

## 菊黄口服液质量控制方法研究

李春雪<sup>1</sup>, 张晨<sup>1</sup>, 王长生<sup>2</sup>, 曾锐<sup>2</sup>, 瞿燕<sup>1\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 西南民族大学化学与环境工程保护工程学院, 四川 成都 610041

**摘要:**目的 对菊黄口服液的质量控制方法进行研究, 建立菊黄口服液定性、定量检测方法。方法 采用薄层色谱法(TLC)对菊黄口服液方中枸杞子 *Lycii Fructus* 和制黄精 *Polygonati Rhizoma* 进行定性分析, 苯酚-硫酸法测定菊黄口服液中总多糖的量; 并建立 RP-HPLC 法同时测定菊黄口服液中绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸 8 种化学成分的量, 采用 Odyssil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 325 nm。结果 TLC 鉴别方法能特征地鉴别枸杞子和制黄精, 斑点均清晰, 阴性无干扰; 总多糖定量测定回归方程  $A=0.0578C+0.0325$  ( $r=0.9991$ ,  $n=8$ ), 线性范围为 26.15~196.13 mg/mL, 平均加样回收率为 99.82%, 所测 6 批样品中总多糖的质量浓度在 157.74~166.49 mg/mL; RP-HPLC 定量测定时, 8 种化学成分在测定范围内表现出良好的线性关系 ( $r\geq 0.9998$ ), 平均回收率在 99.18%~101.06%, RSD 在 0.79%~1.91%; 6 个批次样品中 8 种成分的质量浓度分别为新绿原酸 102.9~142.6 μg/mL、绿原酸 488.6~563.8 μg/mL、隐绿原酸 58.9~71.6 μg/mL、咖啡酸 240.7~326.1 μg/mL、木犀草苷 228.6~302.7 μg/mL、3,4-二咖啡酰奎宁酸 398.0~485.4 μg/mL、3,5-二咖啡酰奎尼酸 184.1~203.1 μg/mL、4,5-二咖啡酰奎宁酸 476.2~561.8 μg/mL。结论 TLC 鉴别方法简单易行; 总多糖及 8 种化学成分定量测定的方法简单、准确、重现性好, 可用于菊黄口服液的质量控制。

**关键词:** 菊黄口服液; HPLC; 总多糖; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 木犀草苷; 3,4-二咖啡酰奎尼酸; 3,5-二咖啡酰奎尼酸; 4,5-二咖啡酰奎尼酸

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)12-1779-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.013

## Research on quality control method for Juhuang Oral Liquid

LI Chun-xue<sup>1</sup>, ZHANG Chen<sup>1</sup>, WANG Chang-sheng<sup>2</sup>, ZENG Rui<sup>2</sup>, QU Yan<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Institute of Chemical and Environmental Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To establish the quality control method for Juhuang Oral Liquid (JOL) based on the qualitative and quantitative analysis methods. **Methods** TLC was used to identify *Lycii Fructus* and *Polygonati Rhizoma* in JOL. Phenol-sulfuric acid method was used for the determination of total polysaccharide, HPLC was used to simultaneously determine the contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, galuteolin, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid. The Odyssil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution in gradient elution, at the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 325 nm. **Results** The identified characteristics of *Lycii Fructus* and *Polygonati Rhizoma* by TLC were distinct and the spots were clear, without interference and easy to recognize. When phenol-sulfuric acid method was used to determinate the total polysaccharide content, the regression equation was  $A=0.0578C+0.0325$  ( $r=0.9991$ ,  $n=8$ ). The linear with its absorbance in the range of 26.15—196.13 mg/mL, the average recoveries was 99.82%. The average content of the total polysaccharide in JOL from six batches is 157.74—166.49 mg/mL. When RP-HPLC was used to determine the eight chemical components, the compounds showed a good linearity ( $r\geq 0.9998$ ) in the determination range. The average recoveries were between 99.18%—101.06% with RSDs between 0.79%—1.91%. The average

收稿日期: 2015-01-31

基金项目: 国家“十二五”科技部支撑计划(2012BAI27B07); 四川省科技厅科技基础项目(2015JY0139)

作者简介: 李春雪, 硕士研究生。E-mail: lichunxuelcx@126.com

\*通信作者 瞿燕, 博士, 副教授, 从事中药制剂与炮制研究工作。Tel: (028)61800231 E-mail: quyan028@126.com

content from the six batches showed neochlorogenic acid 102.9—142.6  $\mu\text{g/mL}$ , chlorogenic acid 488.6—563.8  $\mu\text{g/mL}$ , cryptochlorogenic acid 58.9—71.6  $\mu\text{g/mL}$ , caffeic acid 240.7—326.1  $\mu\text{g/mL}$ , galuteolin 228.6—302.7  $\mu\text{g/mL}$ , 3,4-dicaffeoylquinic acid 398.0—485.4  $\mu\text{g/mL}$ , 3,5-dicaffeoylquinic acid 184.1—203.1  $\mu\text{g/mL}$ , and 4,5-dicaffeoylquinic acid 476.2—561.8  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** TLC identification method is simple. The determination method of total polysaccharide and chemical components is simple, accurate, and with a good repeatability. It can be used for the quality control of JOL.

**Key words:** Juhuang Oral Liquid; HPLC; total polysaccharide; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; galuteolin; 3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid

糖尿病性干眼症是由糖尿病性眼表病变演变而来,主要表现为眼疲劳、异物感、干涩感、烧灼感、眼胀感、眼痛感、畏光、眼红 8 大主要症状<sup>[1]</sup>。因此,深入开展预防和治疗干眼症的研究具有重大临床指导意义。菊黄口服液由菊花 *Chrysanthemi Flos*、制黄精 *Polygonati Rhizoma*、枸杞子 *Lycii Fructus*、北沙参 *Glehniae Radix* 4 味药材组成,为医院临床验方,具有清热祛风、养阴润目的功效,用于治疗糖尿病性干眼症,经长期临床使用效果良好。

方中 4 味中药均含有多糖,其中菊花作为君药可益肝明目,具有散风清热、平肝明目、清热解毒的功效,用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花、疮痈肿毒等症,而多糖是菊花水溶性成分中主要成分之一<sup>[2]</sup>,应用其配伍的中医经验方剂治疗干眼疗效显著<sup>[3]</sup>;黄精多糖为制黄精主要活性成分<sup>[4]</sup>,对糖尿病及其实验性干眼症有明显疗效<sup>[5]</sup>;枸杞多糖为枸杞子主要活性成分,对体外培养视网膜神经节细胞的保护作用<sup>[6]</sup>;北沙参作为扶正药,具有养阴润肺、祛痰止咳等功效,含有多糖类、香豆素类、磷脂等多种有效成分<sup>[7]</sup>。君药菊花中化学成分定量测定研究中<sup>[8]</sup>,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸 8 种有效成分同时测定的方法还未见报道。故本实验采用苯酚-硫酸法测定制剂中总多糖的量,建立 RP-HPLC 同时测定 8 种药效成分量的方法,并对本品中枸杞子和制黄精进行 TLC 鉴别,以期为菊黄口服液的质量评价提供科学依据,提高该产品的质量可控性。

## 1 仪器与材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Waters 2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司,包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、2996 型二极管阵列检测器和 Empower 色谱工作站;MSA225s 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司。

无水葡萄糖(批号 110833-200904)、绿原酸(批

号 110753-200413) 购于中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%;咖啡酸(批号 121128)、新绿原酸(批号 MUST-12113001)、3,4-二咖啡酰奎尼酸(批号 MUST-12041114)、3,5-二咖啡酰奎尼酸(批号 MUST-14011201)、隐绿原酸(批号 MUST-12113002)、4,5-二咖啡酰奎尼酸(批号 MUST-12081803) 购于成都曼思特生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;枸杞子(批号 121072-201410),黄精(制,批号 121553-201202) 均购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯(欧森巴克),水为乐百氏纯净水,其他试剂均为分析纯。菊黄口服液样品,批号 140601、140602、140603、140701、140702、140703,由成都中医药大学附属医院制剂室制备。

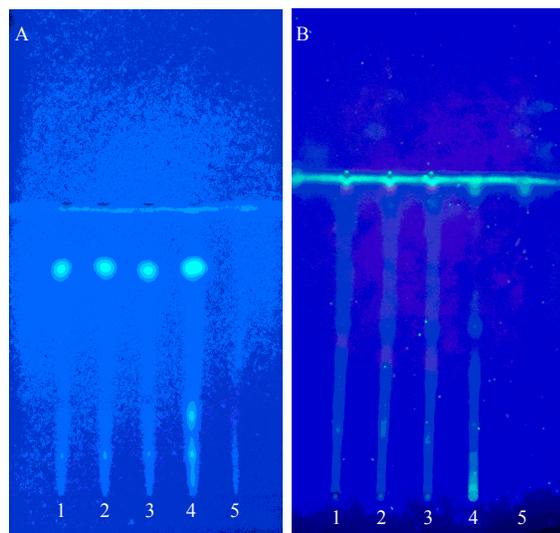
## 2 方法与结果

### 2.1 定性鉴别

**2.1.1 枸杞子的 TLC 鉴别** 取本品 20 mL,用醋酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并醋酸乙酯液,浓缩至 2 mL,作为供试品溶液。取缺枸杞子阴性制剂,同法制成阴性对照溶液。另取枸杞子对照药材 1 g,加水 30 mL,加热煮沸 15 min,放冷,滤过,滤液用醋酸乙酯 30 mL 振摇提取,合并醋酸乙酯液,浓缩至 1 mL,作为对照药材溶液。照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液 5~6  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一高效硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上,以醋酸乙酯-三氯甲烷-甲酸(3:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点,且阴性无干扰,见图 1-A。

**2.1.2 黄精的 TLC 鉴别** 取本品 20 mL,蒸干,残渣加乙醇 20 mL 超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取缺制黄精阴性制剂,同法制成阴性对照溶液。另取制黄精对照药材 2 g,加乙醇 20 mL 超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液各 2  $\mu\text{L}$ ,分别

点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇 (12:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点清新。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点, 且阴性无干扰。见图 1-B。



1~3-供试品 4-对照药材 5-阴性对照  
1—3-sample 4-reference medicinal materials 5-negative control

图1 菊黄口服液中枸杞子 (A) 和制黄精 (B) 的 TLC 图  
Fig. 1 TLC of *Lycii Fructus* (A) and *Polygonati Rhizoma* (B) in JOL

## 2.2 总多糖定量测定

**2.2.1 对照品溶液配制** 精密称取 105 °C 干燥至恒定质量的无水葡萄糖对照品 10.46 g 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 即得质量浓度为 1.046 g/mL 的葡萄糖对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液配制** 吸取 100 mL 菊黄口服液 (批号 140702), 置分液漏斗中, 加入 1/4 体积三氯甲烷和 1/16 的正丁醇, 震荡静止, 收集上清液。上清液重复脱蛋白数次, 直至用考马斯亮蓝 G-250 检测至无蛋白为止, 用活性炭脱色, 浓缩至 50 mL 置磁力搅拌器上, 搅拌 (500 r/min) 同时加无水乙醇使含醇量达 80%, 继续搅拌 10 min, 4 °C 静置过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清液, 沉淀再加无水乙醇溶液适量, 搅匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 挥干乙醇, 残渣用水溶解并转入用水溶解并转移到 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得。

**2.2.3 最大吸收波长选择** 采用苯酚-硫酸法测定多糖的量。精密吸取对照品溶液、供试品溶液以及以蒸馏水作空白的阴性样品溶液各 1.0 mL 于 10

mL 具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 再加入 5% 苯酚 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 置沸水中水浴 30 min, 取出冰浴 10 min 后室温放置 10 min, 采用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计进行扫描, 扫描波长为 450~800 nm, 结果对照品和供试品溶液在 620 nm 处有最大吸收, 且阴性对照液吸收值为 0.001 (<0.005), 说明阴性对照液对样品的测定无干扰, 见图 2。

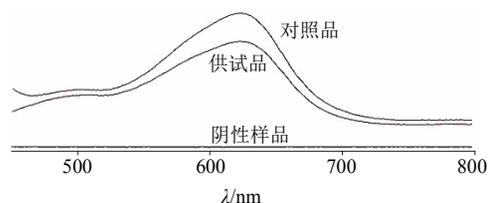


图2 菊黄口服液的 UV 光谱图  
Fig. 2 UV chromatograms of JOL

**2.2.4 标准曲线的制备** 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0 (空白)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 再加入 5% 苯酚 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 置沸水中水浴 30 min, 取出冰浴 10 min 后室温放置 10 min, 采用紫外可见分光光度法在 620 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以葡萄糖质量浓度 (C) 为横坐标, A 值为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程  $A=0.0578C+0.0325$  ( $r=0.9991$ ,  $n=8$ )。结果表明, 葡萄糖对照品溶液质量浓度在 26.15~196.13 mg/mL 与 A 值呈良好的关系。

**2.2.5 稳定性试验** 精密吸取同一批纯化后多糖的供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 分别在显色 0、1、2、3、5、8 h, 按“2.2.4”项下方法操作, 于 620 nm 下测 A 值, 结果 RSD 为 1.26%, 表明该方法稳定性良好。

**2.2.6 精密度试验** 精密吸取葡萄糖对照品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 按“2.2.4”项下方法操作, 于 620 nm 下测 A 值, 连续测定 6 次, 结果 RSD 为 0.98%, 表明该方法精密度良好。

**2.2.7 重复性试验** 分别精密吸取 5 份同一批纯化后多糖的供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 按“2.2.4”项下方法操作, 于 620 nm 下测 A 值, 结果 RSD 为 1.22%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密吸取已测定的纯化后

多糖的供试品溶液(批号140702) 0.5 mL于10 mL具塞试管中,共9份,按对照品加入量为样品中质量分数的80%、100%、120%加入葡萄糖对照品,加水至2.0 mL,按“2.2.4”项下方法操作,于620 nm下测A值,结果总多糖平均回收率为99.82%,RSD为1.27%。

**2.2.9 样品测定** 取6批菊黄口服液(批号140601、140602、140603、140701、140702、140703),每个样品平行2份,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,分别取各个供试品溶液1.0 mL于10 mL具塞试管中,加水至2.0 mL,再加入5%苯酚1.0 mL和浓硫酸5.0 mL,摇匀,置沸水中水浴30 min,取出冰浴10 min后室温放置10 min,采用紫外可见分光光度法在620 nm处分别测得其A值,根据回归方程,计算总多糖的量,结果平均值为158.19、159.78、164.54、165.03、166.49、157.74 mg/mL。

### 2.3 8种成分的测定

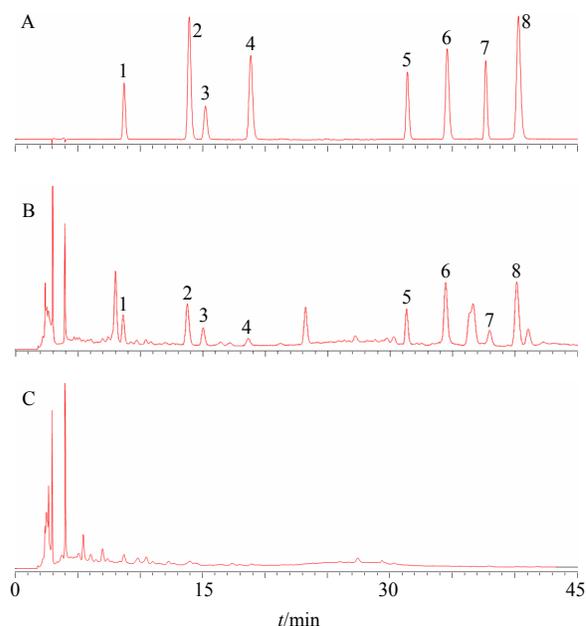
**2.3.1 色谱条件** Odysil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱: 0~13 min, 10%~13%乙腈; 13~18 min, 13%~15%乙腈; 18~22 min, 15%~18%乙腈; 22~25 min, 18%~20%乙腈; 25~35 min, 20%~22%乙腈; 35~45 min, 22%~25%乙腈; 体积流量为1.0 mL/min; 检测波长为325 nm; 柱温为30 ℃; 进样量10 μL。

**2.3.2 混合对照品溶液配制** 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸对照品适量,精密称定,置10 mL棕色量瓶中,加50%甲醇溶液配制含新绿原酸0.170 mg/mL、绿原酸0.678 mg/mL、隐绿原酸0.086 mg/mL、咖啡酸0.392 mg/mL、木犀草苷0.363 mg/mL、3,4-二咖啡酰奎尼酸0.582 mg/mL、3,5-二咖啡酰奎尼酸0.301 mg/mL、4,5-二咖啡酰奎尼酸0.674 mg/mL的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液制备** 精密量取菊黄口服液(批号140702) 1.0 mL,置10 mL量瓶中,加50%甲醇溶解,超声处理10 min,定容,摇匀,微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.3.4 阴性供试品溶液制备** 按处方比例称取除菊花以外的其余药味,按制备工艺分别制成缺菊花的阴性样品,按“2.3.3”项下方法制备,制成阴性供试品溶液。

**2.3.5 专属性试验** 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液各10 μL,按“2.3.1”项下方法测定,结果样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸色谱峰的保留时间与对照品一致,8种目标成分分离度良好,并且阴性供试品溶液对预测成分测定无干扰,表明该方法具有良好的专属性。色谱图见图3。



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-木犀草苷 6-3,4-二咖啡酰奎尼酸 7-3,5-二咖啡酰奎尼酸 8-4,5-二咖啡酰奎尼酸  
1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-coffeic acid 5-galuteolin 6-3,4-dicaffeoylquinic acid 7-3,5-dicaffeoyl quinic acid 8-4,5-dicaffeoylquinic acid

图3 混和对照品(A)、菊黄口服液样品(B)和缺菊花阴性样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A), JOL sample (B), negative sample without *Chrysanthemi Flos* (C)

**2.3.6 线性关系考察** 分别精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液用50%甲醇逐级稀释2、4、8、10、16倍得到系列混合对照品溶液,精密吸取6个质量浓度的混合对照品溶液各10 μL,按“2.3.1”项下方法测定。以峰面积积分值为纵坐标(Y),进样质量浓度为横坐标(X),进行线性回归,得回归方程及相关系数(r);并以10倍信噪比确定定量限,3倍信噪比确定检测限,结果见表1。

**2.3.7 精密度试验** 精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.3.1”项下方法测定,连续进样6次,测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡

表1 8种化学成分的线性方程、*r*、线性范围

Table 1 Regression equations, *r*, and linearity ranges of eight constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )	检测限/(ng·mL <sup>-1</sup> )	定量限/(ng·mL <sup>-1</sup> )
新绿原酸	$Y=3.4 \times 10^6 X - 3\ 107.4$	0.999 9	0.011~0.170	6.35	22.17
绿原酸	$Y=2.8 \times 10^6 X - 8\ 772.2$	0.999 8	0.042~0.678	2.89	5.13
隐绿原酸	$Y=5.3 \times 10^6 X - 4\ 816.9$	0.999 9	0.005~0.086	6.67	20.32
咖啡酸	$Y=2.9 \times 10^6 X - 2\ 105.1$	0.999 9	0.025~0.392	5.72	15.29
木犀草苷	$Y=2.4 \times 10^6 X + 1\ 930.6$	0.999 9	0.023~0.363	2.59	9.86
3,4-二咖啡酰奎尼酸	$Y=2.2 \times 10^6 X - 1.4 \times 10^5$	0.999 9	0.036~0.582	2.51	7.24
3,5-二咖啡酰奎尼酸	$Y=2.6 \times 10^6 X - 4.0 \times 10^4$	0.999 8	0.019~0.301	2.13	6.91
4,5-二咖啡酰奎尼酸	$Y=3.1 \times 10^6 X - 1.8 \times 10^5$	0.999 8	0.042~0.674	2.94	8.45

酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.63%、0.94%、1.25%、1.02%、0.79%、1.21%、0.58%，表明仪器精密度良好。

**2.3.8 稳定性试验** 取同一批（批号 140702）供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.3.1”项下方法测定，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸峰面积的 RSD 分别为 0.69%、0.91%、1.25%、1.40%、1.17%、0.88%、1.39%、1.52%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.9 重复性试验** 精密吸取菊黄口服液样品（批号 140702）1.0 mL，共 6 份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下方法测定，计算上述 8 种成分质量浓度的 RSD 分别为 0.82%、1.19%、1.85%、1.66%、1.41%、1.02%、1.81%、0.89%，表明该方法重复性良好。

**2.3.10 加样回收率试验** 取已测定的样品（批号 140702）0.5 mL，共 9 份，分别按对照品加入量为样品中质量分数的 80%、100%、120%精密加入混合对照品溶液适量，分别按“2.3.3”项下方法制备

供试品溶液，按“2.3.1”项下方法测定，计算回收率，结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸的平均回收率在 99.18%~101.06%，RSD 在 0.79%~1.91%。

**2.3.11 样品测定** 取 6 批菊黄口服液样品（批号 140601、140602、140603、140701、140702、140703），每个样品平行 2 份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件分别进行测定，根据标准曲线回归方程计算，得出 6 个批次样品中 8 种成分的质量浓度分别为新绿原酸 102.9~142.6 μg/mL、绿原酸 488.6~563.8 μg/mL、隐绿原酸 58.9~71.6 μg/mL、咖啡酸 240.7~326.1 μg/mL、木犀草苷 228.6~302.7 μg/mL、3,4-二咖啡酰奎尼酸 398.0~485.4 μg/mL、3,5-二咖啡酰奎尼酸 184.1~203.1 μg/mL、4,5-二咖啡酰奎尼酸 476.2~561.8 μg/mL，结果见表 2。

### 3 讨论

#### 3.1 TLC 鉴别方法的选择

本研究采用 TLC 法对其处方组成药味枸杞子和制黄精进行了定性分析，通过方法筛选<sup>[9-10]</sup>，结

表2 6批样品中8种成分的定量测定 (n=2)

Table 2 Quantitative determination of eight constituents in six batches of samples (n=2)

批号	质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )							
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	木犀草苷	3,4-二咖啡酰奎尼酸	3,5-二咖啡酰奎尼酸	4,5-二咖啡酰奎尼酸
140601	102.9	494.9	67.5	280.9	264.7	421.7	184.1	521.6
140602	130.1	518.7	64.3	276.9	291.1	405.4	194.3	501.9
140603	132.2	490.1	64.0	254.8	284.2	430.9	185.3	499.8
140701	132.4	504.2	60.3	265.2	251.9	435.2	203.1	510.7
140702	142.6	563.8	71.6	326.1	302.7	485.4	191.7	561.8
140703	117.7	488.6	58.9	240.7	228.6	398.0	193.4	476.2

果采用该鉴别方法简单易行,具有分离度好、重复性好、专属性强的特点,能特征地鉴别枸杞子和制黄精,斑点均清晰,阴性无干扰。

### 3.2 定量测定指标的选择

方中菊花、制黄精、枸杞子、北沙参4味中药均含多糖,临床功效及生物活性明确,故确定多糖为菊黄口服液的质控指标之一,同时采用HPLC法测定制剂中君药菊花中新绿原酸、绿原酸等8种有效成分的量,可有效控制原药材的质量。

### 3.3 多糖定量测定前处理方法的选择

在多糖的定量测定中应排除单糖及其他水溶性成分的影响,目前多糖提取纯化最常用的是水提醇沉以排除小分子物质、单糖及寡糖等的干扰,Sevage法脱蛋白、活性炭脱色等,但是在样品前处理过程中操作繁琐,容易产生误差,影响实验结果,所以更应操作规范,以减少误差。

### 3.4 多糖定量测定方法的选择

多糖的定量测定是目前研究中的一个难点。苯酚-硫酸法测总多糖的量是目前被广泛使用的一种经典方法,适用于对单糖、寡糖以及均多糖的测定<sup>[1]</sup>,但复方制剂中多糖的来源更复杂,因此本实验选择该方法对菊黄口服液总多糖测定是对菊黄口服液质量进行初步评价。

### 3.5 HPLC 定量检测时色谱条件的选择

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水系统,结果发现乙腈-水系统干扰较小且分离效果较好,且梯度洗脱过程中基线平稳,因此选择乙腈-水系统。为了改善峰形,把流动相调整为弱酸性,提高分离度。本实验还对检测波长(348、327、325 nm)进行比较,结果325 nm下各峰丰度较高,故选择325 nm为其检测波长。此外,对柱温、体积流量、进样量等色谱参数进行优化最终确定色谱条件。

本实验通过对菊黄口服液中枸杞子和制黄精进

行TLC鉴别,并采用苯酚-硫酸法对菊黄口服液中总多糖的量进行测定,同时建立RP-HPLC对君药菊花中8种成分定量测定的方法,从定性鉴别以及总多糖与8种化学成分定量测定的角度,以期综合评价和控制菊黄口服液制剂质量。

### 参考文献

- [1] 崔乙,徐国兴.糖尿病患者干眼的研究进展[J].国际眼科杂志,2014,14(9):1602-1605.
- [2] 范灵婧,倪鑫炎,吴纯洁,等.菊花多糖的结构特征及其对NF-KB和肿瘤细胞的活性研究[J].中草药,2013,44(17):2364-2371.
- [3] Liang F, Hu C, He Z, et al. An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium* structural and bioactivity studies [J]. *Carbohydr Res*, 2014, 387(31): 37-41.
- [4] 公惠玲,李卫平,尹艳艳,等.黄精多糖对链脲菌素糖尿病大鼠降血糖作用及其机制探讨[J].中国中药杂志,2009,34(9):1149-1154.
- [5] 孙化萍,罗旭升,曾庆华,等.0.8%黄精多糖滴眼液对干眼症的实验研究[J].中国中医眼科杂志,2004,14(2):9-11.
- [6] 白双,于鑫,杜瑛培,等.枸杞多糖对NMDA致大鼠视网膜损伤保护作用的研究[J].中国药理学通报,2013,29(5):670-674.
- [7] Yuan Z, Tezuka Y, Fan W, et al. Constituents of the underground parts of *Glehnia littoralis* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2002, 50(1): 73-77.
- [8] 沈智,张文婷,黄琴伟,等.RP-HPLC法测定菊花中3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸[J].中草药,2010,41(2):307-310.
- [9] 中国药典[S].一部.2010.
- [10] 邹玉繁,汪小根.清热利湿片中主要成分的薄层鉴别研究[J].广东化工,2014,41(12):78-79.
- [11] 石凤敏,佟曦然,丁自勉,等.灵芝-淫羊藿菌质总多糖量动态变化的初步研究[J].中草药,2013,44(11):1486-1489.