

# HPLC法同时测定3种老鹳草中7种成分

曹波，尹海波\*，贾晓晴，邵飞  
(辽宁中医药大学药学院，辽宁大连 116600)

**摘要：**目的 建立HPLC法同时测定老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim.、牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd. 和野老鹳草 *Geranium carolinianum* L. 中没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸、金丝桃苷和槲皮素的含有量。**方法** 分析采用Agilent 5TC-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.1%磷酸，梯度洗脱；体积流量1 mL/min；检测波长280 nm(0~32 min)、360 nm(32~62 min)；柱温30 °C。SPSS17.0软件进行数据分析。**结果** 3种老鹳草中7种成分含有量均依次为老鹳草素>柯里拉京>鞣花酸>没食子酸>原儿茶酸>金丝桃苷>槲皮素。其中，没食子酸、槲皮素含有量呈显著性差异( $P<0.05$ )。**结论** 7种成分含有量在牻牛儿苗和野老鹳草中相近，而在老鹳草中较低。

**关键词：**老鹳草；牻牛儿苗；野老鹳草；化学成分；HPLC

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2016)06-1338-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.027

## Simultaneous determination of seven constituents in three kinds of cranesbill by HPLC

CAO Bo, YIN Hai-bo\*, JIA Xiao-qing, SHAO Fei

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for simultaneous determining the contents of gallic acid, protocatechuic acid, corilagin, geraniin, ellagic acid, hyperoside and quercetin in *Geranium wilfordii* Maxim., *Erodium stephanianum* Willd. and *Geranium carolinianum* L. **METHODS** The analysis was performed on an Agilent C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with gradient elution, flow rate was 1 mL/min, detection wavelengths were set at 280 nm (0~32 min) and 360 nm (32~62 min), and column temperature was maintained at 30 °C. SPSS17.0 software was used for data analysis. **RESULTS** The contents of seven constituents in three kinds of cranesbill were all in sequence of geraniin > corilagin > ellagic acid > gallic acid > protocatechuic acid > hyperoside > quercetin. Among them, the contents of gallic acid and quercetin showed significant differences ( $P<0.05$ ). **CONCLUSION** The contents of seven constituents are similar in *E. stephanianum* and *G. carolinianum*, which are lower in *G. wilfordii*.

**KEY WORDS:** *Geranium wilfordii* Maxim. ; *Erodium stephanianum* Willd. ; *Geranium carolinianum* L. ; chemical constituents; HPLC

老鹳草药材始见于《滇南本草》<sup>[1]</sup>，《中国药典》2015版规定其有3种不同来源，分别为牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.、老鹳草 *Gerani-*

*um wilfordii* Maxim. 和野老鹳草 *Geranium carolinianum* L.<sup>[2]</sup>，其主要化学成分包括黄酮、鞣质、有机酸和挥发油<sup>[3-4]</sup>。目前，对老鹳草药材进行含有

收稿日期：2015-10-25

基金项目：中医药行业科研专项(201407002)

作者简介：曹波(1990—)，女，硕士生，研究方向为种质资源鉴定及中药品质评价。Tel: 13998416323, E-mail: 1156034502@qq.com

\*通信作者：尹海波(1973—)，男，博士，教授，研究方向为种质资源鉴定及中药品质评价。Tel: (0411) 87586003, E-mail: yhb0528@sina.com

量测定的报道很多<sup>[5-10]</sup>，但鲜有对这3种老鹳草多指标成分测定及比较的研究<sup>[11]</sup>。为了能够更加全面有效地评价三者的质量，本实验采用HPLC法同时测定老鹳草药材中7种活性成分没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸、金丝桃苷和槲皮素的含有量。

## 1 仪器与试药

Agilent 1100 色谱仪，包括 Chemstation 化学工作站（美国 Agilent 公司）；电子天平（德国 Sartorius 公司）；超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。没食子酸、原儿茶酸、槲皮素（中国食品药品检定研究院，批号分别为 110831-200302、110809-200604、100081-200406）；柯里拉京、金丝桃苷（上海源叶生物科技有限公司，批号分别为 PM0529SA14、RA0504FA14）；老鹳草素、鞣花酸（上海融禾医药科技有限公司，批号分别为 100503、091227）。乙腈、磷酸为色谱纯（天津市科密欧化学试剂有限公司）；其他试剂均为分析纯；水为市售哇哈哈纯净水。21 批药材均为野生，经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定分别为老鹳草 *G. wilfordii*、牻牛儿苗 *E. stephanianum*、野老鹳草 *G. carolinianum*，样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	品种	产地	编号	品种	产地
S1	老鹳草	辽宁本溪	S12	牻牛儿苗	吉林通化
S2	老鹳草	山东潍坊	S13	牻牛儿苗	内蒙古通辽
S3	老鹳草	吉林临江	S14	牻牛儿苗	陕西咸阳
S4	老鹳草	吉林敦化	S15	野老鹳草	山东枣庄
S5	老鹳草	山东青岛	S16	野老鹳草	山东胶南
S6	老鹳草	吉林白山	S17	野老鹳草	湖南湘潭
S7	老鹳草	河北承德	S18	野老鹳草	江西南昌
S8	牻牛儿苗	辽宁葫芦岛	S19	野老鹳草	江西抚州
S9	牻牛儿苗	吉林白城	S20	野老鹳草	河南洛阳
S10	牻牛儿苗	黑龙江齐齐哈尔	S21	野老鹳草	浙江临安
S11	牻牛儿苗	内蒙古呼和浩特			

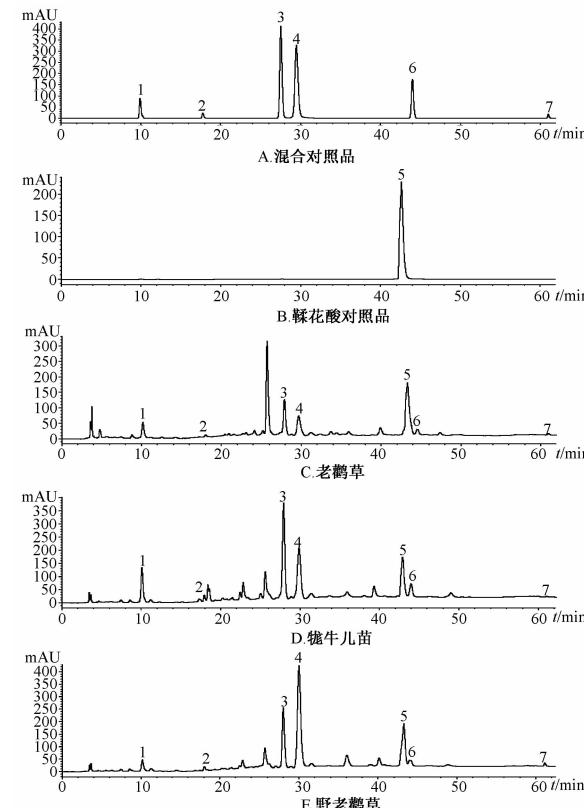
## 2 方法与结果

### 2.1 试样的制备及色谱条件

2.1.1 对照品溶液的制备<sup>[12]</sup> 称取没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、金丝桃苷、槲皮素对照品 1.25、0.59、8.95、11.8、0.65、0.13 mg，置于 10 mL 棕色量瓶中，甲醇溶解并定容，摇匀，即得混合对照品溶液。另称取干燥至恒重的鞣花酸对照品 7.25 mg，置于 5 mL 棕色量瓶中，二甲基亚砜溶解并定容<sup>[13]</sup>，摇匀，即得。

2.1.2 供试品溶液的制备<sup>[12]</sup> 精密称取 3 种老鹳草药材粉末（40 目）2 g，置于圆底烧瓶中，并加入 200 mL 甲醇，回流提取 1 h，共 2 次，合并滤液蒸干，甲醇定容至 25 mL 棕色量瓶中，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent 5TC-C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm × 4.6 mm, 5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 10 min, 4% ~ 5% A；10 ~ 15 min, 5% ~ 12% A；15 ~ 20 min, 12% ~ 14% A；20 ~ 30 min, 14% ~ 15% A；30 ~ 40 min, 15% ~ 21% A；40 ~ 50 min, 21% A；50 ~ 60 min, 21% ~ 45% A；60 ~ 62 min, 45% A）；柱温 30 °C；检测波长 280 nm（0 ~ 32 min）和 360 nm（32 ~ 62 min）；体积流量 1 mL/min；进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1. 没食子酸
  2. 原儿茶酸
  3. 柯里拉京
  4. 老鹳草素
  5. 鞣花酸
  6. 金丝桃苷
  7. 槲皮素
1. gallic acid
  2. protocatechuic acid
  3. corilagin
  4. geraniin
  5. ellagic acid
  6. hyperin
  7. quercetin

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

### 2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系 精密量取混合和鞣花酸对照品溶液各 2.5 mL，置于 5 mL 棕色量瓶中，甲醇和二

甲基亚砜稀释至刻度, 摆匀, 连续稀释4次, 即得一系列质量浓度溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下进样10 μL分析。以对照品质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归, 结果见表2。

表2 7种成分的标准曲线

Tab. 2 Standard curves of seven constituents

成分	标准曲线	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	r
没食子酸	$Y = 10.399X + 245.08$	15.6~250	0.9997
原儿茶酸	$Y = 14.189X - 66.058$	7.38~118	0.9997
柯里拉京	$Y = 10.218X - 1.023.7$	112~1790	0.9999
老鹳草素	$Y = 8.259.9X - 1.050.2$	146~2360	0.9995
鞣花酸	$Y = 13.603X - 1.031.2$	90.6~145	0.9998
金丝桃苷	$Y = 82.034X - 664.07$	8.13~130	0.9997
槲皮素	$Y = 12.853X + 10.554$	1.63~26.0	0.9999

2.2.2 精密度试验 分别取同一混合及鞣花酸对照品溶液, 在“2.1.3”项条件下重复进样6次, 测得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸、金丝桃苷、槲皮素峰面积RSD分别为1.66%、1.83%、1.74%、1.55%、1.28%、1.69%、1.77%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 将供试品溶液(S20)置于室温下, 于0、2、4、6、8、10 h进样检测, 测得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸、金丝桃苷、槲皮素峰面积RSD分别为1.59%、1.70%、1.29%、1.54%、1.12%、1.88%、1.59%, 表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 精密称取药材粉末(S20)6份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.3”项条件下测定, 测得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸、金丝桃苷、槲皮素峰面积RSD分别为1.47%、1.70%、1.20%、1.56%、1.04%、1.62%、1.53%, 表明该方法重复性良好。

2.2.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品药材(S20)9份, 每份1 g, 每3份为1组, 每组按低、中、高质量浓度分别加入相当于药材含有量50%、100%、150%的对照品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下分析, 结果见表3。

### 2.3 结果与分析

2.3.1 含有量测定 精密吸取供试品溶液10 μL, 在“2.1.3”项色谱条件下测定, 结果见表4和

图2。

表3 加样回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery tests

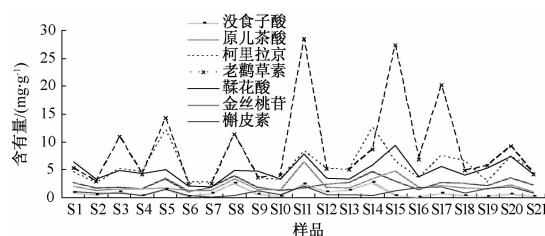
成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/%
没食子酸	0.687	0.348	1.016	98.16	98.76	1.27
	0.687	0.691	1.385	100.51		
	0.687	1.035	1.681	97.62		
原儿茶酸	0.362	0.165	0.512	97.15	98.69	1.24
	0.362	0.364	0.727	100.14		
	0.362	0.538	0.889	98.78		
柯里拉京	7.375	3.632	10.988	99.83	98.34	1.08
	7.375	7.374	14.417	97.75		
	7.375	11.120	18.021	97.44		
老鹳草素	9.226	4.651	13.886	100.07	97.93	1.65
	9.226	9.243	17.757	96.14		
	9.226	13.898	22.566	97.59		
鞣花酸	7.399	3.732	11.210	100.71	98.44	1.70
	7.399	7.389	14.302	96.71		
	7.399	11.092	18.102	97.90		
金丝桃苷	0.217	0.116	0.321	96.40	97.89	1.68
	0.217	0.232	0.436	97.10		
	0.217	0.336	0.554	100.18		
槲皮素	0.185	0.089	0.263	95.99	97.61	1.61
	0.185	0.184	0.368	99.73		
	0.185	0.267	0.439	97.12		

表4 含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 4 Results of content determination (mg/g)

编号	没食子酸	原儿茶酸	柯里拉京	老鹳草素	鞣花酸	金丝桃苷	槲皮素	总含有量
S1	0.96	0.28	4.58	5.33	6.44	0.20	0.11	17.90
S2	0.55	0.18	2.67	2.88	3.36	0.12	0.09	9.85
S3	1.09	0.20	5.15	10.87	4.88	0.16	0.08	22.43
S4	0.47	0.17	4.65	4.24	4.29	0.16	0.04	14.02
S5	1.48	0.35	12.32	14.34	5.07	0.17	0.16	33.80
S6	0.28	0.11	2.84	2.46	2.09	0.12	0.04	7.94
S7	0.80	0.20	2.75	2.59	1.95	0.13	0.02	8.44
S8	2.63	0.41	11.43	11.31	4.89	0.33	0.04	31.04
S9	0.65	0.19	3.53	3.67	4.81	0.14	0.13	13.21
S10	0.28	0.14	3.28	4.12	3.38	0.14	0.05	11.39
S11	2.46	0.18	8.41	28.52	7.85	0.62	0.21	48.25
S12	1.07	0.25	5.17	5.20	3.55	0.18	0.06	15.48
S13	1.47	0.28	5.09	5.11	3.40	0.17	0.05	15.57
S14	2.79	0.47	12.66	8.71	5.91	0.34	0.04	30.92
S15	0.46	0.31	6.43	27.31	9.41	0.48	0.13	44.53
S16	0.18	0.15	3.50	6.80	3.85	0.17	0.18	14.83
S17	0.79	0.28	7.58	20.24	5.56	0.21	0.20	34.86
S18	0.45	0.27	6.54	4.95	4.07	0.17	0.09	16.54
S19	0.32	0.22	2.74	5.73	5.39	0.15	0.17	14.72
S20	0.69	0.36	7.38	9.23	7.40	0.22	0.19	25.47
S21	0.34	0.24	4.87	4.14	4.19	0.10	0.09	13.97

2.3.2 各成分含有量及总含有量平均值的比较 见图3~4, 采用SPSS 17.0软件, 对3种老鹳草中7种成分含有量进行统计学分析。结果表明, 仅原



注: 将原儿茶酸、金丝桃苷、槲皮素的含有量均扩大 10 倍

图 2 各成分含有量折线图

Fig. 2 Line graphs of contents of various constituents

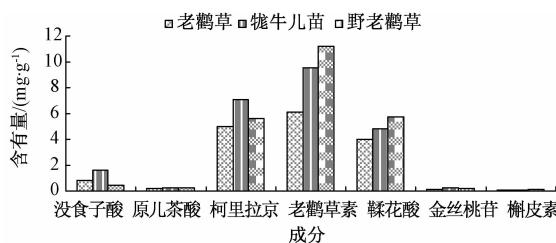


图 3 各成分含有量平均值直观图

Fig. 3 Visual diagrams of average contents of various constituents

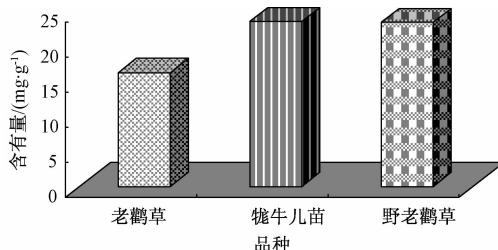


图 4 各成分总含有量平均值直观图

Fig. 4 Visual diagrams of average total contents of various constituents

儿茶酸 ( $P = 0.433 > 0.05$ )、鞣花酸 ( $P = 0.374 > 0.05$ )、槲皮素 ( $P = 0.063 > 0.05$ ) 符合正态分布。将三者进行方差齐性检验, 发现原儿茶酸 ( $P = 0.269 > 0.05$ )、鞣花酸 ( $P = 0.804 > 0.05$ )、槲皮素 ( $P = 0.698 > 0.05$ ) 均满足, 再进行方差分析, 结果见表 5~6。将不符合正态分布的其他 4 种成分进行 Kruskal-Wallis 检验, 结果见表 7。

### 3 讨论与结论

由图 2 可知, 3 种老鹤草中 7 种成分含有量由高到低, 依次为老鹤草素、柯里拉京、鞣花酸、没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷、槲皮素。其中, 金丝桃苷和槲皮素为黄酮类成分, 其他均为鞣质类成分。由图 3 和图 4 可知, 不同产地老鹤草中各成分含有量平均值低于牦牛儿苗和野老鹤草, 其总含有

量平均值差异更明显, 而牦牛儿苗和野老鹤草基本相近。因此, 老鹤草的质量可能不如其他 2 种。

表 5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

成分	变异来源	平方和	$d_f$	均方	F	P
原儿茶酸	组间	0.015	2	0.008	0.884	0.431
	组内	0.154	18	0.009	-	-
	总数	0.170	20	-	-	-
鞣花酸	组间	9.931	2	4.965	1.556	0.238
	组内	57.428	18	3.190	-	-
	总数	67.359	20	-	-	-
槲皮素	组间	0.022	2	0.011	3.952	0.038
	组内	0.050	18	0.003	-	-
	总数	0.072	20	-	-	-

表 6 多重比较结果

Tab. 6 Results of multiple comparisons

样品 I	样品 J	均值差 (I-J)	标准误	显著性	95% 置信区间	
					下限	上限
1	2	-0.005 90	0.028 24	0.837	-0.065 2	0.053 4
	3	-0.071 51*	0.028 24	0.021	-0.130 8	-0.012 2
2	1	0.005 90	0.028 24	0.837	-0.053 4	0.065 2
	3	-0.065 61*	0.028 24	0.032	-0.124 9	-0.006 3
3	1	0.071 51*	0.028 24	0.021	0.012 2	0.130 8
	2	0.065 61*	0.028 24	0.032	0.006 3	0.124 9

注: \* 表示均值差的显著性水平为 0.05。样品 1 为老鹤草, 2 为牦牛儿苗, 3 为野老鹤草

表 7 非参数检验结果

Tab. 7 Results of non-parametric tests

成分	$c^2$	$d_f$	渐近显著性
没食子酸	6.508	2	0.039
柯里拉京	0.000	2	1.000
老鹤草素	0.000	2	1.000
金丝桃苷	0.000	2	1.000

采用 SPSS17.0 统计软件, 对 3 种老鹤草中 7 种成分含有量进行分析, 发现三者没食子酸 ( $P = 0.039 < 0.05$ , 表 7)、槲皮素 ( $P = 0.038 < 0.05$ , 表 5) 存在明显差异。再对槲皮素成分进行多重比较分析, 发现野老鹤草与老鹤草 ( $P = 0.021 < 0.05$ , 表 6)、牦牛儿苗 ( $P = 0.032 < 0.05$ , 表 6) 组间差异有统计学意义, 结合槲皮素含有量平均值 (野老鹤草 0.150 mg/g、老鹤草 0.077 mg/g、牦牛儿苗 0.083 mg/g) 可知, 野老鹤草中槲皮素成分含有量高于其他 2 种。

综上所述, 本实验以 7 种成分含有量为指标, 采用 HPLC 法对 3 种老鹤草进行定量比较研究, 可为《中国药典》中该药材用药的准确性以及质量标准的制定提供一定参考依据。

## 参考文献:

- [1] 明·兰茂. 滇南本草: 第1卷[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1959: 120-125.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 122.
- [3] 周海燕. 老鹳草的研究概况[J]. 国外医药: 植物药分册, 1996, 11(4): 164.
- [4] 杜晓鸣. 老鹳草素(Geraniin)及其抗氧化作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 1990(2): 57.
- [5] 金欣, 王峰, 姚岚, 等. HPLC测定野老鹳草中没食子酸和鞣花酸的总量[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1172-1176.
- [6] Wu Q Y, Zhou Y, Jin X, et al. Chromatographic fingerprint and the simultaneous determination of five bioactive components of *Geranium carolinianum* L. water extract by high performance liquid chromatography[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(12): 8740-8749.
- [7] 吕文龙. HPLC法测定老鹳草中没食子酸的含量[J]. 中国保健营养, 2013, 23(1): 367.
- [8] 尹海波, 赵晓雨, 涂秀文, 等. 不同采收时期牻牛儿苗中4种酚酸类活性成分的动态分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 121-124.
- [9] 王洪成, 尹海波, 曹波, 等. HPLC同时测定不同产地野老鹳草中5种活性成分含量[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 834-836.
- [10] 周公颂, 孙若飞, 李笑然, 等. 不同产地老鹳草中有效成分的测定[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(4): 465-468.
- [11] 许敏, 陈颖, 段素敏, 等. HPLC法测定3种老鹳草药材中没食子酸和柯里拉京的含量[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(6): 39-42.
- [12] 曹波, 尹海波. 三种正品老鹳草HPLC指纹图谱比较研究[C] //第四届中国中药商品学术大会暨中药鉴定学科教学改革与教材建设研讨会论文集. 北京: 中国商品学会, 2015: 101-106.
- [13] 王吉华, 尹海波. 正交试验法优选老鹳草酚酸类成分的提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(6): 986-989.

## 砂烫生附片与炮附片制备前后6种生物碱的变化

陈炯, 谭鹏, 吴月娇, 秦语欣, 王蕾, 李飞\*  
(北京中医药大学, 北京 100102)

**摘要:** 目的 研究砂烫生附片代替炮附片(砂烫黑顺片)的可能性。方法 泥附子切片制成生附片后砂烫, 并观察其外观性状。HPLC法测定单酯型(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱)和双酯型(新乌头碱、乌头碱、次乌头碱)生物碱总含有量。结果 两种炮制品外观性状均无明显差异。砂烫生附片制备前双酯型生物碱总含有量为0.0675%, 制备后降为0.0015%; 炮附片制备前后均检测不到。砂烫生附片制备前单酯型生物碱总含有量为0.0141%, 制备后增至0.0382%; 炮附片制备前为0.0195%, 制备后降为0.0114%。两者均符合《中国药典》要求(双酯型生物碱总含有量不得超过0.020%)。结论 砂烫生附片(仲景制法)具有低毒高效的特点, 值得深入研究。

**关键词:** 生附片; 炮附片; 砂烫; 生物碱; HPLC

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2016)06-1342-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.028

## Variations of six alkaloids in Shengfupian heated with sand and Paofupian before and after preparation

CHEN Jiong, TAN Peng, WU Yue-jiao, QIN Yu-xin, WANG Lei, LI Fei\*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

收稿日期: 2015-10-04

基金项目: 中医药行业科研专项(201107008); 北京中医药大学在读研究生项目(2015-JYB-XS094)

作者简介: 陈炯(1990—), 女, 硕士生, 研究方向为中药炮制。E-mail: chenjiong886@163.com

\*通信作者: 李飞(1964—), 女, 硕士, 教授, 研究方向为中药炮制。E-mail: lf668@sina.com