

## · 综述 ·

## 定量核磁共振技术在中药分析中的应用进展

林珊<sup>1</sup>, 苏娟<sup>2</sup>, 叶粟<sup>2</sup>, 曹邦静<sup>3</sup>, 张卫东<sup>2</sup> (1. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350108; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 江西中医学院, 江西南昌 330004)

**[摘要]** 目的 综述定量核磁共振(quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR)技术的基本原理,以及近10年来qNMR在中药分析领域的应用。方法 分析并综述10年内国内外有关定量核磁共振技术在中药分析应用的文献。结果 qNMR作为一种定量分析方法,专属性强、准确快捷。结论 qNMR技术可用于中药分析的诸多环节,如中药质量控制、中药活性成分体内定量分析等。

**[关键词]** 定量核磁共振; 中药分析

**[中图分类号]** R917.0657.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2014)02-0092-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.02.004

## Application progress in quantitative NMR in analysis of traditional Chinese medicine

LIN Shan<sup>1</sup>, SU Juan<sup>2</sup>, YE Ji<sup>2</sup>, CAO Bangjing<sup>3</sup>, ZHANG Weidong<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Fujian Traditional Chinese Medicine University, Fuzhou 350108, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Jiangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective** To review the principle of qNMR and applications progress in traditional Chinese medicine (TCM) analysis in recent ten years. **Methods** Literatures in recent ten years which concerning the application of qNMR technology in TCM analysis were reviewed. **Results** qNMR had high specificity and accuracy as a well-developed quantitative analysis method. **Conclusion** The qNMR had been used in many fields of TCM analysis, such as quality control, purity detection, quantification of active ingredients *in vivo*, and so on.

**[Key words]** quantitative NMR; traditional Chinese medicine analysis

核磁共振技术广泛应用于中药成分的结构解析,基于核磁共振的定量分析方法——定量核磁共振(quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR)技术作为一种日益成熟的仪器分析方法,具有快速、简便、准确、专属性高的特点,与其他分析方法相比,具有以下优势<sup>[1]</sup>:核质子信号强度与数目成正比,与化学性质无关,适用于多数化合物;利用内标法或相对测量法,定量时无须该化合物的纯品作为对照标准;信号峰的宽度窄,远小于各信号之间的化学位移的差值,不同组分的信号之间很少发生重叠;不破坏被测样品。因此,qNMR是一种用于中药分析的重要方法。

本文综述了qNMR技术的原理、方法及其近10年来在中药分析中的应用。

## 1 qNMR 原理

从一张核磁共振图谱中,可以得到下列重要数据:化学位移、偶合常数和共振峰面积。化学位移和偶合常数是结构测定的重要参数,而共振峰面积(或峰高)则是定量分析的重要参数。在核磁共振技术(NMR)中,共振峰面积或峰高与产生该共振峰的质子数成正比,这是定量的依据。

NMR定量分析是通过比较特定的吸收峰强度实现的,只要样品中每个组分有1个或1组互不重叠的特征吸收峰,都有可能用NMR波谱法进行定量分析,但选定进行定量积分的信号归属必须是已知的<sup>[2]</sup>。NMR波谱用于定量分析的基础是各化学环境不同的粒子吸收峰面积只与所包含的粒子数有关<sup>[3]</sup>。故不需引进任何校正因子或绘制工作曲线,就可直接根据各共振峰的积分值推算所代表的自旋核数量<sup>[4-5]</sup>。目前主要采用的定量方法有:

**1.1 内标法** 又称绝对测量法<sup>[6]</sup>,是NMR定量分析中最常用的方法。至少需要知道被测物的分子

**[作者简介]** 林珊,女,硕士研究生。Tel: 18019100383, E-mail: 328013541@qq.com.

**[通讯作者]** 张卫东。Tel: (021) 81871244, E-mail: wdzhangy@hotmail.com.

量、选定进行定量积分的信号及产生该信号的质子数。实验时,在样品溶液中直接加入一定量的内标物质后,进行NMR波谱测定。样品的绝对质量 $W_s$ 可由(1)式求得:

$$W_s(\%) = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_i}{(A_i/n_i) \times M_i \times m_s} W_i \times 100\% \quad (1)$$

其中, $A_s$ 为被测样品定量峰的积分面积, $n_s$ 为被测样品定量峰包含的质子数, $M_s$ 为被测样品的分子质量, $A_i$ 为内标物质定量峰的积分面积, $n_i$ 为内标物质定量峰包含的质子数, $M_i$ 为内标物质的相对分子质量, $m_i$ 为称取的内标质量, $W_i$ 为内标的质量百分含量, $m_s$ 为样品质量。

此方法中内标的作用不同于常规分析方法。常规分析方法中,内标的作用是减少操作误差,而此方法中,内标是定量的依据。内标的选择考虑以下4个方面:①最好产生单一共振峰,在扫描磁场区域中,内标共振峰和样品共振峰的位置至少有30 Hz的间隔;②能溶于分析溶剂;③有尽可能小的质子摩尔(质子摩尔=样品的分子量/产生该共振峰的基团中的质子数);④不应与样品中任何组分发生相互作用。

常用内标有硅烷类[如四甲基硅烷(TMS)、三甲基硅基)丙酸钠-2,2,3,3-D4(TSP)]、芳环类(如1,4-二硝基苯、香豆素、苯甲酸)、简单烷烃类(如3,4-二硝基甲苯、苯甲酸苄酯、马来酸)以及其他化合物(如L-亮氨酸、异烟酰胺、咖啡因)。

**1.2 外标法<sup>[7]</sup>** 将某组分的标准品制成一系列不同浓度的标准液,进行NMR测定。以所得图谱中某一指定基团上质子引起的峰面积对浓度作图,得标准曲线,再在平行条件下测得样品溶液中该指定基团上质子的峰面积,代入标准曲线即得样品溶液浓度。

**1.3 相对测量法** 当不能获得样品纯品或者合适的内标时,可选用此法。此方法适用于含有1~2种杂质的样品分析。先计算出样品指定基团上一个质子引起的吸收峰面积( $A_1/n_1$ )和杂质指定基团上一个质子引起的吸收峰面积( $A_2/n_2$ ),再按(2)式计算样品的相对百分含量:

$$\text{相对百分含量} = \frac{A_1/n_1}{A_1/n_1 + A_2/n_2} \times 100\% \quad (2)$$

## 2 qNMR技术在中药分析中的应用进展

中药成分的复杂性受品种、产地、栽培、生长环境和采收季节等多种因素的影响。目前,用于中药成分分析最常用的方法是高效液相色谱法(HPLC)。但HPLC法有以下不足:分析时间长、分离效率低;因色

谱柱被污染造成色谱柱使用寿命缩短;色谱柱上沉积的污染物,常以杂质峰的形式出现;对于含极性成分较多的中药,其“指纹”的特征不强。近年来,国、内外研究者在尝试采用其他方法进行中药材分析研究,qNMR技术已成为中药质量控制、中药活性成分体内定量分析等的重要方法之一。

**2.1 纯度分析** 李建发<sup>[8]</sup>以吡嗪作为内标物,采用qNMR法对葛根素(1)标准品的含量进行测定。准确称取葛根素样品以及内标物吡嗪的量,两者比值约为12,加入氘代二甲基亚砜(DMSO)溶解样品并定容。分别取约0.5 ml配制好的样品溶液加入核磁管中,放入核磁磁体中,采集<sup>1</sup>H-NMR峰谱图,见图1。各峰面积截取值见表1。吡嗪特征峰的化学位移是 $\delta = 8.664$ ,面积积分值设定为1。 $C_7$ -H、 $C_4$ -H、 $C_{11,15}$ -H、 $C_3$ -H、 $C_{12,14}$ -H峰面积积分值分别记为 $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$ 、 $A_5$ 。根据公式(1)计算的葛根素含量分别为 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ ,见表2。根据表2, $C_1$ 和 $C_2$ 的5次值的平均值比较接近葛根素样品的真实含量96%,相对标准偏差(RSD) < 1%。因此,应以 $C_7$ -H或 $C_4$ -H的峰面积积分值计算葛根素的含量。同样,李建发<sup>[9]</sup>也采用该方法测定了橙皮苷(2)标准品的含量。

表1 吡嗪峰与葛根素特征峰面积截取值

吡嗪	$C_7$ -H	$C_4$ -H	$C_{11,15}$ -H	$C_3$ -H	$C_{12,14}$ -H
0.105	0.116	0.128	0.111	0.089	0.091

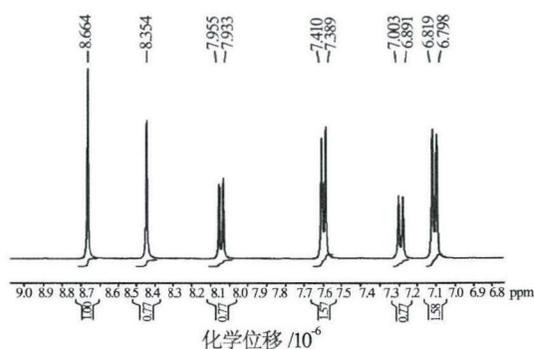


图1 吡嗪峰与葛根素特征峰谱图

表2 葛根素百分含量计算结果(%)

实验次数	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$C_5$
1	95.71	95.94	96.54	96.60	96.81
2	96.40	96.49	97.11	98.45	97.45
3	96.45	96.59	97.83	98.45	97.45
4	96.70	96.39	97.77	95.75	98.46
5	95.00	95.18	95.90	95.69	95.46
平均值	96.05	96.12	97.03	97.19	97.13
RSD(%)	0.72	0.60	0.85	1.26	1.14

Jaki 等<sup>[10]</sup>采用 qNMR 法测定具有抗结核作用的熊果酸纯度,并在此基础上提出了基于天然药物纯度与活性关系的纯度-药效关系(PARs)理论。薛松等<sup>[11]</sup>采用 qNMR 法确定繁茂膜海绵中分离得到的结构类似的类固醇化合物纯度,这种方法为鉴定分析组成复杂而性质相近的天然类固醇化合物提供了新思路。

**2.2 中药鉴定** 中药材由于其生长环境、采收季节、加工方法和贮存条件不同,其所含化学成分、质量以及临床疗效也有很大差异。qNMR 技术在鉴定中药品种和基源等方面发挥了关键作用。

Gang 等<sup>[12]</sup>采用 qNMR 法测定不同品种的黄连,如黄连 *Coptis chinensis* Franch、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* (C. Y. Cheng et al) Hsiao 和云连 *Coptis teeta* Wall 中 6 种原小檗碱类生物碱含量。结果发现,除云连不含表小檗碱外,其他黄连样品中几乎都含 6 种生物碱,所有样品中小檗碱含量最高。6 种生物碱的含量分别是:小檗碱(3) 30.27 ~ 90.40 mg/g,巴马丁(4) 3.77 ~ 23.62 mg/g,表小檗碱(5) 含量(0 ~ 15.96 mg/g),古伦朴根碱(6) 3.59 ~ 9.73 mg/g,黄连碱(7) 8.95 ~ 29.01 mg/g,非洲防己碱(8) 1.04 ~ 6.20 mg/g。结果表明,不同基源黄连中,6 种原小檗碱类生物碱含量差异甚大。Kang<sup>[13]</sup>采用 qNMR 法分析植物代谢产物以区分中国和韩国两产地的人参根粉末。同时,He<sup>[14]</sup>用 qNMR 法分析灵芝(*Ganoderma lucidum*)代谢产物,从而鉴定中国产和韩国产的灵芝。

江洪波等<sup>[15]</sup>采用 qNMR 技术,以标准麦门冬为参照,测定产地为绵阳的优质新麦门冬、陈年麦门冬、硫熏麦门冬等中的主要化学成分含量。结果表明,不同品种、不同产地、不同年份、不同炮制方法得到的麦门冬,其化学成分的种类和相对含量存在明显差异。

**2.3 中药活性成分的含量测定** 中药的药效往往是多种活性成分共同作用的结果,确定其各活性成分的含量是中药药效物质基础研究的前提。近年来,qNMR 技术迅速发展为测定中药活性成分含量开辟了一条新道路。

Li 等<sup>[16]</sup>采用 qNMR 法快速测定中药黄柏(关黄柏 *Phellodendron amurense*,川黄柏 *Phellodendron chinense*)及其复方制剂中原小檗碱类生物碱——小檗碱(3)和巴马丁(4)的含量。结果显示,在  $\delta = 8.6 \sim 8.9$  的范围内,小檗碱和巴马丁的 H-13 信号与甲醇-d<sub>4</sub> 信号完全分离。关黄柏中小檗碱和巴马丁的回收率范围在 95% ~ 106%,检测限和定量限分别是 1.0  $\mu\text{g/ml}$  和 1.8  $\mu\text{g/ml}$ 。4 家公司生产的中

药复方中,小檗碱的含量不同且均不含巴马丁。此外,Li 等<sup>[17]</sup>分别采用 qNMR 法和 HPLC 法测定喜树根中喜树碱及其衍生物的含量,2 种方法的相关系数均 > 0.999。采用 qNMR 法时,在  $\delta = 5.5 \sim 9.5$  范围内,葫芦巴碱(9)的 H-2 信号、喜树碱(10)的 H-7 信号、9-甲氧基喜树碱(11)的 H-10 信号和短小蛇根草苷(12)的 H-19 信号完全分离。4 种化合物的回收率分别是:葫芦巴碱(97.1  $\pm$  1.2)%、喜树碱(98.4  $\pm$  2.8)%、9-甲氧基喜树碱(97.3  $\pm$  3.1)%、短小蛇根草苷(96.8  $\pm$  2.5)% (图 2)。与 HPLC 法相比,qNMR 法在绘制标准曲线时无须标准品,可用粗提物直接定量。

二萜类化合物穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和新穿心莲内酯是穿心莲抗炎、抗病毒作用的主要成分。Yang 等<sup>[18]</sup>采用 qNMR 技术测定 3 种中药制剂的二萜类含量。脱水穿心莲内酯(13)是 3 种穿心莲制剂的主要化合物,穿心莲内酯在消炎利胆片和妇科千金片中未被检测到。Liu 等<sup>[19]</sup>采用 qNMR 法比较不同产地的黄花蒿样品,并与液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术、高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)和薄层色谱法(TLC)的结果相比较。结果显示,qNMR 法与 HPLC-ELSD 法的结果几乎一致,与 LC-MS 法的结果较接近,与 TLC 法的结果差异在 -0.5 ~ 3.2 mg/g 范围内。该研究证明 qNMR 法可准确用于定量黄花蒿样品。

**2.4 中药活性成分体内定量分析** 在进行中药活性成分体内药动学和有效性研究时,需要测定生物样品中的中药活性成分或其代谢物的含量,生物样品中原形药物及其代谢物浓度通常很低,而且存在内源性干扰物。目前,体内原形药物及代谢物分析常采用 LC-MS 法,它只能对结构相近的代谢物提供有限的结构信息<sup>[20]</sup>;而 qNMR 法具有简便性、高分辨率和多目标性,且不破坏化合物结构,可提供比 LC-MS 法更多的结构信息<sup>[21]</sup>。

Moazzami 等<sup>[22]</sup>采用 qNMR 法测定芝麻脂素在人体内的代谢物——儿茶酚的含量。6 名受试者口服芝麻脂素后采集尿样,在尿样中加入  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶及硫酸酯酶,以氯仿提取,以芝麻脂素代谢物中  $\delta = 5.91$  的单峰为定量峰,对提取液中的儿茶酚进行 qNMR 法测定。对于待测组分含量极低的生物样品,可先对样品在体外温孵,使其中的药物代谢继续进行,直至其代谢物(待测组分)含量达到微克水平,然后通过固相萃取(SPE)法或色谱法从温孵产物中分离、富集足量的待测组分,最后应用 qNMR 法测定。

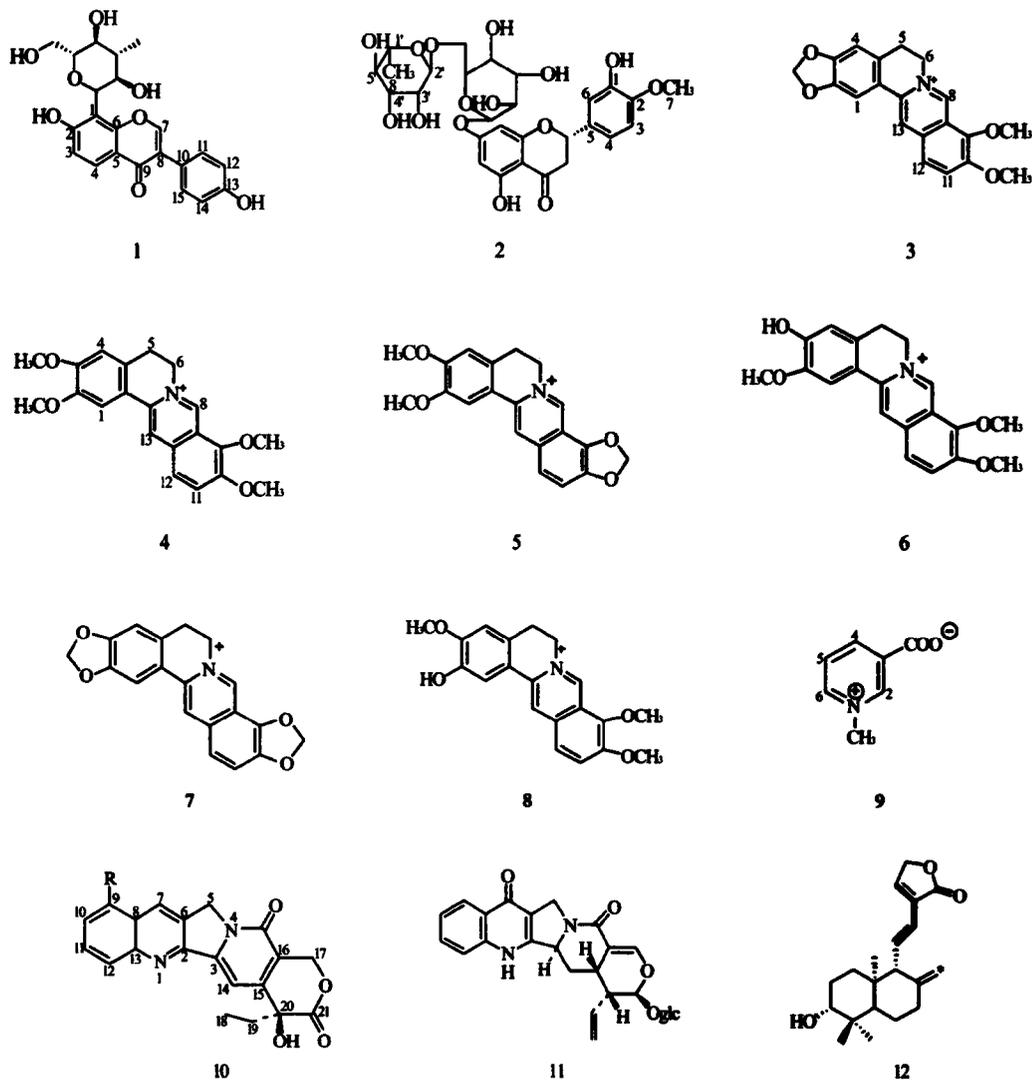


图2 13种中药成分的化学结构

R = H 喜树碱; R = OMe; 9-甲氧基喜树碱

### 3 结语

qNMR 技术的优势在于:分析快速、样品制备方法简单、无须高纯标准品,且杂质干扰少,无须分离精密度就能满足要求;在体内定量分析中,操作简便、分辨率高且具有多目标性。然而,qNMR 技术还存在着分析成本高、灵敏度低等问题。研究人员通过不断尝试,已提出一些改进方案。作者相信随着 qNMR 技术在中药分析领域应用的不断深入,一定能为中药分析开拓新思路和新方法。

### 【参考文献】

- [1] 孙静霞,张正行. NMR 在药物定量分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 117-122.
- [2] Suter D, Mahesh TS. Spins as qubits: quantum information processing by nuclear magnetic resonance[J]. Chem Phys, 2008, 128(5): 1-14.
- [3] Griffiths L, Irving AM. Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits[J]. Analyst, 1998, 123(5): 1061-1068.
- [4] Ramanathan C, Boulant N, Chen ZY, et al. NMR quantum information processing[J]. Quant Inf Proc, 2004, 3(1-5): 15-44.
- [5] Viola L, Fortunato EM, Pravia MA, et al. Experimental realization of noiseless suby-stems for quantum information processing [J]. Science, 2001, 14:2059-2063.
- [6] 陈玉兰,陶凌晖,侯华,等. 核磁共振氢谱内标法测定盐酸小檗碱的含量[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(22): 2217-2219.
- [7] Burton IW, Quilliam MA, Walter JA. Quantitative <sup>1</sup>H-NMR with external standards; use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products[J]. Anal Chem, 2005, 77: 3123-3131.
- [8] 李建发,孙永跃,蓝丹,等. <sup>1</sup>H-NMR 定量分析葛根素含量研究[J]. 实验技术与管理, 2011, 28(12): 36-39.
- [9] 李建发,全志利,蓝丹. 核磁共振氢谱定量分析橙皮苷含量[J]. 实验技术与管理, 2012, 31(6): 18-21.

(下转第 106 页)

小板的最大聚集程度,计算血小板聚集的抑制百分率,并用回归法求出各目标化合物的50%抑制活性。体外抑制血小板聚集的活性数据见表2。

$$\text{聚集抑制率} = (\text{对照聚集率} - \text{样品聚集率}) / \text{对照聚集率} \times 100\%$$

表2 化合物2~10抗血小板聚集活性

编号	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	编号	IC <sub>50</sub> (μmol/L)
2	2.42	11	2
3	0.63	12	2.15
4	23.84	13	30.1
5	8.36	14	5.42
6	1.09	15	31.99
7	11.1	16	4.86
8	1.91	17	3
9	2.21	18	4.82
10	1.62	MCI-154	13.95

### 3 结果与讨论

经初步的体外抗血小板凝集实验表明,所合成的目标化合物对ADP引起的血小板聚集有不同程度的抑制作用。其中大部分化合物的活性均优于对照药MCI-154,化合物3,6和10的IC<sub>50</sub>值分别为0.63,1.09和1.62μmol/L,分别是对照药的22.2,12.8和8.6倍。从上面的药理活性数据来看,R基团的引入对抗血小板凝集有一定的影响,其中取代苯胺的引入可以增强其血小板聚集的抑制作用,特别是对位为F取代的化合物对药效提高有帮助,而供电子的引入会降低抗血小板凝集作用。对于杂化

和苯乙胺的引入对于药效影响不显著。但由于目标化合物的数目有限,尚难得出全面的构效关系讨论,有待于进一步的研究。

### 【参考文献】

- [1] 杨曦明,范聪,李慧萍,等. 白树花多糖硫酸酯的抗凝血活性研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1031.
- [2] Gardell SJ, Sanderson PE. Novel anticoagulants based on direct inhibition of thrombin and factor Xa [J]. Coron Artery Dis, 1998, 9(2-3): 75.
- [3] 赵东明,刘超美. 6-取代乙酰哌嗪苯基二氢吡啶酮类化合物的合成及其抑制血小板聚集的作用[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(5): 510.
- [4] 覃军,王祥志,刘毅敏. 6-(4-取代苯基)-5-甲基-4,5-二氢-3(2H)吡啶酮类化合物的合成及其抑制血小板聚集的作用[J]. 化学研究与应用, 2006, 18(9): 1088.
- [5] 周大铮,易杨华,毛士龙,等. 香榧假种皮中的木脂素成分[J]. 药学报, 2004, 39(4): 269.
- [6] Yang GM, Liu LM, Xu J. Effects of MCI-154 on vascular reactivity and its mechanisms after hemorrhagic shock in rats[J]. J Cardio, 2006, 47(6): 751.
- [7] Kitada Y, Narimatsu A, Matsumura N, et al. Increase in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractile system by MCI-154, a novel cardiotonic agent, in chemically skinned fibers from the guinea pig papillary muscles[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1987, 243(2): 633.
- [8] Okafor C, Liao R, Perreault-Micale C, et al. Mg<sup>2+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup> activated myosin ATPase activity in ventricular myofibrils from non-failing and diseased human hearts-effects of calcium sensitizing agents MCI-154, DPI 201-106, and caffeine[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 245(1-2): 77.

【收稿日期】 2012-04-24 【修回日期】 2013-01-06

【本文编辑】 陈静 李睿旻

(上接第95页)

- [10] Jaki BU, Franzblau SG, Chadwick LR, et al. Purity activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid[J]. J Nat Prod, 2008, 71: 1742-1748.
- [11] 薛松,胡皆汉,张卫. 氢谱在甾醇类化合物定量和纯度分析中的应用[J]. 分析化学, 2003, 31(12): 1493-1495.
- [12] Gang F, Meng Y, Zhang X, et al. Quality evaluation and species differentiation of rhizoma-coptidis by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Anal Chim Acta, 2012, 747: 76-83.
- [13] Kang J, Lee S, Kang S, et al. NMR-Based metabolomics approach for the differentiation of ginseng (panax ginseng) roots from different origins[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(3): 330-336.
- [14] Wen H, Kang S, Song Y, et al. Differentiation of cultivation sources of ganoderma lucidum-by NMR-based metabolomics approach[J]. Phytochem Anal, 2010, 21: 73-79.
- [15] 江洪波,姜建辉,田仁君,等. 绵阳麦冬<sup>1</sup>H-NMR主成分分析及质量控制研究[J]. 环球中医药, 2011, 4(3): 190-192.
- [16] Li CY, Lu HJ, Lin CH, et al. A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in cortex phellodendri by <sup>1</sup>H-NMR and its application for quality control of commercial traditional Chinese medicine prescriptions[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40: 173-178.
- [17] Li CY, Lu HJ, Wu TS. Quantitative analysis of camptothecin derivatives in *Nothapodytes foetida* using <sup>1</sup>H-NMR method [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(3): 347-349.
- [18] Yang MH, Wang JS, Kong LY. Quantitative analysis of four major diterpenoids in andrographis paniculata <sup>1</sup>H-NMR and its application for quality control of commercial preparations [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 87-93.
- [19] Liu NQ, Choi YH, Verpoorte R, et al. Comparative quantitative analysis of qrteminin by chromatography and qNMR[J]. Phytochem Anal, 2010, 21: 451-456.
- [20] Liu XD, Jia L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and *in vivo* studies [J]. Curr Drug Metab, 2007, 8(8): 815-821.
- [21] 李歌. 核磁共振波谱在药物分析中的应用[J]. 牡丹江医学院学报, 2007, 28(1): 67-69.
- [22] Moazzami AA, Andersson RE, Eldin AK. Quantitative NMR analysis of a sesamin catechol metabolite in human urine[J]. Nutrition, 2007, 137(4): 940-944.

【收稿日期】 2013-03-29 【修回日期】 2013-09-07

【本文编辑】 李睿旻