

HPLC 法测定儿感退热宁口服液中连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去 芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸

李季梅¹, 唐 钺², 高 森^{3*}

1. 天津市宁河区医院 药剂科, 天津 301500

2. 天津医科大学 药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

3. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定儿感退热宁口服液中连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸。方法 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 275 nm (0~21.0 min 检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷) 和 210 nm (21.0~55.0 min 检测去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素、青蒿酸); 柱温 25 °C; 体积流量 0.9 mL/min; 进样量: 10 μL。结果 连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸分别在 3.47~69.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、18.78~375.60 μg/mL ($r=0.999\ 2$)、6.64~132.80 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、2.57~51.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、4.86~97.20 μg/mL ($r=0.999\ 3$)、4.23~84.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.79~15.80 μg/mL ($r=0.999\ 1$)、2.16~43.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.76%、100.12%、99.34%、97.57%、98.29%、99.25%、96.87%、98.02%, RSD 值分别为 1.53%、0.89%、0.91%、1.38%、1.02%、0.83%、1.26%、1.15%。结论 所建立的方法结果准确, 可用于儿感退热宁口服液中多成分的质量控制研究。

关键词: 儿感退热宁口服液; 连翘酯苷 B; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 去芹糖桔梗皂苷 E; 桔梗皂苷 E; 桔梗皂苷 D₃; 青蒿乙素; 青蒿酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)06-1080-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.06.005

Determination of sythoside B, forsythoside A, forsythin, deapi-platycoside E, platycoside E, platycodin D₃, arteannuin B, and artemisinic acid in Ergan Tuirening Oral Liquid by HPLC

LI Ji-mei¹, TANG Cheng², GAO Sen³

1. Department of Pharmacy, TianJin Ninghe Hospital, Tianjin 301500, China

2. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for determination of sythoside B, forsythoside A, forsythin, deapi-platycoside E, platycoside E, platycodin D₃, arteannuin B, and artemisinic acid in Ergan Tuirening Oral Liquid. **Methods** The separation was performed on an Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid solution for gradient elution. The detection wavelength were set at 275 nm for forsythoside B, forsythoside A, and forsythin, and 210 nm for deapi-platycoside E, platycoside E, platycodin D₃, arteannuin B, and artemisinic acid. The column temperature was set at 25 °C, and the flow rate was 0.9 mL/min with injection of 10 μL. **Results** Forsythoside B, forsythoside A, forsythin, deapi-platycoside E, platycoside E, platycodin D₃, arteannuin B, and artemisinic acid showed good linear relationships in the ranges of 3.47 — 69.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 18.78 — 375.60 μg/mL ($r=0.999\ 2$), 6.64 — 132.80 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 2.57 — 51.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 4.86 — 97.20 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 4.23 — 84.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.79 — 15.80 μg/mL ($r=0.999\ 1$),

收稿日期: 2020-03-04

作者简介: 李季梅 (1975—), 女, 副主任药师, 主要从事药物质量控制、药物评价、临床药学等医院药学研究工作。

*通信作者 高 森 (1980—), 男, 副主任药师, 主要从事中西药质量控制、药物评价等医院药学研究工作。E-mail: gaosenyjk@163.com

2.16 — 43.20 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$). Their average recoveries (RSDs) were 98.76% (1.53%), 100.12% (0.89%), 99.34% (0.91%), 97.57% (1.38%), 98.29% (1.02%), 99.25% (0.83%), 96.87% (1.26%), and 98.02% (1.15%), respectively. **Conclusion** The HPLC method is accurate which can be used for the quality control of Ergan Tuirining Oral Liquid.

Key words: Ergan Tuirining Oral Liquid; sythoside B; forsythoside A; forsythin; deapi-platycoside E; platycoside E; platycodin D3; arteannuin B; artemisinic acid; HPLC

儿感退热宁口服液由连翘、桔梗、青蒿、板蓝根、菊花、苦杏仁、薄荷和甘草 8 味中药组方而成, 主要用于小儿外感风热、内郁化火、发热头痛、咳嗽、咽喉肿痛等疾病的治疗^[1]。现代研究表明, 儿感退热宁口服液对小儿急性上呼吸道感染退热稳定, 能明显改善咳嗽、气急、咽部充血、肺部体征等主要临床症状^[2-3]。儿感退热宁口服液现行质量标准收载于《中国药典》2015 年版一部^[4], 标准仅对该制剂使药甘草所含甘草酸进行了定量控制, 对于多成分、多靶点和整体作用的中成药复方制剂, 多指标成分控制才能更好地确保产品质量和临床疗效的稳定性。本研究采用 HPLC 梯度洗脱法对儿感退热宁口服液中连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、去芹糖桔梗皂苷 E、连翘苷、桔梗皂苷 E、青蒿乙素、桔梗皂苷 D₃ 和青蒿酸进行同时测定, 为全面科学评价儿感退热宁口服液的整体质量提供支持。

1 仪器与材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); XS105DU 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

连翘酯苷 B (批号 111811-201603, 质量分数 96.6%)、连翘酯苷 A (批号 111810-201707, 质量分数 97.2%)、连翘苷 (批号: 110821-201816, 质量分数 95.1%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 去芹糖桔梗皂苷 E (批号 CFS201901, 质量分数 98.0%)、桔梗皂苷 D₃ (批号: CFS201803, 质量分数 98.0%) 对照品均购自武汉天植生物技术有限公司; 桔梗皂苷 E (批号 18030721, 质量分数 98.5%)、青蒿乙素 (批号: 18031624, 质量分数 99.1%)、青蒿酸 (批号 18031623, 质量分数 99.7%) 对照品均购自上海同田生物技术股份有限公司; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

儿感退热宁口服液购自成都泰合健康科技集团股份有限公司华神制药厂, 规格 10 mL/支, 批号 190101、190102、190901。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去

芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸对照品各适量, 用甲醇制成含连翘酯苷 B 0.694 mg/mL、连翘酯苷 A 3.756 mg/mL、连翘苷 1.328 mg/mL、去芹糖桔梗皂苷 E 0.514 mg/mL、桔梗皂苷 E 0.972 mg/mL、桔梗皂苷 D₃ 0.846 mg/mL、青蒿乙素 0.158 mg/mL、青蒿酸 0.432 mg/mL 的混合对照品贮备液; 精密移取混合对照品贮备液 2.5 mL, 用甲醇定容至 50 mL, 制成含连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸 34.7、187.8、66.4、25.7、48.6、42.3、7.9、21.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取儿感退热宁口服液样品适量, 精密吸取 2.0 mL, 用甲醇定容至 25 mL, 滤过, 即得。按《中国药典》2015 年版一部儿感退热宁口服液质量标准项下的工艺处方, 分别制备缺连翘、桔梗、青蒿的阴性样品, 再按上述方法制成阴性样品溶液。

2.3 色谱条件

Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~9.0 min, 20.0%乙腈; 9.0~21.0 min, 20.0%~25.0%乙腈; 21.0~37.0 min, 25.0%~39.0%乙腈; 37.0~48.0 min, 39.0%~55.0%乙腈; 48.0~55.0 min, 55.0%~20.0%乙腈; 检测波长: 275 nm (0~21.0 min 检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷)^[4-5] 和 210 nm (21.0~55.0 min 检测去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素、青蒿酸)^[6-8]; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.9 mL/min; 进样量: 10 μL 。

2.4 专属性试验

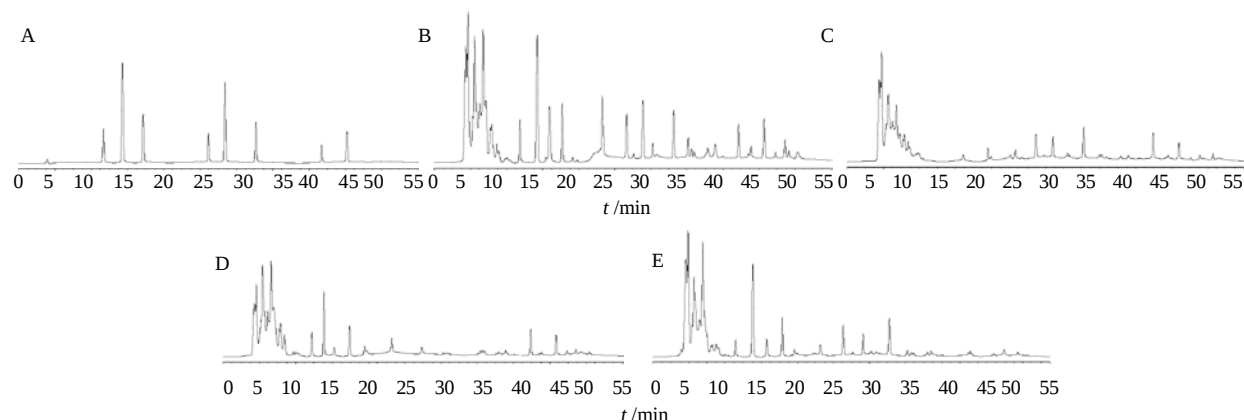
精密吸取各溶液依法进样检测, 结果供试品色谱图中主成分连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的色谱峰峰形对称, 理论塔板数按各成分色谱峰计均 $\geq 3\ 500$, 主成分峰与相邻色谱峰均能有效分离, 分离度均 > 1.5 。缺连翘阴性样品色谱图相应保留时间处未见连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷色谱峰, 缺桔梗阴性样品色谱图相应保留时

间处未见去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃ 色谱峰, 缺青蒿阴性样品色谱图相应保留时间处未见青蒿乙素、青蒿酸色谱峰, 表明阴性样品对儿感退热宁口服液中 8 种成分的测定无干扰, 色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、

1.0、1.5、2.0 mL, 分别用甲醇定容至 20 mL, 制成 6 个系列质量浓度的混合对照品溶液, 依法进样测定连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得 8 种成分回归方程及线性范围, 见表 1。



1-连翘酯苷 B 2-连翘酯苷 A 3-连翘苷 4-去芹糖桔梗皂苷 E 5-桔梗皂苷 E 6-桔梗皂苷 D₃ 7-青蒿乙素 8-青蒿酸
1-forsythoside B 2-forsythoside A 3-forsythidin 4-deapi-platycoside E 5-platycoside E 6-platycodin D₃ 7-artemisinin B 8-artemisinic acid

图 1 混合对照品 (A)、儿感退热宁口服液 (B)、缺连翘阴性样品 (C)、缺桔梗阴性样品 (D) 和缺青蒿阴性样品 (E) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Ergan Tuirening Oral Liquid (B), negative sample without *Forsythiae Fructus* (C), negative sample without *Platycodonis Radix* (D) and negative sample without *Artemisiae Annuae Herba* (E)

表 1 8 种成分线性关系考察

Table 1 Linear relationship evaluation results of eight components

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
连翘酯苷 B	$Y=8.0567 \times 10^5 X + 1089.1$	3.47~69.40	0.9995
连翘酯苷 A	$Y=1.1513 \times 10^6 X - 475.3$	18.78~375.60	0.9992
连翘苷	$Y=8.8658 \times 10^5 X + 1130.7$	6.64~132.80	0.9997
去芹糖桔梗皂苷 E	$Y=9.7348 \times 10^5 X - 843.6$	2.57~51.40	0.9995
桔梗皂苷 E	$Y=1.0326 \times 10^6 X + 727.8$	4.86~97.20	0.9993
桔梗皂苷 D ₃	$Y=7.8549 \times 10^5 X - 1028.3$	4.23~84.60	0.9998
青蒿乙素	$Y=1.2084 \times 10^6 X + 931.1$	0.79~15.80	0.9991
青蒿酸	$Y=8.3748 \times 10^5 X - 892.9$	2.16~43.20	0.9999

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的色谱峰峰面积, 计算得其 RSD 值分别为

0.98%、0.56%、0.71%、1.06%、0.87%、0.92%、1.33%、1.17%。

2.7 重复性试验

取批号 190101 儿感退热宁口服液样品适量, 平行制备供试品溶液 6 份, 依法进样测定连翘酯苷

B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的峰面积，计算得 8 种成分质量浓度的 RSD 值分别为 1.35%、0.97%、1.26%、0.72%、1.41%、1.57%、0.84%、1.63%。

2.8 稳定性试验

取儿感退热宁口服液（批号 190101）制备供试品溶液，于制备后 0、2、4、6、12、18 h 进样检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的峰面积，结果 8 种成分峰面积的 RSD 值分别为 1.03%、0.59%、0.66%、1.10%、0.79%、0.91%、1.29%、1.15%，表明儿感退热宁口服液供试品溶液 18 h 内稳定。

2.9 回收率试验

取批号 190101 儿感退热宁口服液 9 份，每份精密吸取 1.0 mL，置 25 mL 量瓶中，分别按已知含有量的 80%、100%、120% 水平精密加入混合对照

品溶液（连翘酯苷 B 0.372 mg/mL、连翘酯苷 A 2.148 mg/mL、连翘苷 0.724 mg/mL、去芹糖桔梗皂苷 E 0.296 mg/mL、桔梗皂苷 E 0.572 mg/mL、桔梗皂苷 D₃ 0.454 mg/mL、青蒿乙素 0.088 mg/mL、青蒿酸 0.246 mg/mL）0.8、1.0、1.2 mL 各 3 份，制备供试品溶液，进样检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的峰面积，计算回收率，结果 8 种成分的平均加样回收率分别为 98.76%、100.12%、99.34%、97.57%、98.29%、99.25%、96.87%、98.02%，RSD 值分别为 1.53%、0.89%、0.91%、1.38%、1.02%、0.83%、1.26%、1.15%。

2.10 样品测定

取 3 个批次的儿感退热宁口服液样品，每个批次平行制备 3 份供试品溶液，测定连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、青蒿乙素和青蒿酸的峰面积，采用外标法计算 8 种成分的质量浓度，结果见表 2。

表 2 儿感退热宁口服液中 8 种成分的测定结果（n=3）

Table 2 Determination results of eight constituents in Ergan Tuirning Oral Liquid (n=3)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)							
	连翘苷	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	去芹糖桔梗皂苷 E	桔梗皂苷 E	桔梗皂苷 D ₃	青蒿乙素	青蒿酸
190101	0.726	0.367	2.154	0.291	0.573	0.459	0.089	0.243
190102	0.659	0.315	1.941	0.333	0.627	0.416	0.078	0.225
190901	0.791	0.402	2.366	0.263	0.520	0.501	1.010	0.271

3 讨论

3.1 检测指标的选择

儿感退热宁口服液由青蒿、连翘、桔梗、板蓝根、菊花、苦杏仁、薄荷和甘草 8 味中药按照中医君、臣、佐、使理论组方而成，方中青蒿苦寒清虚热、解暑热，为其君药；连翘、板蓝根清热解毒、凉血利咽、消肿散结，菊花、薄荷疏散风热、疏肝利咽，苦杏仁止咳平喘，共为臣药；桔梗宣肺利咽、祛痰排脓，为佐药，甘草清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药，为使药，诸药共奏，以达解表清热、化痰止咳、解毒利咽之功效。青蒿为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* Linn. 的干燥地上部分，青蒿酸、青蒿乙素、青蒿素、东莨菪内酯等为其主要活性成分；连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实，连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷等为其特征性成分；桔梗为桔

梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 的干燥根，去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃ 等桔梗皂苷类为其主要药理活性成分。本实验依据以君药为首选，兼顾臣佐使药的确定原则，选取儿感退热宁口服液方中君药青蒿所含主要活性成分青蒿酸、青蒿乙素，臣药连翘所含特征性成分连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷，以及佐药桔梗所含主要药理活性成分去芹糖桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃ 为检测指标，以期更加全面地评价儿感退热宁口服液的整体质量。

3.2 色谱条件、流动相的选择

在选择流动相时，实验对乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液^[9]、乙腈 - 0.1% 冰醋酸水溶液^[5,7] 和乙腈 - 水^[5-6,8] 流动相系统进行考察对比，结果发现乙腈 - 水流动相体系检测时，基线漂移严重，同时检测时间过长；乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液流动相体系优于乙腈 -

0.1%冰醋酸水溶液流动相体系,所记录色谱图基线平稳,检测用时较短,待测成分色谱峰峰形较好,进而又对磷酸溶液的浓度(0.1%磷酸水溶液^[9]、0.2%磷酸水溶液^[4]、0.5%磷酸水溶液^[5])进行了优化,最终确定采用乙腈-0.2%磷酸水溶液^[5]为流动相进行梯度洗脱测定儿感退热宁口服液中8种成分的含量。

本实验采用HPLC梯度洗脱法同时测定儿感退热宁口服液中8种成分连翘酯苷B、连翘酯苷A、连翘苷、去芹糖桔梗皂苷E、桔梗皂苷E、桔梗皂苷D₃、青蒿乙素和青蒿酸,建立了儿感退热宁口服液多指标成分质量控制模式,该方法操作简便快速,结果准确,对儿感退热宁口服液质量标准提升和全面评价其产品质量提供了参考数据。

参考文献

[1] 中国药典[S].一部.2015:473-474.

[2] 徐若梅.儿感退热宁口服液治疗儿童急性上呼吸道感染疗效观察[J].四川医学,2006,27(10):1085-1086.

- [3] 杜旭红.儿感退热宁颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染100例疗效观察[J].实用中西医结合临床,2016,16(4):35-36.
- [4] 付云飞,李 清,毕开顺.RP-HPLC法同时测定不同产地连翘中的7种成分[J].中草药,2013,44(8):1043-1046.
- [5] 原江锋,邱智军,刘建利.河南和山西连翘叶中总木脂素、连翘酯苷A、连翘酯苷B和连翘苷的含量比较[J].天然产物研究与开发,2015,27(5):845-848,864.
- [6] 王 菲,路 丹,柳 杨,等.反相高效液相色谱法测定桔梗中3种三萜皂苷类化合物的含量[J].中南药学,2011,9(5):329-331.
- [7] 张 东,杨 岚,杨立新,等.HPLC-UV-ELSD法同时测定青蒿中青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量[J].药学报,2007,42(9):978-981.
- [8] 廖昌军,臧志和,邵 英,等.青蒿中有效成分的萃取及含量测定[J].医药导报,2016,35(1):71-74.
- [9] 蒋龄周,龚祖芳.一测多评法同时测定桔梗中3种桔梗皂苷的含量[J].中国现代应用药学,2017,34(5):729-732.