

前胡香豆素类成分 HPLC 指纹图谱研究

史行幸¹, 黄琴伟², 周建良³, 陈碧莲^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 3.杭州师范大学, 杭州 311121)

摘要: 目的 建立前胡香豆素类成分的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价其质量提供可靠方法。方法 采用 Ecosil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (68 : 32) 为流动相, 分析时间 50 min, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 323 nm; 采用 LC-MS 对前胡香豆素类成分进行解析, 并对特征峰进行归属; 运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件, 对 18 批前胡样品和 4 批混淆品进行相似度评价。结果 以白花前胡甲素和白花前胡乙素为参照物, 建立了以 8 个共有峰为指标成分的前胡药材指纹图谱, 通过 LC-MS 定性分析结合对照品比对, 推测 8 个共有峰为前胡香豆素 D、前胡香豆素 E、peucedanumarin II、白花前胡甲素、peucedanumarin I、白花前胡乙素、白花前胡素 E 及其同分异构体, 并且以相似度为 0.9 能很好地区分前胡正品和混淆品。结论 该方法简单、重复性良好, 可为前胡药材的质量评价提供有效鉴别方法。

关键词: 前胡; 香豆素类成分; 指纹图谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)07-0842-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.07.013

引用本文: 史行幸, 黄琴伟, 周建良, 等. 前胡香豆素类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 842-846.

HPLC Fingerprint of Coumarins of Peucedani Radix

SHI Xingxing¹, HUANG Qinwei², ZHOU Jianliang³, CHEN Bilian^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 3.Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of HPLC fingerprint analysis of coumarins for the quality control of Peucedani Radix. **METHODS** The HPLC fingerprint were obtained on an Ecosil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the isocratic elution solvent system composed of methanol and water(68 : 32). The analysis time was 50 min, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 40 °C, and the detection wavelength was set at 323 nm. LC-MS was used to analyze the composition of adulterants of Peucedani Radix, and to identified the characteristic peaks. Similarity of 18 batches of Peucedani Radix samples and 4 batches of adulterants were evaluated by chromatographic fingerprint similarity evaluation software. **RESULTS** The HPLC fingerprint of Peucedani Radix was established based on the reference of praeruptorin A and praeruptorin B. The detected peaks preliminarily belonged to qianhu coumarin D, qianhu coumarin E, peucedanumarin II, praeruptorin A, peucedanumarin I, praeruptorin B, praeruptorin E and its isomer by qualitative analysis of LC-MS combined with reference comparison. In addition, the similarity was 0.9, which could distinguish Peucedani Radix and its confusion well. **CONCLUSION** The method is simple and reproducible, and can provide an effective identification method for the quality evaluation of Peucedani Radix.

KEYWORDS: Peucedani Radix; coumarins; fingerprint

前胡为伞形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 的干燥根, 主要分布于浙江、江西、安徽、江苏等省, 是一味已有 1 500 多年药用历史的常用中药, 在南北朝陶弘景所著《名医别录》^[1]中始有记载, 此后在历代本草和中国药典^[2]中均有收录。前胡味苦、辛, 性微寒, 具有降气化痰, 宣风散热的功效^[3]。现代研究表明, 前胡具有止咳祛痰等作用^[4], 香豆素为前胡的主要活性成分^[5]。但目前市场上前胡混淆品滥用现象较为严

重, 药材品质参差不齐, 现对前胡的质量分析多为白花前胡甲素和白花前胡乙素的含量测定, 这在一定程度上能控制前胡的质量, 但不甚全面; 近年来也有前胡指纹图谱的文献报道, 但均未对指纹图谱中色谱峰进行成分确认, 前胡与其混淆品的差异性成分也未见报道。本研究拟通过建立前胡药材的指纹图谱, 并进一步应用高分辨质谱对其主要特征峰进行定性分析, 并比较前胡与其常见混淆品的成分差异, 为全面评价前胡药材的

基金项目: 国家药典委员会药品标准提高项目(483); 浙江省基础公益研究计划项目(LGF20H280001); 国家药监局首批重点实验室项目(国药监科外函[2019]82 号)

作者简介: 史行幸, 女, 硕士生 Tel: (0571)87180345 E-mail: 1158640673@qq.com *通信作者: 陈碧莲, 女, 主任中药师 Tel: (0571)86459402 E-mail: zsyonly@hotmail.com

质量提供实验依据。

1 仪器与试剂

LC-20ADXR 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司, 包括四元低压梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器和 Lab solution 色谱工作站); LTQ/Orbitrap 液质联用仪(美国赛默飞世尔科技公司); XPE-205 型分析天平(Mettler Toledo); Milli-Q Advantage A 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

白花前胡甲素对照品(批号: 11711-200501; 纯度: 98.8%)、白花前胡乙素对照品(批号: 11711-201804; 纯度: 98.9%)均购于中国食品药品检定研究院。分析样品所用甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司); 制备样品所用甲醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

22 批样品的详细信息见表 1, 经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任药师鉴定, 其中 18 批为伞形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 的干燥根, 4 批混淆品分别为竹节前胡 *Peucedanum dielsianum* Fedde ex Wolff、信前胡 *Xin-zhou Peucedanum praeruptorum*、少毛北前胡 *Peucedanum harry-smithii* var *subglabrum* 和紫花前胡 *Angelica decursiva* (Miq.) Franch. et Sav 的干燥根。

表 1 样品收集信息表

Tab. 1 Summary of the tested samples

编号	名称	产地
QH-01	白花前胡	安徽宁国
QH-02	白花前胡	浙江淳安
QH-03	白花前胡	安徽宁国
QH-04	白花前胡	安徽宁国
QH-05	白花前胡	安徽宁国
QH-06	白花前胡	安徽古泉
QH-07	白花前胡	安徽宁国
QH-08	白花前胡	安徽皖南
QH-09	白花前胡	安徽皖南
QH-10	白花前胡	浙江淳安
QH-11	白花前胡	浙江磐安
QH-12	白花前胡	浙江淳安
QH-13	白花前胡	安徽黄山
QH-14	白花前胡	安徽宁国
QH-15	白花前胡	重庆涪陵
QH-16	白花前胡	重庆武隆
QH-17	白花前胡	重庆奉节
QH-18	白花前胡	重庆石柱
X-01	竹节前胡	云南
X-02	信前胡	贵州
X-03	少毛北前胡	甘肃
X-04	紫花前胡	江苏全椒县

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Ecosil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(68:32)等度洗脱; 洗脱时间: 50 min; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 检测波长: 323 nm; 进样量: 5 μL。

2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺); 离子源温度 350 °C; 毛细管温度 325 °C; 鞘气流速 50 L·min⁻¹; 离子源电压 3.5 kV。正离子模式为全程检测模式, 一级质谱离子扫描范围: *m/z* 100~1 000; 二级质谱碰撞能量 70 V。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取白花前胡甲素和白花前胡乙素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含 50 μg 的混合溶液, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入三氯甲烷 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz)10 min, 放冷, 再称定质量, 用三氯甲烷补足减失的质量, 摇匀, 滤过; 精密量取续滤液 5 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 仪器精密度试验 取样品(编号: QH-07)1 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)对其进行相似度评价, 采用全谱峰匹配, 以夹角余弦法计算相似度, 相似度均为 1.000, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取样品(编号: QH-07)6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)对其相似度进行评价, 采用全谱峰匹配, 以夹角余弦法计算相似度, 相似度均为 1.000, 表明该方法具有较好的重复性。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液(编号: QH-07)1 份, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0, 4, 14, 20, 28 h 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相

似度评价系统(2012 年版)对其相似度进行评价,以夹角余弦法计算相似度,相似度均为 1.000,结果表明供试品溶液在 28 h 内稳定。

2.5 参照物的选择和成分分析

根据 18 批前胡样品 HPLC 图,确定 8 个峰为共有指纹峰,其中 4 号峰和 6 号峰经对照品比对确证为白花前胡甲素和白花前胡乙素。白花前胡甲素峰稳定,重复性好,特征性较强,保留时间居中,故选择其作为参照峰。在此基础上结合 LC-MS 技术,按“2.2”项下质谱条件对前胡指纹图谱中未确认成分进行解析,结果见图 1。

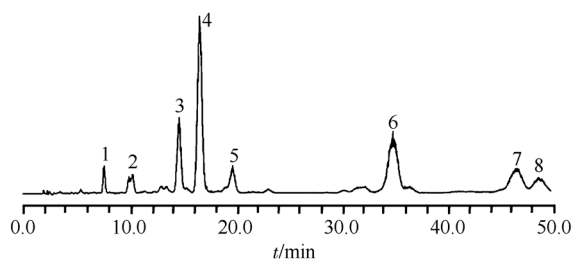


图 1 前胡一级质谱总离子流图

4-白花前胡甲素; 6-白花前胡乙素; 1~3, 5, 7~8-未确认共有峰。

Fig. 1 Total ion chromatogram of Peucedani Radix

4-praeurptorin A; 6-praeurptorin B; 1~3, 5, 7~8-unconfirmed common peaks.

2.6 样品相似度测定和对照指纹图谱的建立

对收集到的 18 批前胡样品按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,记录色谱图,并以 18 批样品的色谱图为基础,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版)建立共有模式,采用全谱峰匹配,计算 18 批样品与共有模式间的相似度,结果见图 2 和表 2。

2.7 特征峰指认

采用 LC-MS 技术,根据对照品保留时间、紫外吸收光谱图以及 LTQ/Orbitrap 提供的精确分子量和二级碎片信息,再结合相关文献数据对“2.5”项下指纹图谱的共有峰进行结构推断,结果见图 3 和表 3。

色谱峰 1: 分子式为 $C_{18}H_{18}O_7$, m/z 369.088 3, 309.028 0, 287.093 9, 245.083 0, 227.072 3, 以上数据与文献[6]报道的前胡香豆素 D 数据基本一致。

色谱峰 2: 分子式为 $C_{19}H_{18}O_6$, m/z 342.340 5, 270.978 4, 245.083 3, 227.072 6, 190.073 1, 以上数据与文献[6]报道的前胡香豆素 E 数据基本一致。

色谱峰 3: 分子式为 $C_{21}H_{22}O_7$, m/z 432.205 2,

409.128 6, 327.125 5, 287.093 8, 245.082 9, 227.072 3, 以上数据与文献[7]中 peucedanumarin II 的数据基本一致。

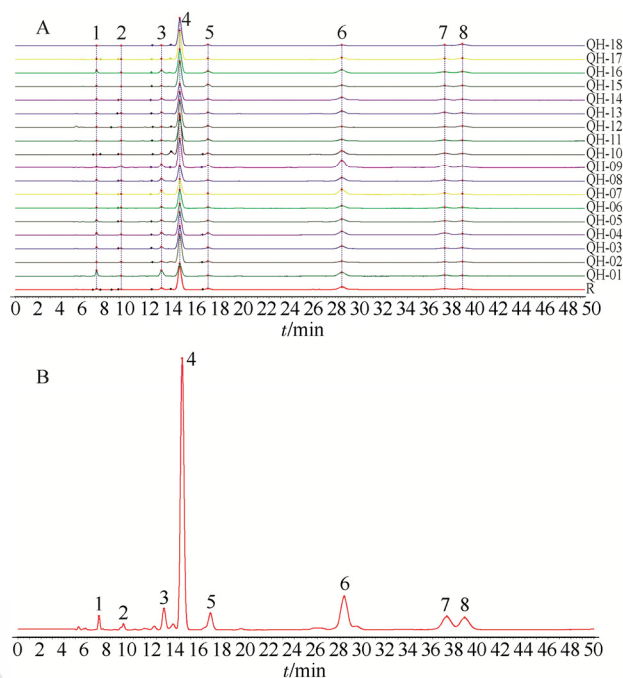


图 2 18 批前胡样品图谱(A)和对照指纹图谱(B)

4-白花前胡甲素; 6-白花前胡乙素; 1~3, 5, 7~8-未确认共有峰。

Fig. 2 HPLC chromatograms of 18 batches samples of Peucedani Radix (A) and reference fingerprint(B)

4-praeurptorin A; 6-praeurptorin B; 1~3, 5, 7~8-unconfirmed common peak.

表 2 18 批前胡样品相似度

Tab. 2 Determination results of similarity of 18 batches of samples of Peucedani Radix

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
QH-01	0.909	QH-07	0.943	QH-13	0.999
QH-02	0.990	QH-08	0.990	QH-14	0.995
QH-03	0.999	QH-09	0.971	QH-15	0.991
QH-04	0.995	QH-10	0.995	QH-16	0.999
QH-05	0.999	QH-11	0.993	QH-17	0.993
QH-06	0.999	QH-12	0.982	QH-18	0.983

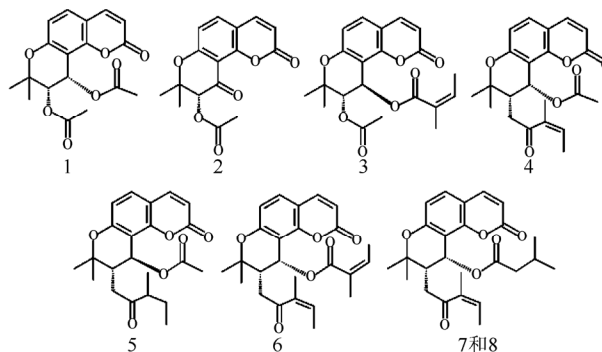


图 3 前胡香豆素类成分的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of coumarins of Peucedani Radix

表 3 前胡与常见混淆品主要特征峰的 LC-MS 鉴定结果

Tab. 3 Characteristic peaks identification by LC-MS in Peucedani Radix and its adulterants

峰号	t_R/min	白花前胡	竹节前胡	信前胡	少毛北前胡	紫花前胡	测得分子量	准分子离子	分子式	化合物名称
1	7.95	+	-	-	-	-	346.105 3	$369[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$	前胡香豆素D ^[6]
2	10.59	+	-	+	+	-	342.110 3	$365[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$	前胡香豆素E ^[6]
3	15.00	+	+	+	+	+	386.136 6	$409[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$	peucedanumarin II ^[7]
4	16.88	+	-	-	-	-	386.136 6	$409[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$	白花前胡甲素*
5	20.02	+	-	-	-	-	388.152 2	$411[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$	peucedanumarin I ^[7]
6	35.12	+	+	+	+	+	426.167 9	$449[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$	白花前胡乙素*
7	46.80	+	-	-	+	-	428.183 5	$451[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$	白花前胡素E或其同分异构体 ^[7]
8	48.80	+	-	-	-	-	428.183 5	$451[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$	白花前胡素E或其同分异构体 ^[7]
9	19.52	-	+	-	-	-	314.243 7	未知	未知	未知
10	7.16	-	-	+	-	-	344.126 0	$367[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$	前胡香豆素A ^[8]
11	2.25	-	-	-	-	+	246.215 5	$247[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_5$	异茴芹内酯 ^[9]

注: *经对照品比对鉴定; +检出; -未检出。

Note: *identified by standards; +identified; -not identified.

色谱峰 4: 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$, m/z 425.100 9, 409.125 8, 327.123 0, 245.079 9, 227.070 3, 此峰与白花前胡甲素对照品的保留时间一致, 且与文献[7]中白花前胡甲素的数据基本一致, 所以确定此峰为白花前胡甲素。

色谱峰 5: 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$, m/z 411.144 6, 329.141 4, 245.083 1, 227.072 4, 以上数据与文献[7]中 peucedanumarin I 的数据基本一致。

色谱峰 6: 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$, m/z 472.237 3, 465.132 0, 449.240 6, 327.126 3, 227.072 6, 此峰与白花前胡乙素对照品的保留时间一致, 且与文献[7]中白花前胡乙素的数据基本一致, 所以确定此峰为白花前胡乙素。

色谱峰 7: 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$, m/z 474.252 4, 467.150 1, 451.487 3, 327.125 6, 245.082 9, 227.072 3, 以上数据与文献[7]报道的白花前胡素 E 的数据基本一致。

色谱峰 8: 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$, 主要碎片离子信息与色谱峰 7 一致, 推测为白花前胡素 E 的同分异构体, 其结构有待进一步确证。

2.8 混淆品鉴别与相似度评价

运用建立的指纹图谱方法和 LC-MS 技术对 4 批混淆品进行分析和成分解析, 结果见图 4, 计算 4 批混淆品与对照指纹图谱的相似度, 编号 X-01, X-02, X-03, X-04 的相似度分别为 0.081, 0.051, 0.087, 0.230。

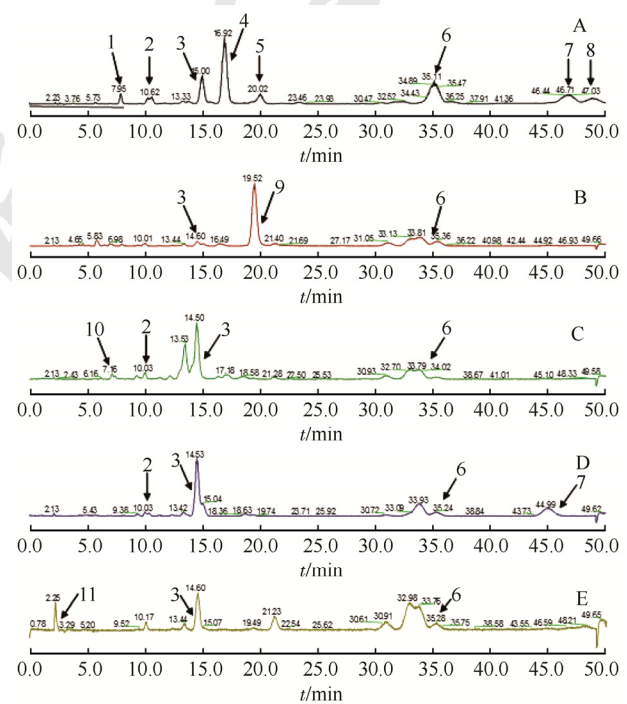


图 4 前胡及其混淆品的 LC-MS 图

A-白花前胡; B-竹节前胡; C-信前胡; D-少毛北前胡; E-紫花前胡; 1-前胡香豆素 D; 2-前胡香豆素 E; 3-peucedanumarin II; 4-白花前胡甲素; 5-peucedanumarin I; 6-白花前胡乙素; 7-8-白花前胡素 E 或其同分异构体; 9-未知; 10-前胡香豆素 A; 11-异茴芹内酯。

Fig. 4 LC-MS profiles of Peucedani Radix and its adulterants A-Peucedani Radix; B-Peucedanum dielsianum Fedde ex Wolff; C-Xin-zhou Peucedanum praeruptorum; D-Peucedanum harry-smithii var subglabrum; E-Angelica decursiva (Miq.) Franch. et Sav; 1-qianhu coumarin D; 2-qianhu coumarin E; 3-peucedanumarin II; 4-praeruptorin A; 5-peucedanumarin I; 6-praeruptorin B; 7-8-praeruptorin E or its isomers; 9-unknown; 10-qianhu coumarin A; 11-isopimpinellin.

3 讨论

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液以及甲醇-0.1%甲酸溶液 4 种不同的流动相系统,并且考察了甲醇-水的不同比例 75:25, 68:32 以及 65:35,发现甲醇-水(68:32)作为流动相基线最平稳、色谱分离较好,并能在色谱图中全面反映前胡香豆素成分;以白花前胡甲素和白花前胡乙素为指标,考察了三氯甲烷和甲醇 2 种不同的提取溶剂,并进一步比较了浸泡、超声和回流 3 种不同的提取方法,结果发现,三氯甲烷超声提取白花前胡甲素和白花前胡乙素含量均高于甲醇超声、回流和浸泡提取,由于香豆素类成分脂溶性较强,采用三氯甲烷超声提取更加完全,因此,采用三氯甲烷超声提取;考察了 4 根不同品牌的色谱柱,Shimadzu C₁₈柱、Agilent C₁₈柱和 Capcell PAK C₁₈柱都无法将峰 7、峰 8 分开,而 Ecosil C₁₈柱能很好地将 8 个峰分开,特征峰峰形和分离度均较好,故选用 Ecosil C₁₈柱。采用 PDA 检测器对前胡进行紫外扫描,比较了 7 个不同的检测波长 210, 230, 250, 280, 300, 323, 350 nm,发现在 323 nm 波长下干扰最小,得到的特征峰信息最多,故选择 323 nm 作为检测波长。

采用 LC-MS 技术对指纹图谱共有峰进行成分解析,除了中国药典记载的白花前胡甲素和白花前胡乙素外,另鉴定了 6 个成分,分别为前胡香豆素 D、前胡香豆素 E、peucedanumarin II、peucedanumarin I、白花前胡素 E 及其同分异构体,为指纹图谱的建立提供较充分的研究基础。

以 18 批前胡样品的色谱图为基础,生成了对照指纹图谱,正品相似度为 0.909~0.999,4 批混淆品竹节前胡、信前胡、少毛北前胡和紫花前胡相似度分别为 0.081, 0.051, 0.087, 0.230,拟定相似度阈值为 0.90,能很好区分前胡正品和混淆品。

综上所述,所建立的指纹图谱能有效地将前胡正品与混淆品区分,能较好地整体上评价其质量,为更好地保证药材质量提供了一定的研究基础。

REFERENCES

- [1] 梁·陶弘景. 名医别录[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986: 12
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 265.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 1418.
- [4] 徐广侠. 研究分析白花前胡的有效成分及其在临床上的药理学应用[J]. 中外健康文摘, 2012, 9(47): 415-416.
- [5] SHIBATA S, OKUYAMA T. Chemistry and pharmacology of Qianhu [J]. Abstr Chin Med(中国医学文摘), 1989, 3(2): 214-230.
- [6] 孔令义, 李铤, 裴月湖, 等. 白花前胡中前胡香豆素 D 和前胡香豆素 E 的分离和鉴定[J]. 药学学报, 1994, 29(1): 49-54.
- [7] ZHU G Y, CHEN G Y, LI Q Y, et al. HPLC/MS/MS method for chemical profiling of Radix Peucedani (Baihua Qianhu) [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2004, 2(5): 304-308.
- [8] KONG L Y, PEI Y H, LI X, et al. Isolation and structure elucidation of qianhucoumarin A [J]. Acta Pharm Sin(药理学报), 1993, 28(6): 432-436.
- [9] YANG J S, XIE F Z, LIU Q H, et al. Studies on coumarins of *Saussurea involucre* Kar. et Kir [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2006, 41(23): 1774-1776.

收稿日期: 2019-05-05

(本文责编: 蔡珊珊)