

# 辽宁省5种老鹳草中5种活性成分的含量测定

谷静逸<sup>1</sup>, 尹海波<sup>1\*</sup>, 赵容<sup>2</sup>, 贾晓晴<sup>2</sup>, 邵飞<sup>2</sup>  
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定老鹳草属 5 种老鹳草中原儿茶酸、没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷含量的方法。方法:采用 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 磷酸-乙腈梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C。结果:原儿茶酸、没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷 5 种成分的线性范围分别为 0.500 ~ 5.000 μg ( $r=0.9995$ ), 0.075 ~ 0.750 μg ( $r=0.9997$ ), 1.790 ~ 17.900 μg ( $r=0.9999$ ), 0.580 ~ 5.800 μg ( $r=0.9996$ ), 0.065 ~ 0.650 μg ( $r=0.9996$ ), 平均回收率在 94.05% ~ 102.58%, RSD 在 1.6% ~ 2.9%。结论:该方法简单、准确,具有良好的重复性和稳定性,可为老鹳草药材的质量评价提供一定的参考依据。

**[关键词]** 老鹳草; 原儿茶酸; 没食子酸; 柯里拉京; 鞣花酸; 金丝桃苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0026-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060026

## Content Determination on Five Active Ingredients in Five Species Geranii Herba of Liaoning Province

GU Jing-yi<sup>1</sup>, YIN Hai-bo<sup>1\*</sup>, ZHAO Rong<sup>2</sup>, JIA Xiao-qing<sup>2</sup>, SHAO Fei<sup>2</sup>

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

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method to determine the content of protocatechuic acid, gallic acid, corilagin, ellagic acid and hyperoside in Geranii Herba. **Method:** HPLC column Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was eluted with the, mobile phase of 0.1% phosphonic acid-acetonitril in a gradient mode, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wave-length was 280 nm, and the temperature was 30 °C. **Result:** The linear ranges of the 5 ingredients in HPLC were 0.500-5.000 μg ( $r=0.9995$ ), 0.075-0.750 μg ( $r=0.9997$ ), 1.790-17.900 μg ( $r=0.9999$ ), 0.580-5.800 μg ( $r=0.9996$ ), 0.065-0.650 μg ( $r=0.9996$ ), the ranges of average recoveries and RSD were 94.05% -102.58% and 1.6% -2.9%. **Conclusion:** The method is simple and accurate with a high repeatability, which could provide reference for the quality evaluation of Geranii Herba.

**[Key words]** Geranii Herba; protocatechuic acid; gallic acid; corilagin; ellagic acid; hyperoside

老鹳草为我国传统中药,始见于明代兰茂的《滇南本草》<sup>[1]</sup>。老鹳草来源于牻牛儿苗科植物牻牛儿苗、老鹳草或野老鹳草的干燥地上部分,收载于 2010 年版《中国药典》<sup>[2]</sup>。老鹳草的主要化学

成分有鞣质、黄酮类、有机酸、挥发油等,尤以鞣质和黄酮类最为丰富<sup>[3]</sup>,研究表明,鞣质具有抗菌、抗病毒、抗氧化等生物活性<sup>[4]</sup>,黄酮类化合物具有抗病毒、抗炎镇痛、降血糖<sup>[5]</sup>等生物活性。因

**[收稿日期]** 20150406(001)

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金项目(201402004);辽宁中医药大学杏林学者青蓝工程杰出青年基金(50213);中医药行业科研专项(201407002)

**[第一作者]** 谷静逸,在读硕士,从事种质资源鉴定及中药品质评价研究, Tel:13998416927, E-mail:253739680@qq.com

**[通讯作者]** \*尹海波,教授,硕士生导师,从事种质资源鉴定及中药品质评价研究, Tel:0411-87586003, E-mail:yhb0528@sina.com

此,老鹤草的鞣质与黄酮类成分具有很大的研究价值。

我国老鹤草品种繁多、资源丰富,有老鹤草属植物 55 种<sup>[6]</sup>,其中辽宁省内有 7 种<sup>[7]</sup>,分别为北方老鹤草、突节老鹤草、朝鲜老鹤草、块根老鹤草、长白老鹤草、鼠掌老鹤草和老鹤草,其中 2010 年版《中国药典》规定为老鹤草药材的仅有老鹤草 1 种,而市售商品老鹤草药材有不少混用现象。基于此,本文对老鹤草和该属频繁充当老鹤草药材的 4 个品种进行含量测定与比较,为老鹤草的质量评价提供一定的科学方法和参考依据,为老鹤草药源的扩大提供一定的理论依据。

### 1 材料

**1.1 仪器** 1100 型高效液相色谱仪(配置 SPD-10A 紫外检测器,四元低压梯度泵,柱温箱,美国 Agilent),KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),CP225D 型 1/1 万电子天平(德国 Sartorius),HH-S 型水浴锅(予华仪器有限责任公司)。

**1.2 试药** 没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸对照品(批号分别为 110831-2003,2110809-20060,PM0529SA14,091227)均购于中国食品药品检定研究院,金丝桃苷对照品(批号 482-36-0)购于上海源叶生物科技有限公司;乙腈、甲醇和磷酸均为色谱纯,水为重蒸水,其他均为分析纯。

**1.3 药材** 分别收集了老鹤草 *Geranium wilfordii*,鼠掌老鹤草 *G. sibiricum*,块根老鹤草 *G. dahuricum*,突节老鹤草 *G. krameri* 和朝鲜老鹤草 *G. franchetii*。2014 年 7 月—9 月采自辽宁省山区 15 个天然居群,并经本院药用植物教研室尹海波教授鉴定。具体信息见表 1。

### 2 方法和结果

**2.1 色谱条件** AgilentTC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)溶液梯度洗脱(0~10 min,4%~5% A;10~20 min,5%~15% A;20~32 min,15% A;32~40 min,15%~20% A;40~50 min,20%~21% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,进样量 5 μL。在此色谱条件下没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸、金丝桃苷的分离度均 > 1.5,表明各成分分离良好。

**2.2 对照品溶液的制备**<sup>[8-9]</sup> 分别取没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、金丝桃苷适量,精密称定,用甲醇溶解。制成每 1 mL 分别含没食子酸 1.00 mg,原儿

表 1 老鹤草属样品基本信息

Table 1 Basic information of plant materials of *Geranii Herba*

样品	批次	采集地	经纬度	
老鹤草	L-1	本溪市桓仁县	N41°13'20.21"	E125°26'52.43"
	L-2	丹东市宽甸县	N40°38'12.90"	E124°28'62.95"
	L-3	抚顺市清源县	N41°59'20.57"	E125°08'06.83"
鼠掌老鹤草	S-1	鞍山市千山	N41°00'46.86"	E123°07'55.64"
	S-2	本溪市本溪县	N41°15'53.06"	E124°19'52.18"
	S-3	本溪市桓仁县	N41°09'49.46"	E125°31'00.78"
块根老鹤草	K-1	抚顺市新宾县	N41°45'51.48"	E125°01'21.96"
	K-2	抚顺市清源县	N41°55'25.46"	E124°59'08.67"
	K-3	本溪市本溪县	N41°31'08.16"	E123°55'02.11"
突节老鹤草	T-1	抚顺市清源县	N42°07'10.87"	E124°49'08.21"
	T-2	抚顺市清源县	N41°45'51.48"	E125°01'21.96"
	T-3	本溪市桓仁县	N41°16'24.79"	E125°24'23.27"
朝鲜老鹤草	C-1	本溪市桓仁县	N41°08'59.55"	E125°29'30.36"
	C-2	丹东市宽甸县	N40°38'36.92"	E124°29'50.04"
	C-3	丹东市宽甸县	N40°44'31.81"	E124°30'31.81"

茶酸 0.59 mg,柯里拉京 3.58 mg,金丝桃苷 0.26 mg 的混合对照品溶液;另精密称定适量鞣花酸对照品,用二甲基亚砷溶解<sup>[10]</sup>,制成每 1 mL 含鞣花酸 1.45 mg 的对照品溶液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取老鹤草粉末 2 g,分别用水和 75% 乙醇 80 mL 各回流提取 1 次,每次 90 min,合并滤液于蒸发皿中,水浴蒸干,定量转移至 10 mL 量瓶,用甲醇稀释至刻度,备用。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取上述混合对照品溶液 0.5,1,2,3,4,5 mL,分别置 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。将各浓度混合对照品溶液进样 5 μL,以混合对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线;另精密吸取鞣花酸对照品溶液 0.5,1,2,3,4,5 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,用二甲基亚砷稀释至刻度,摇匀,同法绘制鞣花酸的标准曲线。结果见表 2。

表 2 5 种活性成分的线性范围及线性关系

Table 2 Standard curve and relationship of five active composition

成分	回归方程	r	线性范围/μg
没食子酸	$Y = 8\ 508.2X - 314.25$	0.999 5	0.500 ~ 5.000
原儿茶酸	$Y = 6\ 444.3X - 57.213$	0.999 7	0.075 ~ 0.750
柯里拉京	$Y = 5\ 338.4X + 342.58$	0.999 9	1.790 ~ 17.900
鞣花酸	$Y = 7\ 996.4X - 585.33$	0.999 6	0.580 ~ 5.800
金丝桃苷	$Y = 19\ 040X - 34.407$	0.999 6	0.065 ~ 0.650

**2.5 精密度试验** 取混合对照品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,每次进样 5  $\mu\text{L}$ ,计录各峰面积。结果没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 1.0%, 0.4%, 0.2%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批号供试品(老鹤草 L-1)约 2 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备,分别于 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 h 在上述色谱条件下进样,测定各峰面积。结果没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.1%, 0.5%, 0.1%, 0.9%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一批号供试品(突节老鹤草 T-1),平行 6 份,每份约 2 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备,按 2.1 项下色谱条件测定,计算没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸、金丝桃苷的质量分数分别为 8.38, 0.54, 5.00, 3.20, 0.49  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 0.3%, 1.4%, 1.8%, 1.4%, 0.9%, 表明该试验重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取同一批号供试品(朝鲜老鹤草 C-1),平行 6 份,每份约 1 g,精密称定,再分别精密加入一定量的没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,结果见表 3。

**2.9 含量测定** 精密称取粉末 2 g,按 2.3 项下方法制备 5 种老鹤草供试品溶液,进样 5  $\mu\text{L}$  测定。按外标法分别计算样品中 5 个成分的含量,结果见图 1 和表 4。

### 3 讨论

**3.1 提取溶剂的选择** 分别考察了 50% 甲醇<sup>[11]</sup> 回流提取 2 次、水回流提取 2 次<sup>[12]</sup>、75% 乙醇 + 水各回流提取 1 次后混合共 3 种方法。结果表明,同一样品在相同色谱条件下,水提取虽然可使鞣质类成分老鹤草素完全水解,但较 75% 乙醇 + 水提取后混合的样品中没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸和金丝桃苷的含量均略有降低,且 75% 乙醇 + 水提取即可使老鹤草素水解完全;50% 甲醇提取的样品中虽较高水平地保留了老鹤草素,但老鹤草素极易水解,在此条件下也难免存在一定程度的水解,且原儿茶酸的含量极少,因此,本实验选择 75% 乙醇 + 水作为提取溶剂,使老鹤草素水解完全,又可使所检测的各成分尽可能地达到最大值。

**3.2 流动相的选择** 考察了 0.1% 磷酸水-甲醇和

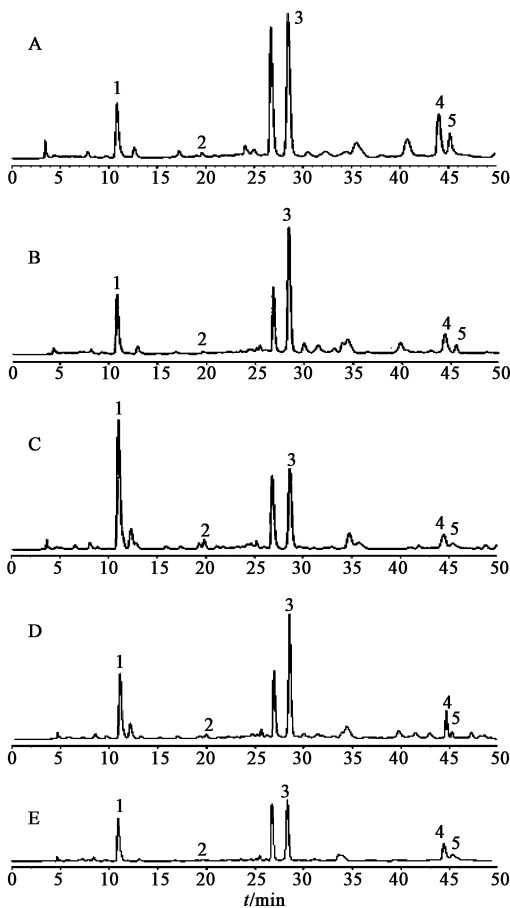
表 3 老鹤草中 5 种成分的加样回收率试验

Table 3 Average recovery of five composition in Geranii Herba

成分	称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
没食子酸	1.005 0	3.324	0.953	4.285	100.84	102.53	2.9
	1.120 3	3.018	1.199	4.298	106.76		
	1.028 2	3.254	0.982	4.280	104.48		
	1.033 5	3.238	1.071	4.294	98.60		
	0.998 1	3.342	0.951	4.300	100.74		
原儿茶酸	1.005 0	0.243	0.105	0.346	98.10	100.48	2.7
	1.120 3	0.226	0.120	0.353	105.83		
	1.028 2	0.240	0.105	0.346	100.95		
	1.033 5	0.241	0.100	0.340	99.00		
	0.998 1	0.252	0.101	0.352	99.01		
柯里拉京	1.005 0	1.696	0.748	2.441	99.60	99.49	2.7
	1.120 3	1.646	0.752	2.411	101.73		
	1.028 2	1.672	0.700	2.397	103.57		
	1.033 5	1.667	0.735	2.387	97.96		
	0.998 1	1.687	0.741	2.402	96.49		
鞣花酸	1.005 0	1.014	0.142	1.145	92.25	94.05	1.6
	1.120 3	0.915	0.141	1.047	93.62		
	1.028 2	0.989	0.155	1.136	94.84		
	1.033 5	0.985	0.160	1.140	96.88		
	0.998 1	1.016	0.142	1.149	93.66		
金丝桃苷	1.005 0	0.165	0.100	0.264	99.00	95.66	2.9
	1.120 3	0.152	0.096	0.241	92.71		
	1.028 2	0.170	0.095	0.263	97.89		
	1.033 5	0.156	0.100	0.248	92.93		
	0.998 1	0.179	0.100	0.276	97.00		
1.080 1	0.157	0.091	0.242	93.41			

0.1% 磷酸水-乙腈 2 种流动相系统,其中 0.1% 磷酸水-乙腈系统的色谱峰分离度较好,柱压较低,几乎无基线漂移现象,因此,确定 0.1% 磷酸水-乙腈系统为本文流动相体系。

**3.3 含量的比较** 测定结果表明,不同种老鹤草各成分含量有较大差异,所测 5 种活性成分均以老鹤草为最高,其次为鼠掌老鹤草,突节老鹤草的酚酸类



A. 老鹤草; B. 鼠掌老鹤草; C. 块根老鹤草; D. 突节老鹤草; E. 朝鲜老鹤草; 1. 没食子酸; 2. 原儿茶酸; 3. 柯里拉京; 4. 鞣花酸; 5. 金丝桃苷

图 1 5 种老鹤草样品的 HPLC

Fig. 1 HPLC of five species of Geranii Herba sample

表 4 15 份老鹤草 5 种成分含量测定

Table 4 Five composition determination on 15 samples of Geranii

Herba		mg·g <sup>-1</sup>				
样品名称	批号	没食子酸	原儿茶酸	柯里拉京	鞣花酸	金丝桃苷
老鹤草	L-1	4.51	0.45	11.37	3.27	0.97
	L-2	5.08	0.41	18.72	3.08	0.79
	L-3	4.74	0.39	11.98	1.92	0.49
鼠掌老鹤草	S-1	3.11	0.21	7.01	1.82	0.56
	S-2	5.18	0.21	16.57	3.39	0.79
	S-3	4.09	0.27	10.42	2.23	0.56
块根老鹤草	K-1	9.52	0.56	11.52	1.91	0.48
	K-2	2.60	0.25	6.38	1.98	0.45
	K-3	1.79	0.40	8.66	1.57	0.55
突节老鹤草	T-1	4.12	0.27	7.77	2.08	0.47
	T-2	4.92	0.37	13.41	2.53	0.47
	T-3	5.40	0.35	11.12	2.07	0.47
朝鲜老鹤草	C-1	3.14	0.20	4.04	1.65	0.16
	C-2	5.77	0.45	9.36	2.06	0.33
	C-3	2.69	0.13	5.40	2.10	0.30

成分与鼠掌老鹤草含量相当,而朝鲜老鹤草中各成分含量为最低。因鼠掌老鹤草与突节老鹤草资源相对丰富,结合本实验研究,建议可把该 2 种老鹤草作为老鹤草药材的代用品供研究参考。与此同时,本实验进一步完善了老鹤草药材的质量评价系统,亦为该药材的质量评价提供一定的参考依据。

[参考文献]

[1] 刘娟,王良信.老鹤草的本草考证[J].中草药,1992,23(5):276-277.  
 [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:113.  
 [3] 雷志勇,刘岱琳,胡迎庆,等.老鹤草的化学成分及药理研究进展[J].中药材,2002,25(10):759-761.  
 [4] 吴悦涛,金哲雄.老鹤草中鞣质类化学成分及其药理活性研究进展[J].黑龙江医药,2008,21(1):67-68.  
 [5] 胡迎庆,刘岱琳,周运筹,等.老鹤草的抗炎、镇痛活性研究[J].西北药学杂志,2003,18(3):113-115.  
 [6] 中国植物志编委会.中国植物志.43卷.第1册[M].北京:科学出版社,2004:23-26.  
 [7] 李书心.辽宁植物志.上册[M].沈阳:辽宁省科学技术出版社,1988:1000-1003.  
 [8] 罗宏,尹海波.HPLC同时测定鼠掌老鹤草中5种活性成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):83-86.  
 [9] 谢松,宋良科,万军.HPLC法测定草原老鹤草中莽草酸和没食子酸[J].中成药,2014,36(12):2554-2556.  
 [10] 赵晓雨,尹海波.RP-HPLC同时测定牻牛儿苗中4种酚酸类活性成分含量[J].中国中药杂志,2011,36(22):3137-3140.  
 [11] 王强,钱春花,孙治明,等.HPLC测定乌贝益胃胶囊中5种蒽醌类衍生物的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):95-98.  
 [12] 许敏,陈颖,段素敏,等.HPLC法测定3种老鹤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):39-41.

[责任编辑 顾雪竹]