

[10] 陈 银, 杨 凡, 敖 慧, 等. 美花圆叶筋骨草的化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3475-3479.

[11] 赵 明, 赵英楠, 李 军, 等. 白桦树皮化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4117-4123.

[12] 周 健, 冷爱晶, 顾晓华, 等. 竹叶柴胡中一个新的聚炔类化合物[J]. 中药材, 2022, 45(1): 78-83.

[13] 白岩松, 池 军, 张玲霞, 等. 丁香茄叶乙酸乙酯部位化学成分及抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(12): 2011-2018.

[14] 尹 凯, 高慧媛, 李行诺, 等. 皱皮木瓜的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(12): 760.

[15] Osamu T, Shizuko S, Shukuo K. 3-Oxykojic acid, a new γ -pyrone formed by gluconobacter[J]. *Agri Biol Chem*, 2014, 25(10): 802-803.

[16] 杨 瑶, 曾贵俊, 黄玉平, 等. 羊角拗的化学成分羊角[J]. 云南师范大学学报 (自然科学版), 2022, 42(2): 56-60.

[17] 韩国忠. 蒙古莢繁育与栽培技术[J]. 山西水土保持科技, 2020(3): 47-48.

[18] 纪若璇, 于 笑, 常 远, 等. 蒙古莢叶片解剖结构的地理种源变异及其对环境变化响应的意义[J]. 植物生态学报, 2020, 44(3): 277-286.

[19] 白雪卡, 刘 超, 纪若璇, 等. 蒙古莢叶片解剖结构的地理种源变异及其对环境变化响应的意义[J]. 生态学报, 2018, 38(23): 8425-8433.

蓝布正 HPLC 指纹图谱建立及 8 种成分测定

杨 钊, 高 欢, 周浩明, 李佳佳, 乐世俊*, 唐于平*
(陕西中医药大学, 陕西省中医药管理局中药配伍重点研究室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 建立蓝布正 *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle HPLC 指纹图谱, 并测定没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸的含量。**方法** 蓝布正的分析采用 Waters XSelect HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm。**结果** 10 批样品指纹图谱中有 18 个共有峰, 相似度均大于 0.963。8 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r\geq 0.999\ 1$), 平均加样回收率 82.87%~106.14%, RSD 0.52%~4.18%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于蓝布正的质量控制。

关键词: 蓝布正; HPLC 指纹图谱; 化学成分

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0123-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.023

Establishment of HPLC fingerprints for *Geum japonicum* var. *chinense* and determination of eight constituents

YANG Zhao, GAO Huan, ZHOU Hao-ming, LI Jia-jia, YUE Shi-jun*, TANG Yu-ping*
(Shaanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory for TCM Compatibility, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

KEY WORDS: *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle; HPLC fingerprints; chemical constituents

蓝布正为蔷薇科植物柔毛路边青 *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle 的干燥全草, 具有益气健脾、补血养阴、润肺化痰的功效^[1], 用于治疗头痛头晕、虚弱无力、月经不调等症^[2],

收稿日期: 2022-06-16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711000); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL10)

作者简介: 杨 钊 (1998—), 男, 硕士生, 从事中药化学研究。Tel: 18142414767, E-mail: yz2295914303@163.com

* 通信作者: 乐世俊 (1989—), 男, 副教授, 从事中药功效物质基础及作用机制研究。Tel: 18691074781, E-mail: shijun_yue@163.com

唐于平 (1970—), 男, 教授, 从事中药药效物质及配伍关系研究。Tel: (029) 38185183, E-mail: yupingtang@sntcm.edu.cn

其主要成分包括多酚类、三萜类、木脂素类、黄酮类等^[3-6],具有抗氧化、抗炎、降糖、抗高血压、抗心肌缺血等活性^[7-11]。2020 年版《中国药典》规定,蓝布正含量测定的指标成分为没食子酸,但该植物中多酚组成复杂多样^[12-13],仅测定单一成分全面无法反映其特征^[14-17],并且目前尚无其定量分析报道^[18]。因此,本研究建立蓝布正 HPLC 指纹图谱,并测定没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸的含量,以期为该植物质量标准提升和后续开发应用提供参考。

1 材料

Waters e2695 高效液相色谱仪,配置 2998 PDA 检测器(美国 Waters 公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW177 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质对照品均为课题组前期从蓝布正中提取纯化所得,纯度均≥95%;没食子酸(批号 C1309C72105)、鞣花酸(批号 S24D11G135548)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均≥98%。甲醇为色谱纯(美国 Honeywell 公司);无水乙醇、磷酸为分析纯(天津科密欧化学试剂有限公司);水为超纯水。

蓝布正购自铜陵禾田中药饮片有限公司,经陕西中医药大学白吉庆副教授鉴定为柔毛路边青 *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle. 的干燥全草,具体见表 1。

表 1 样品信息

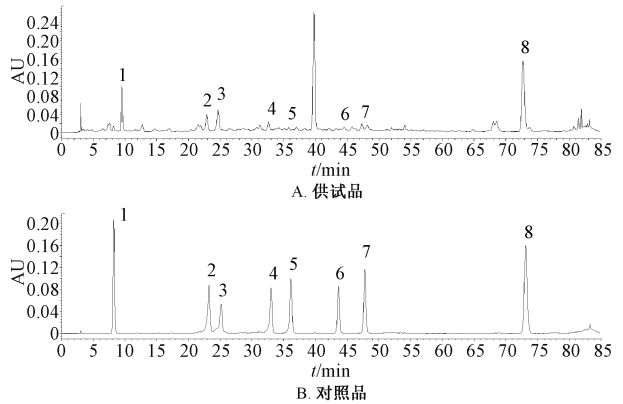
Tab. 1 Information of samples

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	福建	20190810	S6	湖北	20190312
S2	福建	20190310	S7	浙江	20181014
S3	湖北	20190601	S8	浙江	20190312
S4	湖北	20190618	S9	广东	20190316
S5	湖北	20190812	S10	广东	20190812

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XSelect HSS T3 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸(B),梯度洗脱(0~46 min, 10%~29% A; 46~50 min, 29%~35% A; 50~70 min, 35%~37.5% A; 70~75 min, 37.5% A; 75~80 min, 37.5%~60% A; 80~85 min, 60%~10% A);

体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 254 nm;进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1. 没食子酸 2. 大麻黄鞣宁 3. 二聚鞣花鞣质 G 4. 二聚鞣花鞣质 C 5. 木麻黄鞣亭 6. 特马里素 II 7. 蛇含鞣质 8. 鞣花酸
1. gallic acid 2. casuarinin 3. gemin G 4. gemin C 5. casuarietin 6. tellimagrandin II 7. potentillin 8. ellagic acid

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 供试品溶液制备 蓝布正粉碎后过 3 号筛,取粉末约 1 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,精密加入 75% 甲醇 25 mL,超声处理 20 min,放冷,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸对照品适量,置于量瓶中,加甲醇制成各成分质量浓度均为 125 μg/mL 的溶液,即得,在 4 ℃ 下保存。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液适量,甲醇依次稀释至 3.906 25、7.812 5、15.625、31.25、62.5、125 μg/mL,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行回归,结果见表 2,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
没食子酸	Y=25 728X-11 993	0.999 9	3.9~125
大麻黄鞣宁	Y=19 207X-36 554	0.999 4	3.9~125
二聚鞣花鞣质 G	Y=11 673X-23 662	0.999 1	3.9~125
二聚鞣花鞣质 C	Y=17 071X-20 142	0.999 7	3.9~125
木麻黄鞣亭	Y=19 699X-25 789	0.999 5	3.9~125
特马里素 II	Y=20 788X-12 439	0.999 9	3.9~125
蛇含鞣质	Y=14 989X-9 635.9	0.999 9	3.9~125
鞣花酸	Y=41 985X-21 594	0.999 6	3.9~125

2.4.2 精密度试验 取同一份药材 (S3) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 1.07%、2.04%、2.80%、1.98%、3.62%、0.93%、0.22%、0.51%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一份药材 (S3) 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 1.55%、1.77%、1.26%、3.73%、1.15%、3.83%、1.07%、1.81%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份药材 (S3) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸峰面积 RSD 分别为 2.78%、3.86%、4.61%、1.71%、3.91%、1.22%、2.82%、0.69%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取同一份药材 (S3) 0.5 g, 按 100% 水平加入适量对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸平均加样回收率分别为 103.06%、90.25%、88.08%、96.06%、106.14%、82.87%、101.17%、97.45%, RSD 分别为 0.83%、0.99%、2.04%、0.52%、2.09%、1.72%、4.18%、0.63%。

表 4 各成分含量测定结果 (mg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents (mg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)								
编号	没食子酸	大麻黄鞣宁	二聚鞣花鞣质 G	二聚鞣花鞣质 C	木麻黄鞣亭	特马里素 II	蛇含鞣质	鞣花酸
S1	0.129 8±0.016 7	1.153 8±0.020 0	2.327 7±0.004 0	0.644 7±0.013 6	0.187 2±0.000 3	0.430 7±0.014 2	0.175 1±0.001 2	2.827 4±0.016 7
S2	0.129 9±0.001 1	1.109 1±0.052 0	2.601 3±0.007 4	0.695 5±0.003 9	0.207 4±0.001 4	0.502 0±0.001 2	0.203 3±0.002 1	2.786 2±0.008 4
S3	0.120 2±0.001 1	0.867 4±0.005 3	1.795 9±0.015 8	0.487 1±0.001 0	0.144 2±0.001 3	0.291 3±0.001 9	0.117 2±0.004 0	2.120 7±0.002 3
S4	0.141 7±0.022 3	1.553 1±0.033 4	2.914 4±0.023 4	0.751 1±0.000 8	0.216 2±0.000 8	0.463 8±0.001 0	0.190 8±0.000 6	3.228 8±0.003 1
S5	0.128 0±0.026 8	1.228 0±0.003 0	2.399 9±0.009 2	0.627 7±0.001 2	0.190 8±0.000 3	0.416 2±0.002 9	0.161 9±0.001 1	2.536 5±0.008 0
S6	0.130 2±0.000 7	1.111 4±0.011 1	2.748 2±0.245 2	0.739 6±0.003 6	0.196 8±0.001 4	0.512 8±0.002 5	0.189 7±0.000 6	3.055 9±0.004 1
S7	0.167 6±0.013 0	1.195 8±0.001 7	2.729 3±0.000 5	0.697 6±0.002 5	0.180 4±0.002 1	0.414 8±0.001 1	0.162 3±0.000 8	2.803 0±0.008 5
S8	0.151 5±0.018 6	1.210 3±0.023 6	2.802 9±0.009 0	0.724 1±0.002 6	0.197 3±0.001 8	0.456 5±0.007 5	0.162 9±0.000 4	3.035 5±0.003 7
S9	0.126 6±0.016 6	1.048 9±0.019 8	2.407 5±0.014 2	0.629 8±0.000 7	0.183 9±0.000 8	0.403 9±0.013 9	0.157 4±0.002 0	2.506 9±0.003 7
S10	0.152 4±0.017 8	1.323 5±0.019 0	2.598 7±0.002 7	0.694 6±0.001 4	0.186 7±0.003 4	0.415 5±0.017 4	0.175 1±0.002 1	2.701 8±0.010 2

2.5 HPLC 指纹图谱建立及相似度评价 取 10 批样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 记录色谱图, 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)”进行分析, 见图 2, 共标定 18 个共有峰, 经多点校正后采用 Mark 峰匹配, 指认出其中 8 个峰, 分别为没食子酸 (峰 1)、大麻黄鞣宁 (峰 2)、二聚鞣花鞣质 G (峰 3)、二聚鞣花鞣质 C (峰 4)、木麻黄鞣亭 (峰 5)、特马里素 II (峰 6)、蛇含鞣质 (峰 7)、鞣花酸 (峰 8)。再以对照图谱 R 为参照计算相似度, 结果见表 3, 可知均大于 0.963, 表明不同产地药材具有很高的相关性。

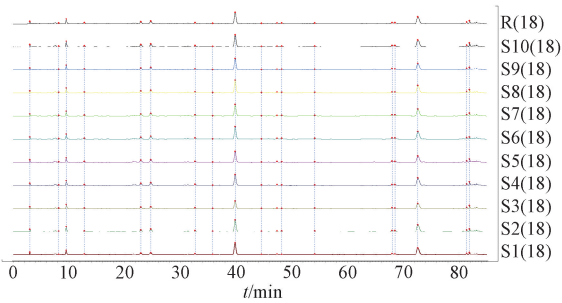


图 2 10 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints for ten batches of samples

表 3 10 批样品相似度

Tab. 3 Similarities of ten batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.995	S6	0.993
S2	0.995	S7	0.996
S3	0.963	S8	0.998
S4	0.971	S9	0.995
S5	0.997	S10	0.994

2.6 样品含量测定 取 10 批样品, 每批 3 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 色谱条件考察 本实验考察了不同流动相（甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸）、柱温（25、30 ℃）、色谱柱（Waters Sunfire C₁₈、Waters XSelect HSS T3 C₁₈）下各成分的分离情况，发现在 Waters XSelect HSS T3 C₁₈ 色谱柱、柱温 30 ℃、流动相甲醇-0.1% 磷酸条件下梯度洗脱时各成分分离度较好，色谱峰响应较高。另外，在 254 nm 波长处各成分色谱峰出峰较多，最大吸收波长均在附近，并且所反映的成分信息更全面，基线峰平稳，故选择其作为检测波长。

3.2 相似度分析 不同产地 10 批蓝布正相似度较高，成分组成一致性良好。

3.3 含量分析 不同产地蓝布正各成分含量有一定差异，具体原因需作进一步研究。

4 结论

本研究建立蓝布正 HPLC 指纹图谱，并测定没食子酸、大麻黄鞣宁、二聚鞣花鞣质 G、二聚鞣花鞣质 C、木麻黄鞣亭、特马里素 II、蛇含鞣质、鞣花酸的含量，该方法精密度、重复性、稳定性良好，可更全面地反映该药材所含多酚的特征，为其质量标准提升和后续开发应用提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：364-365.

[2] 陶 薇，王 凯，王金凤，等. 民族药蓝布正化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药，2018，49(1)：233-238.

[3] Granica S, Kłębowska A, Kosiński M, *et al.* Effects of *Geum urbanum* L. root extracts and its constituents on polymorphonuclear leucocytes functions significance in periodontal diseases[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 1-12.

[4] 李建宽，刘宏伟，王乃利，等. 柔毛水杨梅化学成分研究（II）[J]. 中国药物化学杂志，2009，19(2)：135-139.

[5] Cheng X, Qin J, Zeng Q, *et al.* Taraxasterane-type triterpene

and neolignans from *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* F. Bolle[J]. *Planta Med*, 2011, 77(18)：2061-2065.

[6] 王莉宁，徐必学，林华容，等. 蓝布正化学成分的研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(4)：798-799.

[7] Liu H, Li J, Zhao W, *et al.* Fatty acid synthase inhibitors from *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* [J]. *Chem Biodivers*, 2009, 6(3)：402-410.

[8] 王 丽，张茜婷. 云实感冒合剂药效试验研究分析[J]. 临床医药文献电子杂志，2016，3(52)：10288-10289.

[9] 洪小凤，王永松，高 扬，等. 蓝布正总提取物对高血糖动物降血糖作用的研究[J]. 大理学院学报，2007，6(10)：7-9.

[10] Xie Y W, Xu H X, Dong H, *et al.* Role of nitric oxide in the vasorelaxant and hypotensive effects of extracts and purified polyphenols from *Geum japonicum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109(1)：128-133.

[11] Cheung W L, Cheng L, Liu H, *et al.* The dual actions of angiogenesis and anti-apoptosis induced by an isolated fraction from *Geum japonicum* repair muscle ischemia[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459(1)：91-97.

[12] 段灿灿，杨 沙，刘 方，等. 蓝布正中总鞣质、游离没食子酸及鞣花酸的含量测定[J]. 中药新药与临床药理，2019，30(8)：965-969.

[13] 李 刚. 草本水杨梅中鞣质类化合物的结构鉴定[D]. 长春：吉林大学，2006.

[14] 王 育，陈 勇，杨胜玉. HPLC 测定益肝除湿合剂中的没食子酸[J]. 华西药学杂志，2017，32(5)：538-539.

[15] 谈利红，欧 洪，王江瑞. 基于 HPLC 特征图谱及化学计量学的苗药云实感冒合剂质量评价研究[J]. 中国药师，2021，24(10)：1811-1816.

[16] 詹十音. RP-HPLC 同时测定不同产地路边青药材中 4 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22(14)：98-101.

[17] 何 迅，王 正，王爱民，等. 贵州苗药蓝布正的指纹图谱及其主要成分鞣花酸含量测定[J]. 中国新药杂志，2015，24(5)：584-587；591.

[18] 赵茹茹，张建永，周旭美. 苗药蓝布正的化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J]. 遵义医学院学报，2017，40(5)：568-578.