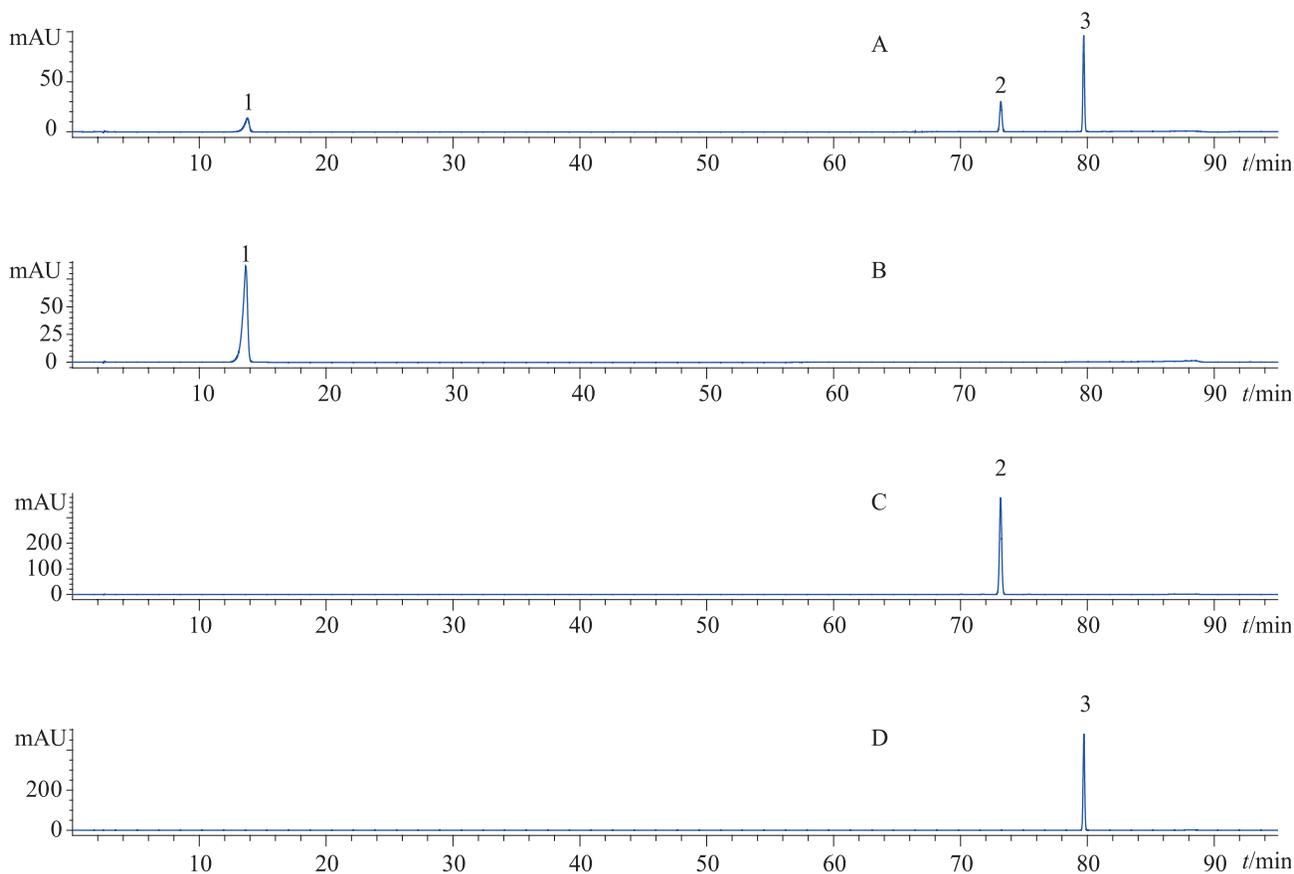
声处理（功率：100 W，频率：40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，即得。

阴性样品溶液的配制：按处方量并以相同工艺制成不含前胡的阴性样品，同供试品溶液的配制方法，制成阴性样品溶液。

阳性样品溶液的配制：按处方量并以相同工艺制成样品，同供试品溶液的配制方法制成样品溶液，加入适量的混合对照品溶液，混匀，滤过，即得。

2.3 方法专属性考察

取对照品溶液、混合对照品溶液、对照药材溶液、阴性样品溶液、供试品溶液、阳性样品，各 $10 \mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪，测定，得到专属性色谱图，如图1~4。



A. 混合对照品；B. 紫花前胡苷；C. 白花前胡甲素；D. 白花前胡乙素；
1. 紫花前胡苷；2. 白花前胡甲素；3. 白花前胡乙素。

图1 HPLC 色谱图

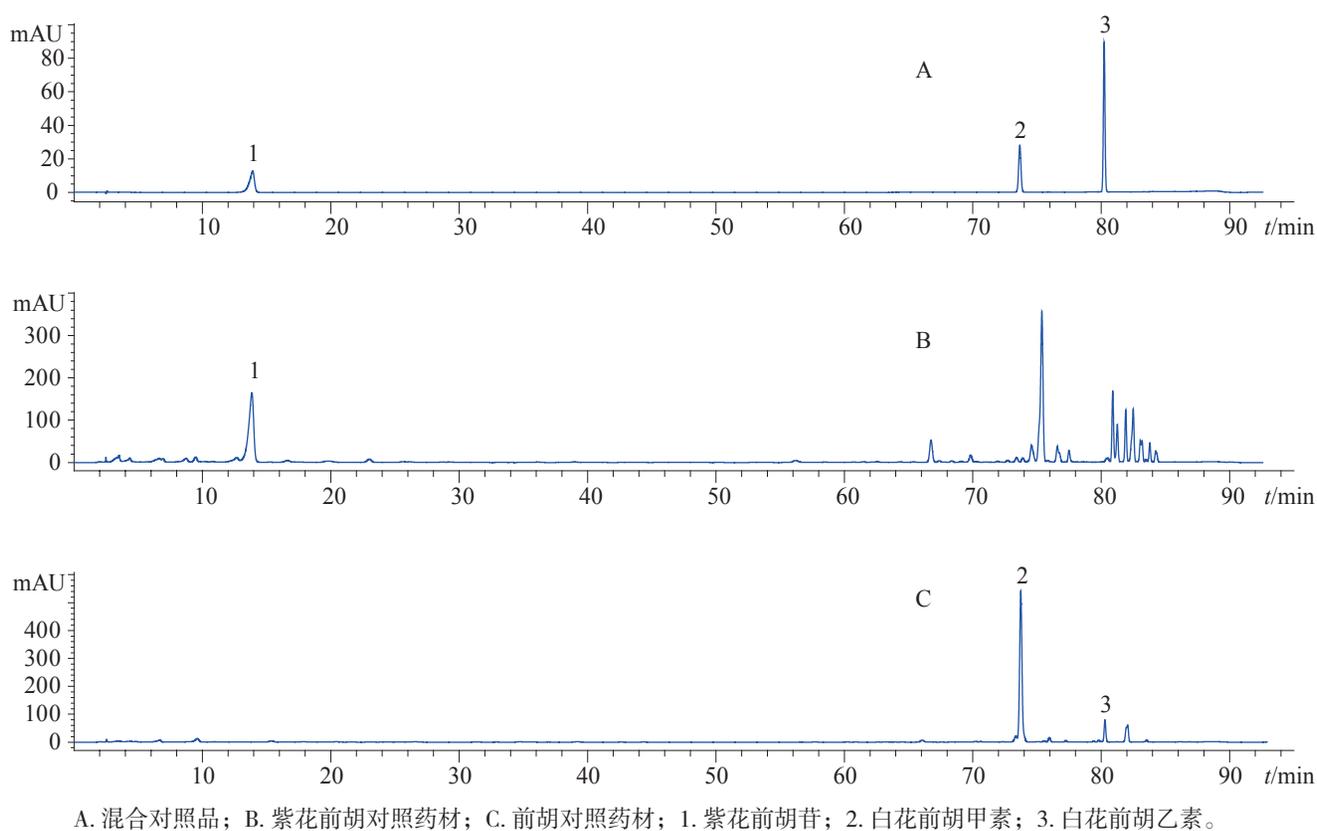


图2 HPLC 色谱图

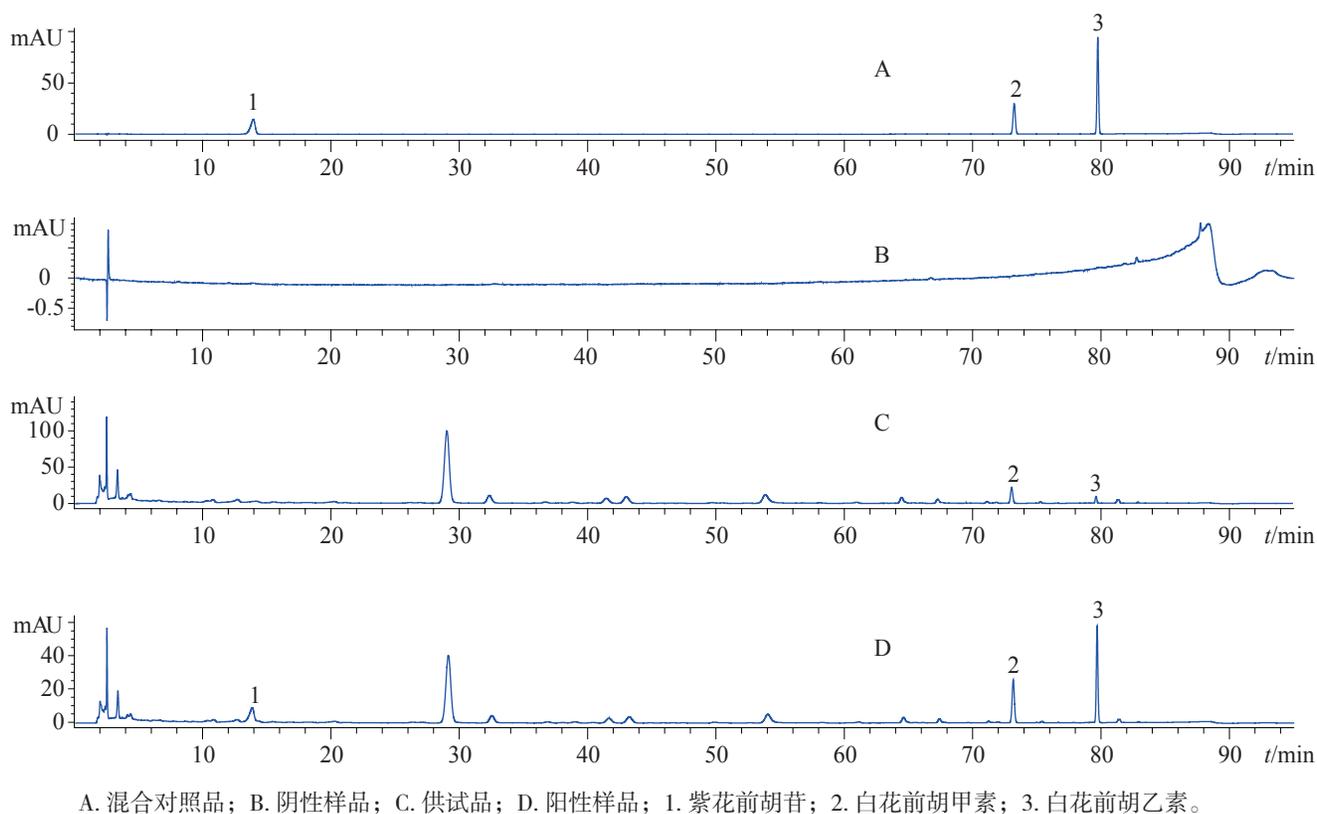
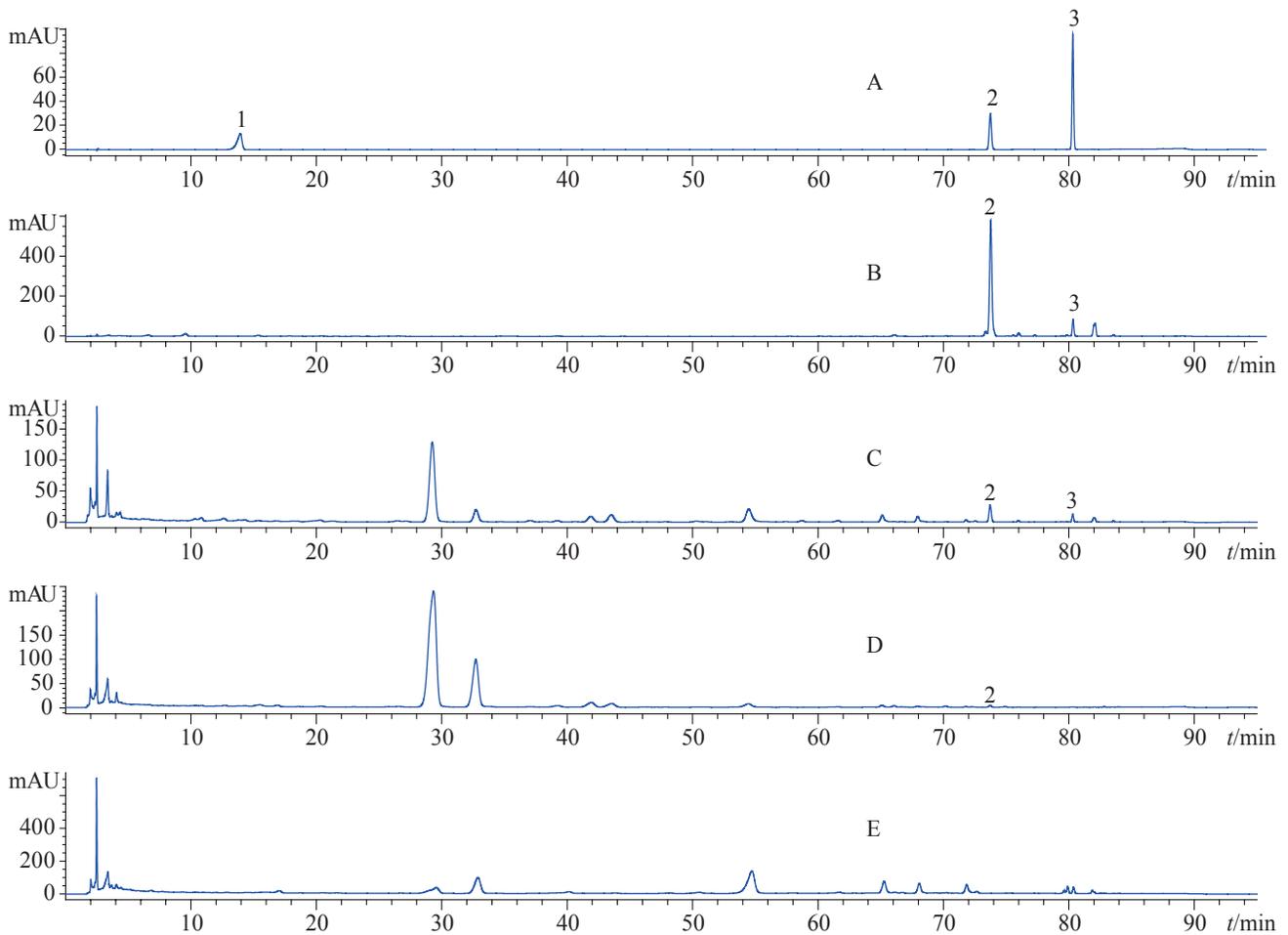


图3 HPLC 色谱图



A. 混合对照品；B. 前胡对照药材；C. 企业1供试品；D. 企业2供试品；E. 企业3供试品；
1. 紫花前胡苷；2. 白花前胡甲素；3. 白花前胡乙素。

图4 HPLC 色谱图

如图1, 在选定的色谱条件下, 混合对照品中3个目标物质峰分离度良好。

如图2, 通过对混合对照品、前胡对照药材、紫花前胡对照药材的验证, 表明该方法的区分性良好。前胡中在与白花前胡甲素、白花前胡乙素保留时间相同的位置能检出相应的色谱峰, 且白花前胡甲素的色谱峰面积大于白花前胡乙素, 未检出紫花前胡苷; 紫花前胡在与紫花前胡苷保留时间相同的位置检出相应的色谱峰, 未检出白花前胡甲素、白花前胡乙素。

如图3, 通过对混合对照品、阴性样品、百花定喘片及阳性样品4种溶液的验证, 表明在百花定喘片HPLC色谱图中, 与紫花前胡苷、白花前胡甲素、白花前胡乙素相应位置无假阳性干扰。

如图4, 不同企业、不同剂型的白花定喘制剂HPLC色谱图综合表明, 所建立的方法能对百花定喘制剂中前胡投料进行定性筛查。

2.4 提取溶剂考察

取前胡对照药材, 分别采用三氯甲烷和甲醇超声(功率: 100 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 测定结果显示, 2种溶剂提取所得溶液的色谱峰无较大差异, 但考虑甲醇比三氯甲烷毒性小, 更环保。所以选择提取溶剂为甲醇。

2.5 检测波长考察

采用紫外检测器, 对混合对照品溶液在200~400 nm波长范围进行扫描, 紫花前胡苷在334 nm有最大吸收, 白花前胡甲素、白花前胡乙素在321 nm有最大吸收。因白花前胡甲素和白花前胡

乙素为前胡目标成分,故检测波长定为321 nm。

2.6 流动相考察

试验中曾用甲醇-水梯度洗脱,但供试品色谱峰分离度小于1.5,最后确定甲醇-0.1%磷酸溶液梯度洗脱,供试品色谱峰中待测组分分离度良好。在确立的色谱峰条件下,方法重复性良好。

2.7 最低检测限测定

取混合对照品溶液,在上述色谱条件下,分别以不同体积进样,取峰高为噪音3倍($S/N=3$)时的进样浓度为最低检测限。在所建立的色谱条件下,紫花前胡苷的最低检测浓度为 $0.163 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白花前胡甲素的最低检测浓度为 $0.305 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白花前胡乙素的最低检测浓度为 $0.174 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 样品测定及结果分析

3.1 判定标准

供试品色谱中,若检出只有与紫花前胡苷色谱峰保留时间相同的色谱峰,则制剂中投料为紫花前胡;若检出与白花前胡甲素、白花前胡乙素色谱

峰保留时间一致的色谱峰,且白花前胡甲素的峰面积不小于白花前胡乙素,则投料为前胡;若既检出与紫花前胡苷色谱峰保留时间一致的色谱峰,又检出与白花前胡甲素、白花前胡乙素保留时间一致的色谱峰,则投料可能是非单一品种或近源品种。

吴文玲在《HPLC同时测定前胡中3种香豆素含量的含量》一文中“有一批正品前胡白花前胡甲素和白花前胡乙素含量相近,其余前胡的白花前胡甲素的含量都高于白花前胡乙素”^[6]。本试验过程中,对收集的正品前胡药材及中国食品药品检定研究院提供的多批前胡对照药材展开研究,均表明白花前胡甲素的含量高于白花前胡乙素。本文暂定前胡中检出白花前胡甲素和乙素峰面积的关系:白花前胡甲素的峰面积不小于白花前胡乙素。在今后工作中,将收集更多产地的前胡进行白花前胡甲素和乙素的具体比例关系的研究。

3.2 药材检测结果

按本研究建立的方法,对8批药材进行筛查,结果见表1。

表1 8批药材来源及研究判断结果

编号	供样单位 提供名称	供样单位	结果			峰面积关系	判断结果
			紫花 前胡 苷	白花 前胡 甲素	白花 前胡 乙素		
1	前胡	辽宁省药品检验检测院	-	+	+		
2	前胡	天津中新隆顺榕药业	-	+	+	白花前胡甲素>白花前胡乙素	前胡
3	前胡	亳州康美中药城	-	+	+		
4	前胡	青海八一路药材市场	+	+	+	白花前胡甲素>白花前胡乙素	紫花前胡与前胡混用
5	前胡	青海八一路药材市场	-	+	+	白花前胡甲素<白花前胡乙素	前胡属其他或混用
6	紫花前胡	亳州康美中药城	-	-	+	/	前胡属其他或混用
7	紫花前胡	山东菏泽市舜王城中药材市场	-	+	+	白花前胡甲素<白花前胡乙素	前胡属其他或混用
8	紫花前胡	青海八一路市场	-	+	+		前胡属其他或混用

注: +表示检出; -表示低于检测限或未检出。

续表 2

生产企业	批号	结果		
		紫花前胡苷	白花前胡甲素	白花前胡乙素
	150202	-	+	+
	150202	-	+	+
	150202	-	+	+
	150701	-	+	+
企业 2	BJ36024	-	+	-
	BJ36027	-	+	-
	BJ36028	-	+	-
	BK36030	-	+	-
	CD36031	-	+	-
	CD36031	-	+	-
	CD36032	-	+	-
	CD36032	-	+	-
	CE36033	-	+	-
	CE36033	-	+	-
	CE36033	-	+	-
	DD36035	-	+	-
	DD36036	-	+	-
企业 3	001311	-	-	-
	001404	-	-	-
	001404	-	-	-
	001404	-	-	-

由表2可知：1) 企业1的30批(8个有效批号)百花定喘片中，检出白花前胡甲素、白花前胡乙素，且白花前胡甲素的峰面积不小于白花前胡乙素，判断投料为前胡；2) 企业2的13批(8个有效批号)百花定喘片中，检出白花前胡甲素，而白花前胡乙素低于检测限或未检出；3) 企业3的4批(2个有效批号)百花定喘丸中，白花前胡甲素和白花前胡乙素均低于检测限或未检出。

结果表明：3个企业的百花定喘制剂中，未检出紫花前胡苷，说明投料中没有紫花前胡，但前胡相应色谱峰差异较大。其中，前胡有效成分低于检测限而未检出的企业需要进一步研究寻找原因。

4 讨论

前胡是止咳类处方常用的药味，由于历年药典记载不同和价格差异，其品种可能存在前胡属药

材混用现象，或存在地方习用品种替代问题。本研究主要对前胡、紫花前胡进行研究，通过判断是否存在有效成分色谱峰和峰面积比例关系，确定投料是否为前胡。还需要对前胡属其他药材和地方习用品种做进一步分析研究。

参考文献：

- [1] 卫生部药品标准：中药成方制剂第一册[S]. 1989：63.
- [2] YBZ02252003 国家食品药品监督管理局标准试行：百花定喘片[S]. 2003.
- [3] 中国药典：一部[S]. 2015：265.
- [4] 中国药典：一部[S]. 2010：248, 317-318.
- [5] 中国药典：一部[S]. 2000：217-218.
- [6] 中国药典：一部[S]. 1995：235.
- [7] 中国药典：一部[S]. 1990：237-238.

- [8] 中国药典：一部[S]. 1985：230.
- [9] 中国药典：一部[S]. 2005：187.
- [10] 代丽萍，李汉伟，董成名. HPLC法测定不同产地白花前胡中白花前胡甲素的含量[J]. 中国中医药，8（11）：258-259.
- [11] 刘晓阳. 白花前胡提取成分对心血管作用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2002，19（6）：462-464.
- [12] 孔令义，裴月湖，于荣敏，等. 中药前胡的化学和药理研究概况[J]. 国外医药：植物分册，1991，6（6）：243-246.
- [13] 张艺，贾敏如，孟宪丽，等. 中药紫花前胡抗血小板活化因子(PFA)作用的研究[J]. 成都中医药大学学报，1997，20（1）：39-40.
- [14] 周婵，罗建光，孔令义，等. HPLC法测定紫花前胡中紫花前胡苷的含量[J]. 药学与临床研究，2010，18（3）：253-255.
- [15] 徐勤，刘布鸣. 高效液相色谱法测定前胡属植物中紫花前胡苷的含量[J]. 中国中药杂志，2000，12（25）：731-732.
- [16] 吴文玲，陈佳佳，刘守金，等. HPLC同时测定前胡中3种香豆素成分的含量[J]. 中国中药杂志，2009，34（9）：1121-1123.
- [17] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 北京：科学出版社，1992：1-23.
- （收稿日期 2016年9月1日 编辑 王雅雯）