

# 基于<sup>1</sup>H-NMR 的定坤丹指纹图谱研究

王楠<sup>1,2</sup>, 高晓霞<sup>1</sup>, 张爱荣<sup>3</sup>, 王佩义<sup>3</sup>, 秦雪梅<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006; <sup>2</sup>山西大学化学化工学院; <sup>3</sup>山西广誉远国药有限公司; \*通讯作者, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn)

**摘要：**目的 建立定坤丹的<sup>1</sup>H NMR 指纹图谱, 为其质量控制提供比较全面快速的评价方法。方法 采用 600 MHz NMR 仪测定, 建立 10 批次定坤丹甲醇水相和氯仿相的<sup>1</sup>H NMR 指纹图谱, 利用 SPSS 统计分析软件计算批次间 Pearson 相关系数。

结果 建立了 10 批定坤丹样品的指纹图谱, 可检测到糖类、有机酸类及芳香类化合物, 10 批供试品的指纹图谱间的相似系数均大于 0.9, 与生成的对照图谱数据间相似系数均大于 0.95 ( $P < 0.01$ ), 即呈现显著相关性, 表明该复方总体质量较为稳定。

结论 该指纹图谱方法科学、准确且简便, 可以为定坤丹的内在质量控制提供科学依据。

**关键词：**定坤丹; 核磁指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-6611(2019)04-0479-05 DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2019.04.019

## Fingerprint research of Dingkun Dan based on <sup>1</sup>H NMR method

WANG Nan<sup>1,2</sup>, GAO Xiaoxia<sup>1</sup>, ZHANG Airong<sup>3</sup>, WANG Peiyi<sup>3</sup>, QIN Xuemei<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; <sup>2</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University; <sup>3</sup>Shanxi Guangyuyuan Traditional Chinese Medicine Co., Ltd; \*Corresponding author, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn)

**Abstract:** Objective To establish the <sup>1</sup>H NMR fingerprint of Dingkun Dan (DKD) and conduct a comprehensive and efficient method

影响, 因此当考虑肉桂产区时应充分考虑环境因素。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中医药科技出版社, 2015.
- [2] 李艳, 苗明三. 肉桂的化学、药理及应用特点[J]. 中医学报, 2015, 30(9): 1335-1337.
- [3] 吴修富. 肉桂提取物的主要化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(24): 3454-3456.
- [4] 伍彩红, 舒眉, 李倩, 等. 广东、广西产肉桂资源调查研究[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(5): 14-17.
- [5] 陈菊莲. 中药肉桂与食用肉桂的对比及鉴别分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(54): 96-97.
- [6] 中华中医药学会. T/CACM 1021.66-2018 药材商品规格等级标准[S].
- [7] 杨秋霞, 徐方方, 吴云山, 等. 中药肉桂的化学成分研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(12): 2785-2788.
- [8] 侯小涛, 郝二伟, 秦健峰, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [9] 过玮, 宋俊峰, 李焕妮, 等. 肉桂中肉桂酸的单扫描示波极谱法测定[J]. 药物分析杂志, 1995, 15(4): 3-6.
- [10] 方琴, 徐吉银, 丁平, 等. 高效液相色谱法测定肉桂不同部位中肉桂酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(6): 412-414.
- [11] 徐艳春, 魏璐雪, 王亚丽. 高效液相法测定黄连配伍肉桂前后肉桂酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(1): 47-49.
- [12] 董娟娥, 梁宗锁. 植物次生代谢物积累量影响因素分析[J]. 西北植物学报, 2016, 24(10): 1979-1983.
- [13] 郭改革, 吴水生, 王英豪. 种质与生态环境对泽泻块茎密度的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(1): 12-13.
- [14] 陈欢, 谭舒舒, 罗小泉, 等. 中药道地药材的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2228-2230.
- [15] 周正, 任达全. 肉桂引种栽培研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 655.
- [16] 王军锋, 梁晓静, 李开祥, 等. 西江桂和清化桂木材解剖特征的比较分析[J]. 广西林业科学, 2016, 45(1): 75-80.
- [17] 冯玲玲, 张小飞, 果秋婷, 等. 肉桂挥发油的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(1): 196-196.
- [18] 廖兵. 民国时期广西肉桂发展初探[J]. 惠州学院学报, 2017, 37(3): 69-75.

**基金项目：**山西省科技重点研发计划项目(201603D3113006); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室(201605D111004); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18)

**作者简介：**王楠, 女, 1996-08 生, 在读硕士, E-mail: wangnan\_wanan@163.com

**收稿日期：**2019-01-04

of quality evaluation. **Methods** The 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR was employed to establish the  $^1\text{H}$  NMR fingerprint of 10 batches of DKD. DKD samples were extracted with chloroform-methanol-aqueous. The Pearson correlation coefficient between batches was calculated using SPSS statistical analysis software. **Results** The  $^1\text{H}$  NMR fingerprint of 10 batches of DKD were established. Carbohydrate, organic acids, aromatic compounds and other compounds were detected. The Pearson correlation coefficient values of the DKD were all above 0.9, and the coefficient compared with generated control group data were all above 0.95 ( $P < 0.01$ ), which showed significant correlation, indicating a relatively stable quality of the formula. **Conclusion** The  $^1\text{H}$ -NMR analysis method established in this study is scientific, accurate, reliable, and simple, and it can also supply a solid scientific basis for the further quality control of DKD.

**Key words:** Dingkun Dan;  $^1\text{H}$ -NMR fingerprint; quality control

定坤丹是由红参、鹿茸、西红花、等 20 余味药材经加工制成的大蜜丸<sup>[1]</sup>,具有滋补气血、调经舒郁的功效。临床上常用于痛经<sup>[2-4]</sup>、月经不调<sup>[5]</sup>、多囊卵巢综合征<sup>[6]</sup>、围绝经期综合征(更年期综合征)<sup>[7]</sup>、子宫内膜异位症<sup>[8]</sup>等妇科疾病。

现行《中国药典》(2015 版,一部)主要针对红参、三七中人参皂苷类成分进行薄层色谱(TLC)鉴别与含量测定,并采用显微鉴别与 TLC 法对川芎、枸杞子、白芍、白术、甘草等药材中特征进行控制<sup>[1]</sup>。但由于定坤丹组方复杂,药味众多,且其中定性鉴别需要多次实验分别定性不同药材及对照品,步骤繁多复杂,而现有含量测定方法控制成分单一,仅限制了其中红参及三七药材的质量,对于药味众多的定坤丹复方并不能反映其质量全貌。而核磁共振代谢组学技术可以全面反映复杂样品中化合物的信息,可定性、半定量地用于复杂成分质量评价<sup>[9,10]</sup>。本研究利用核磁共振氢谱检测建立定坤丹的指纹图谱,从整体上综合反映不同生产批次定坤丹的整体质量,为其内在质量特征评价提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer(600.13 MHz 质子频率,德国布鲁克公司 600 兆核磁仪),超声清洗仪(KQ2200DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司),万分之一天平(CPA225D 电子分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司);重水(Norell, Landisville, 美国),氘代甲醇、氘代氯仿( $\text{CDCl}_3$ , 99.8%, 德国 Merck 公司),氘代氢氧化钠(Armair, 瑞士),3-三甲基硅基[2,2,3,3-d<sub>4</sub>]氘代丙酸钠(TSP, Cambridge Isotope Laboratories

Inc., MA)。

定坤丹(批号:139170643, 139170645, 139170647, 139170649, 139170651, 139170653, 139170655, 139170657, 139170659, 139170662, 由山西广誉远国药集团有限公司提供,记做 S1-10);超纯水由 Milli-Q Integral Water Purification System(美国 Millipore 公司)制备;甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 样品制备 将定坤丹大蜜丸剪碎,称取 200 mg,加等量硅藻土研磨,置于 10 ml 玻璃离心管中,分别加蒸馏水及甲醇 1.5 ml、氯仿 3 ml,涡旋混匀后超声提取 25 min,室温离心(3 500 r/min)25 min,提取液分为两层(上层为水溶性部分即甲醇-水相,下层为有机部分即氯仿相),分别减压浓缩蒸干。于测定前用氘代试剂溶解,其中氯仿相部分用  $\text{CDCl}_3$ (含 0.03% TMS)800  $\mu\text{l}$  溶解,甲醇-水相部分用氘代甲醇 400  $\mu\text{l}$  与缓冲重水( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶于  $\text{D}_2\text{O}$  中,以 1 mol/L 氘代氢氧化钠溶液调至 pH 6.0,含 0.05% TSP)400  $\mu\text{l}$  溶解,涡旋溶解,以 13 000 r/min 离心 10 min,移取上清液 600  $\mu\text{l}$  于 5 mm 核磁管中。

1.2.2  $^1\text{H}$  NMR 测定 样品在 25  $^{\circ}\text{C}$  下于 600 MHz NMR 仪上测定,测定频率为 600.13 MHz,扫描次数为 64,谱宽 12 345.679 Hz,傅里叶变换 0.188 Hz,脉冲间隔 D1 为 1 s,延迟时间为 5.0 s,手动进行相位、基线调节及峰校正。含水甲醇提取物核磁测定采用 noesyppr 1D 序列压制水峰,用氘代甲醇进行锁场,内标为 TSP。氯仿相提取物核磁测定采用 zg30 序列,用氘代氯仿锁场,内标为 TMS。

1.2.3 数据分析 核磁图谱采用 MestReNova(version 8.0.1, 西班牙 Mestrelab Research 公司)软件进

行处理。以化学位移值( $\delta$ )0.01 积分段对化学位移区间  $\delta$  0.5 – 9.0 进行分段积分,其中甲醇 – 水相  $\delta$  4.92 – 4.96(残余水峰)和  $\delta$  3.28 – 3.32(残余甲醇峰)不进行积分,氯仿相其中  $\delta$  7.20 – 7.32(残余氯仿峰)不进行积分。积分数据进行面积归一化后,采用 SPSS 软件 16.0 进行 Pearson 相关性分析。相关系数  $>0.9$ ,  $P<0.01$ ,说明结果呈显著相关。此外,参照《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2008 版)方法选择平均数为指标生成对照核磁图谱(记做 Sc)。

2 结果

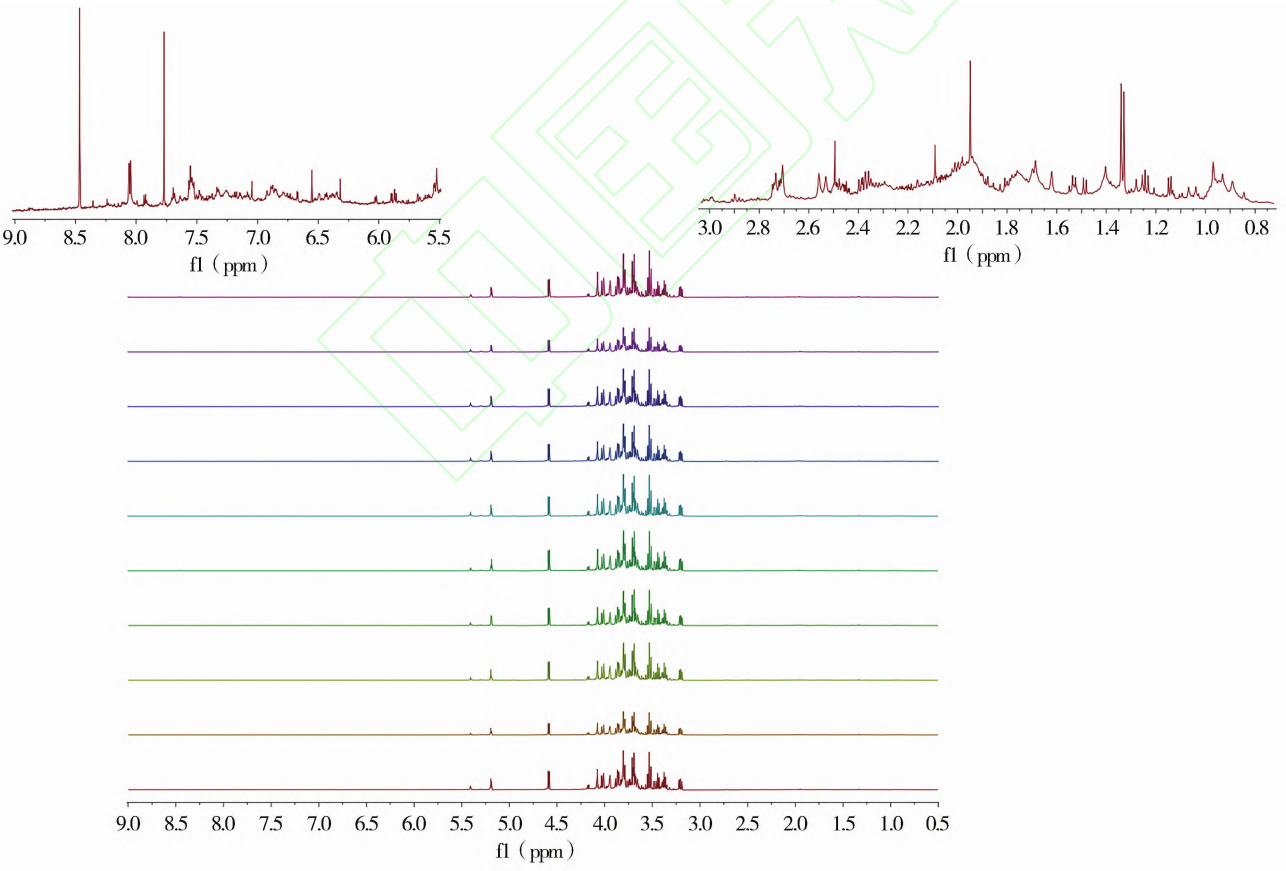
2.1 样品核磁指纹图谱

10 批次定坤丹的甲醇 – 水相和氯仿相<sup>1</sup>H NMR 指纹图谱结果表明,10 批次定坤丹出峰稳定,没有明显差异(见图 1,2)。甲醇 – 水相 NMR 图谱表征的峰主要位于  $\delta$  3.10 – 5.50,主要为糖类成分的信

号, $\delta$  0.50 – 3.10 主要为有机酸类成分信号, $\delta$  5.50 – 9.00 主要为芳香化合物的信号;氯仿相 NMR 图谱表征峰主要位于  $\delta$  0.50 – 3.10,为低极性的脂肪酸类成分的信号。

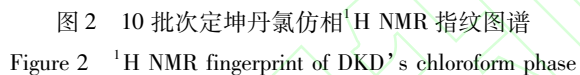
2.2 Pearson 相关性分析

将 10 批复方的核磁归一化积分数据导入 SPSS 中进行 Pearson 相关性分析,得到相关系数(见表 1, 2),结果表明 10 批次图谱间的相关系数均大于 0.9,且各组间  $P<0.01$ ,即这 10 批 DKD 产品均呈现显著相关关系,质量较为均一稳定。此外,将参照《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2008 版)方法以平均数为指标生成的对照指纹图谱(记做 Sc),与各批次样品进行比较并计算图谱间相关系数(见表 1,2),结果表明 10 批次 DKD 样品与对照核磁图谱相比较得到的相关系数均大于 0.95,表明这 10 批 DKD 质量较为均一稳定。



2 个小图是 S1 批次的局部放大图

图 1 10 批次定坤丹甲醇 – 水相<sup>1</sup>H NMR 指纹图谱  
Figure 1 <sup>1</sup>H NMR fingerprint of DKD's methanol-aqueous phase

[illegible][illegible]



### 3 讨论

选择核磁共振方法建立指纹图谱的原因:核磁共振氢谱响应稳定;所有含 H 的化合物都可以出峰,全面出峰,无偏向性;可以较为完整地表征中药材的初级和次级代谢物<sup>[11]</sup>。

在选择定坤丹备样条件时,选择了两相提取法对定坤丹样本进行提取,甲醇水相和氯仿相共同提取可以更全面地表征复方的成分。

指纹图谱相似度计算是一种广泛用于指纹图谱数据评价的方法<sup>[12]</sup>,国家药典委员会发布了相应的软件《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》用于相似度的科学评价。但由于本研究所得的核磁共振图谱数据格式不适用该软件,本文作者参照相似度评价系统的计算方法及文献<sup>[13]</sup>报道,选择采用 SPSS 软件进行了 Pearson 相关性的分析,得到的相关系数结果发现 Pearson 相关系数可以作为相似度的替代值,结果可靠,可推广应用于核磁图谱的相似性评价。此外,通过对样本的检测和相似度分析,发现不同批次定坤丹大蜜丸相关系数较高,且呈现显著相关( $P < 0.01$ ),表明定坤丹批次间的稳定性良好。

本研究首次采用<sup>1</sup>H-NMR 建立了定坤丹的核磁指纹图谱,该方法可行性强,且两相提取法能较为全面地反映定坤丹的化学组成,为其内在的质量评价提供了更加高效的方法,以期更全面、科学地控制并评价定坤丹的质量。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典编委会. 中国药典·一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1120-1121.
- [2] 赵卫萍,范树军,高云秀. 定坤丹治疗青春期原发性痛经 30 例[J]. 中医杂志,2005,46(8):609-610.
- [3] 王燕. 定坤丹治疗原发性痛经 300 例[J]. 陕西中医,2010,31(3):278-280.
- [4] 马堃,陈燕霞,王艳英. 定坤丹对寒凝血瘀型痛经患者血清 GPF2 $\alpha$ ,ET,PAF 及子宫动脉血流动力学的影响[J]. 中国中药杂志,2017,42(23):4474-4480.
- [5] 易星星,林洁. 定坤丹治疗肾虚肝郁证月经量少患者 30 例临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(5):629-631.
- [6] 江敏. 补肾活血汤联合定坤丹序贯治疗育龄期肾虚血瘀型 P-COS 的临床[D]. 武汉:湖北中医药大学,2017.
- [7] 王玉雯. 定坤丹治疗妇科疾病应用体会[J]. 中医药信息杂志,2007,14(9):78.
- [8] 张西芝. 定坤丹为主治疗子宫内膜异位症 37 例[J]. 中医杂志,2005,46(4):286.
- [9] 李静,魏玉海,秦雪梅,等. 基于 NMR 代谢组学技术的当归不同部位化学成分比较[J]. 中草药,2017,48(7):1409-1415.
- [10] 马晓丽,邹萍萍,雷伟,等. 定量核磁技术参数的优化及其在中草药定量分析领域的应用[J]. 药学学报,2014,49(9):1248-1257.
- [11] 曲婷丽,魏玉海,李爱平,等. 黄芪注射液<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱研究[J]. 药学学报,2016,51(5):780-785.
- [12] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [13] 梁悦. 生脉注射液物理指纹图谱的建立及其质量评价[J]. 中草药,2018,49(11):2571-2576.