

# Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Osthole in Jieeryin Lotion by HPLC

Xiaona An, Tie Liu, Delong Liu\*, Yongju Wei

College of Chemistry and Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei  
Email: \*delongliu9012@sina.com, 330978557@qq.com

Received: Apr. 13<sup>th</sup>, 2018; accepted: Apr. 27<sup>th</sup>, 2018; published: May 4<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

**Objective:** An HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and osthole in jieeryin lotion was established, providing the basis for improving the jieeryin quality evaluation method. **Methods:** The HPLC method was performed on a ZORBAX SB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column. The mobile phase was a solution of acetonitrile-0.2% formic acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 324 nm, and the column temperature was 30°C. **Results:** The calibration curves were linear within the range of 0.010 - 0.149 μg (r = 0.9998) for chlorogenic acid, 0.029 - 0.572 μg (r = 0.9999) for osthole, respectively. The average recoveries (n = 6) of chlorogenic acid and osthole were 97.9% (RSD = 0.69%), 100.5% (RSD = 0.96%), respectively. **Conclusion:** The method can be used for simultaneous determination of chlorogenic acid and osthole in jieeryin Lotion.

## Keywords

Jieeryin Lotion, Chlorogenic Acid, Osthole, HPLC

# HPLC法同时测定洁尔阴洗液中绿原酸和蛇床子素的含量

安晓娜, 刘 铁, 刘德龙\*, 魏永巨

河北师范大学化学与材料科学学院, 河北 石家庄  
Email: \*delongliu9012@sina.com, 330978557@qq.com

收稿日期: 2018年4月13日; 录用日期: 2018年4月27日; 发布日期: 2018年5月4日

\*通讯作者。

## 摘要

目的: 建立HPLC法同时测定洁尔阴洗液中绿原酸和蛇床子素的含量, 为完善该洗液质量评价方法提供依据。方法: 采用ZORBAXSB-C18色谱柱(4.6 × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液(梯度洗脱)。流速为1.0 mL/min; 柱温为30°C; 检测波长为324 nm。结果: 绿原酸和蛇床子素进样量分别在0.010~0.149 μg (r = 0.9998)、0.029~0.572 μg (r = 0.9999)范围内线性关系良好; 平均加样回收率(n = 6)分别为97.9%, 100.5%; RSD分别为0.69%、0.96%。结论: 本法适用于同时测定洁尔阴洗液中绿原酸和蛇床子素的含量。

## 关键词

洁尔阴, 绿原酸, 蛇床子素, 高效液相色谱法

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

洁尔阴洗液是一种妇科常用的外用药, 由蛇床子、艾叶、独活、石菖蒲、金银花、黄柏、栀子和黄芩等 14 味中药材制成[1]。在临床上, 它具有清热燥湿、杀虫止痒的功效, 主要用于治疗妇女湿热带下和霉菌性、滴虫性、非特异性阴道炎以及湿疹、接触性皮炎和体股癣等病症[2]。在新药转正标准中药第十二册[1]中记录了以蛇床子素为指标成分, 采用色谱法测定其含量。陈琴华[3], 徐亚敏等[4]人只采用高效液相色谱法测定了该洗液中蛇床子素的含量。由于艾叶和金银花等药材中含有的绿原酸具有抗菌, 抗病毒, 消炎的作用[5] [6] [7] [8], 也是该洗液中的有效成分, 因此准确测定其含量对于保证药效具有重要意义。为完善中药复方制剂质量标准, 本实验探讨 HPLC 法梯度洗脱同时测定洁尔阴洗液中绿原酸和蛇床子素的含量。

## 2. 仪器与试剂

### 2.1. 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪(配置真空在线脱气、自动进样器、VWD 检测器、四元泵, 色谱工作站), AUW220D 电子分析天平(日本岛津), KQ-100DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 2.2. 试剂

对照品绿原酸(成都植标化纯; 批号: 14051)、蛇床子素(上海源叶生物科技有限公司; 批号: YY20110525)供含量测定用; 乙腈(色谱纯, Tedia Company); 甲酸(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 甲醇(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司); 水(娃哈哈饮用纯净水); 洁尔阴洗液(批号: 1612096)购自石家庄乐仁堂大药房。

## 3. 方法与结果

### 3.1. 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 (4.6 × 150 mm, 5μm), 流动相: 乙腈-0.2%甲酸水溶液, 参考文献[9]建立

了梯度洗脱程序见表 1，流速为 1.0 mL/min；柱温为 30℃；检测波长为 324 nm。

## 3.2. 溶液的制备

### 3.2.1. 对照品溶液

精密称取绿原酸，蛇床子素对照品 2.13 mg、2.86 mg，分别置于 100 mL 的容量瓶中，加甲醇溶解，定容至刻度并摇匀，得到含绿原酸 21.3  $\mu\text{g/mL}$ ，蛇床子素 28.6  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。溶液进样分析前经孔径 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

### 3.2.2. 供试品溶液

取一定量的洁尔阴洗液，摇匀。溶液进样分析前经孔径 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

## 3.3. 系统适用性试验

取“3.2.”项下的对照品溶液和供试品溶液，按“3.1.”项下色谱条件，分别进样 5  $\mu\text{L}$  分析见图 1，由图 1 中(a)和(b)可知，绿原酸和蛇床子素保留时间分别为 6.819 min，16.630 min。在样品色谱图(c)中，分别有与对照品绿原酸，蛇床子素保留时间一致的特征峰。

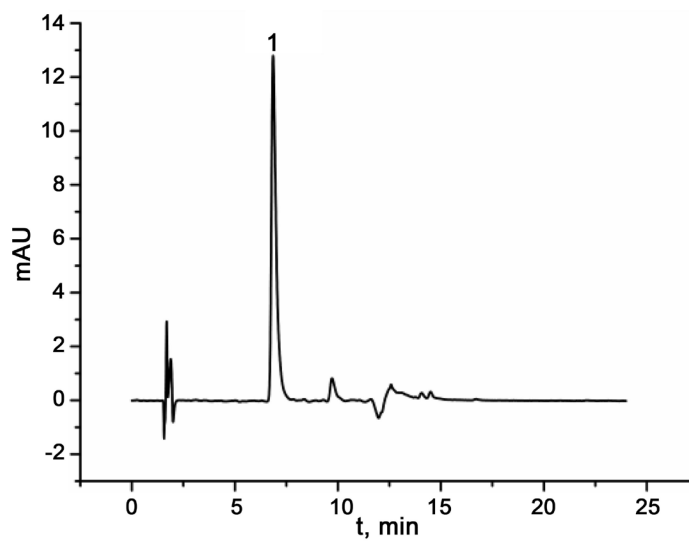
## 3.4. 线性关系考察

分别取“3.2.1.”项下对照品溶液，按“3.1.”项下色谱条件，绿原酸自动进样 0.5，1，3，5，7  $\mu\text{L}$ ，

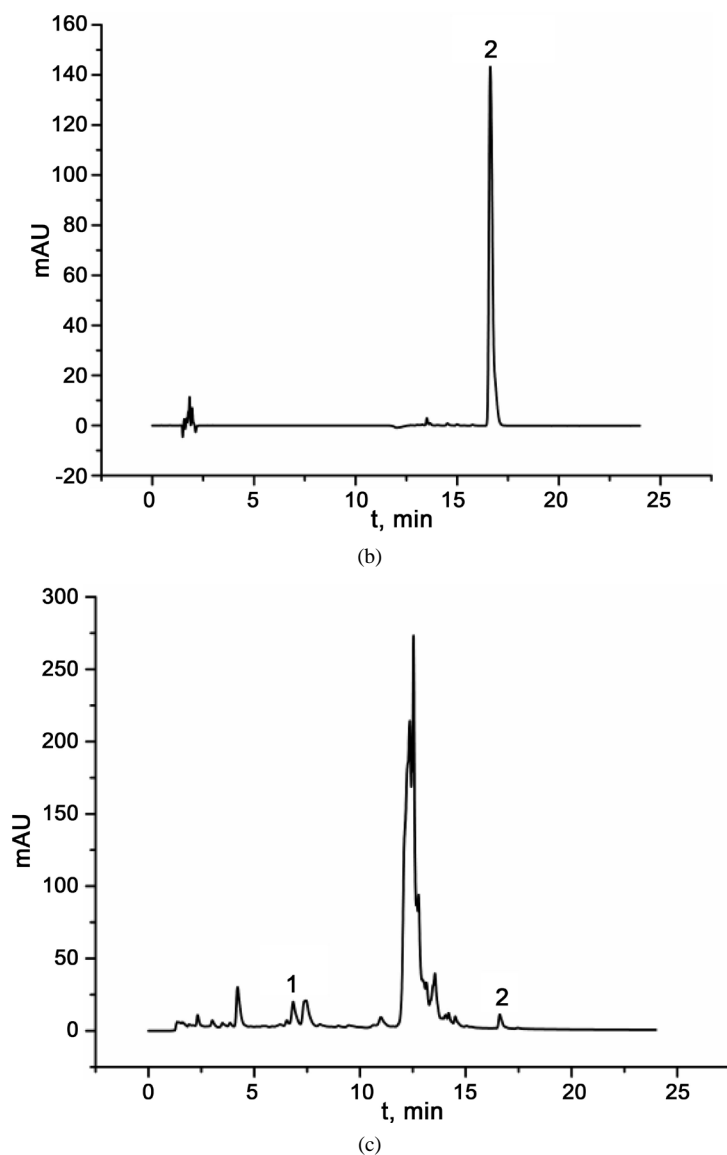
**Table 1.** Gradient elution programs

**表 1.** 梯度洗脱程序

时间, min	0.2% 甲酸溶液, %	乙腈, %
0	91	9
9	87	13
11	35	65
23	35	65
24	91	9



(a)



**Figure 1.** HPLC chromatograms. (a) Chlorogenic acid; (b) Osthole; (c) Jieeryin Lotion. (1. Chlorogenic acid; 2. Osthole)  
**图 1.** 高效液相色谱图。(a) 绿原酸对照品；(b) 蛇床子素对照品；(c) 洁尔阴供试品。(1. 绿原酸；2. 蛇床子素)

蛇床子素自动进样 1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积。分别以峰面积  $Y$  为纵坐标, 进样量  $X$  为横坐标, 进行线性回归。结果显示绿原酸和蛇床子素的进样量分别在 0.010~0.149  $\mu\text{g}$ , 0.029~0.572  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。回归方程分别为  $y = 41.233x + 0.95$  ( $r = 0.9998$ ),  $y = 88.756x - 0.7148$  ( $r = 0.9999$ )。

### 3.5. 精密度试验

分别取“3.2.1.”项下对照品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件, 连续自动进样 5  $\mu\text{L}$ , 共五次, 记录峰面积。计算结果显示绿原酸和蛇床子素峰面积的 RSD 均为 0.28%。表明仪器精密度良好。

### 3.6. 稳定性试验

取“3.2.2.”项下供试品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件, 于 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24, 36 h 自动进样 3  $\mu\text{L}$ 。记录峰面积, 计算得绿原酸和蛇床子素峰面积 RSD 分别为 0.47%, 0.39%, 表明供试液稳定性良

好。

### 3.7. 重复性试验

取同一批号(批号: 1612096)洁尔阴洗液样品, 精密量取 6 份, 按“3.2.2.”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件, 分别自动进样 3  $\mu\text{L}$  进行分析, 记录峰面积, 计算得样品中绿原酸和蛇床子素 RSD 分别为 0.36% 和 0.75%。结果表明, 分析方法的重复性良好。

### 3.8. 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:1612096)1 mL, 共 6 份, 分别精密加入绿原酸对照品溶液(21.3  $\mu\text{g/mL}$ ) 2 mL 和蛇床子素对照品溶液(28.6  $\mu\text{g/mL}$ ) 0.545 mL, 按“3.2.2.”项下方法制备回收率试液, 按“3.1.”项下色谱条件, 自动进样 5  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积, 计算结果见表 2。表明 HPLC 方法具有良好的准确性。

### 3.9. 样品含量测定

取“3.2.2.”项下的供试品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件, 自动进样 3  $\mu\text{L}$ , 共六次, 记录峰面积, 将测定面积带入相应的标准曲线方程, 计算得样品中绿原酸和蛇床子素平均含量分别为 40.2  $\mu\text{g/mL}$ , 12.4  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 4. 讨论

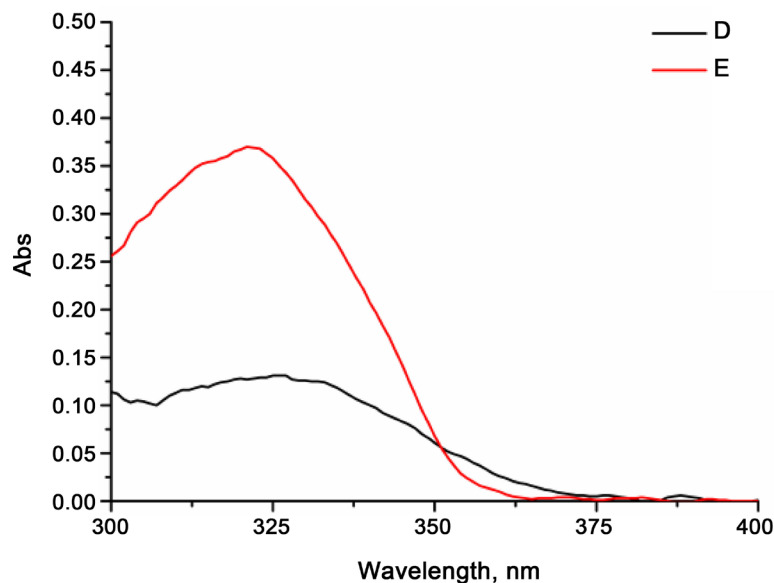
### 4.1. 检测波长的选择

为了保证各成分都具有适宜的灵敏度和精密度, 分别测定了绿原酸和蛇床子素在流动相中的紫外吸收光谱见图 2。绿原酸, 蛇床子素的最大吸收波长分别为 327 nm 和 322 nm, 与参考文献[10]一致。由于两波长非常接近, 于是本文选取 324 nm 为检测波长, 结果显示目标成分的响应值均较高。见图 1(c)中有响应值最高的峰, 但该峰并未完全分开。由文献[11] [12]可知, 艾叶中的蒙花苷, 刺槐素, 独活中的异欧前胡素等的最强吸收都比较接近 324 nm, 由此推测可能是这几种物质在该波长下响应信号叠加在一起导

**Table 2.** Results of recovery tests (n = 6)

**表 2.** 加样回收率试验结果(n = 6)

化合物	样品量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.0568	0.0601	0.1161	98.9	97.9	0.69
	0.0568	0.0601	0.1153	97.5		
	0.0568	0.0601	0.1151	97.0		
	0.0568	0.0601	0.1152	97.3		
	0.0568	0.0601	0.1159	98.4		
	0.0568	0.0601	0.1160	98.6		
蛇床子素	0.0176	0.0220	0.0400	102.1	100.5	0.96
	0.0176	0.0220	0.0398	101.3		
	0.0176	0.0220	0.0395	99.9		
	0.0176	0.0220	0.0397	100.6		
	0.0176	0.0220	0.0396	100.1		
	0.0176	0.0220	0.0393	99.1		



**Figure 2.** UV absorption spectra of chlorogenic acid (D) and osthol (E)  
**图 2.** 绿原酸(D)和蛇床子素(E)的紫外吸收光谱

致了这个大峰的出现。

#### 4.2. 流动相的选择

为保证被测定化合物良好的分离度和适当的保留时间, 实验中采用等度洗脱, 调节甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液分配比例, 目标成分和杂质成分未能分离。采用梯度洗脱, 以甲醇-0.2%甲酸为流动相, 分离效果不好。以乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相分离效果好, 峰形好, 基线较稳定, 同时有机酸降低了磷酸对色谱柱的损坏。

### 5. 结论

本实验用 HPLC 法同时测定洁尔阴洗液中绿原酸和蛇床子素的含量。实验结果表明, 该洗液中蛇床子素含量符合新药转正标准中药第十二册[1]规定(蛇床子素  $\geq 3 \mu\text{g/ml}$ ), 同时增加了绿原酸的含量测定, 为洁尔阴洗液的质量控制标准提供了方法依据。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 新药转正标准[S]. 第十二册. 北京: 化学工业出版社, 1997: 13.
- [2] 余绍玲, 何秀田. 洁尔阴洗液的临床新用途[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(11): 696-702.
- [3] 陈琴华, 胡文姬, 王众勤, 等. 反相高效液相色谱法测定洁尔阴洗液中蛇床子素含量[J]. 中国药业, 2010, 19(19): 29-30.
- [4] 徐亚敏, 肖正达, 徐赛红, 等. 洁尔阴洗液中蛇床子素的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(4): 176-178.
- [5] 彭贵龙, 周光明, 秦红英, 等. HPLC 法同时测定 24 种花中的 5 种活性成分含量[J]. 分析实验室, 2014, 33(6): 646-650.
- [6] 张宇平, 黄可龙. 高效液相色谱法同时测定金银花中 5 种有机酸[J]. 分析实验室, 2007, 26(7): 67-70.
- [7] 胡生俊, 徐岳鑫, 董赛文. 高效液相色谱法测定复方金银花颗粒中绿原酸含量[J]. 中国药业, 2011, 20(3): 23.
- [8] Michel, D.D.S., Maria, C.A., Norberto, P.L., *et al.* (2006) Evaluation of the Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29**, 2236-2240.

<https://doi.org/10.1248/bpb.29.2236>

- [9] 毛菊华, 王伟影, 张玲丽, 等. HPLC 法同时测定金归洗液中绿原酸和蛇床子素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 621-623.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221-315.
- [11] 徐凌玉, 李振麟, 钱士辉. HPLC 法测定薄荷中黄酮类成分的含量[J]. 化学工程与装备, 2016(11): 180-182.
- [12] 邢婕, 胡晓静, 赵春杰, 等. RP-HPLC 法测定独活中蛇床子素和异欧前胡素含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2): 93-96.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-441X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [pi@hanspub.org](mailto:pi@hanspub.org)