

定量核磁共振氢谱法同时测定千年健中芳樟醇、原儿茶酸的含量*

蒋丽娟¹, 韦佳先¹, 周平秀², 张凤兰¹, 张夏雯¹, 李业航¹

(1. 广西民族大学化学化工学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西高校化学与生物转化过程新技术重点实验室, 南宁 530006; 2. 广西民族大学医院, 南宁 530006)

摘要 目的: 采用氢核磁定量方法快速测定千年健中主要成分芳樟醇、原儿茶酸的含量。**方法:** 以氘代二甲基亚砜为测试溶剂, 吡嗪为内标物, 在 400 MHz 光谱仪上进行 ¹H - qNMR 测量, 其中吡嗪、芳樟醇、原儿茶酸的定量共振峰分别为 δ 8.66、 δ 5.85 ~ 5.95、 δ 6.78 ~ 6.80。**结果:** 芳樟醇、原儿茶酸的线性关系良好, 相关系数分别为 0.999 7、0.998 5, 精密度 RSD 分别为 0.30%、0.40%, 回收率分别为 98.8% ~ 100.7% (RSD 为 3.7%) 和 99.4% ~ 100.6% (RSD 为 4.4%), 表明所建立的氢核磁定量方法, 结果准确, 稳定可行, 且整个检测过程在 3 min 左右完成。4 批千年健药材中芳樟醇、原儿茶酸的含量范围分别为 0.328 ~ 0.398 mg · g⁻¹、0.559 ~ 0.630 mg · g⁻¹。**结论:** 该方法操作简单, 分析速度快, 专属性强, 可用于千年健中 2 个有效成分的同步测定, 为千年健药材的全面质量评价和质量控制提供科学依据。

关键词: 千年健; 芳樟醇; 原儿茶酸; 氢核磁共振; 多指标; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024) 06 - 0946 - 06
doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.06.04

Simultaneous determination of linalool and protocatechuate in *Homalomena occulta* by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy*

JIANG Li - juan¹, WEI Jia - xian¹, ZHOU Pin - xiu²,
ZHANG Feng - lan¹, ZHANG Xia - wen¹, LI Ye - hang¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Minzu University, Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modification, Guangxi Higher Education Institutes Key Laboratory for New Chemical and Biological Transformation Process Technology, Nanning 5300, China;
2. Guangxi Minzu University Hospital, Nanning 5300, China)

Abstract Objective: To establish a hydrogen nuclear magnetic quantitative method which can rapidly determine the contents of linalool and protocatechuate in *Homalomena occulta*. **Methods:** Using dimethyl sulfoxide - *d*₆ (DMSO - *d*₆) as the test solvent and pyrazine - as the internal standard, ¹H - q NMR measurement was performed on a 400 MHz spectrometer. The quantitative resonance peaks of pyrazine, Linalool and protocatechuate were δ 8.66, δ 5.90 and δ 8.60, respectively. **Results:** The linear correlation coefficients of linalool and protocatechuate were good with *r* of 0.999 7 and 0.998 6, respectively. The RSDs of precision were 0.30% and 0.40%, and the recoveries were 98.8% - 100.7% (RSD = 3.7%) and 99.4% - 100.6% (RSD = 4.4%),

* 广西民族大学 2023 年实验技术创新与实验室管理研究项目 (2023MDSY003)
第一作者 Tel: 13152671318; E - mail: jianglj12@yeah.net

respectively, which indicated that the established method was accurate, stable and feasible. And the whole detection process was completed in about three minutes. The contents of 2 components in 4 batches of *Homalomena occulta* were 0.328 – 0.398 mg · g⁻¹ (linalool) and 0.559 – 0.630 mg · g⁻¹ (protocatechuate), respectively.

Conclusion: The ¹H – q NMR method has the advantages of simple operation, fast analysis speed and specificity, and can be used for the simultaneous determination of two active components in *Homalomena occulta*, providing a scientific basis for the overall quality evaluation and quality control of *Homalomena occulta*.

Keywords: *Homalomena occulta*; linalool; protocatechuate; ¹H – qNMR; multi – index; quantitative evaluation

千年健始载于《本草纲目拾遗》，具有祛风湿、壮筋骨的功效^[1-2]。千年健 (*Homalomena occulta* (Lour.) Schott.) 作为天南星科千年健属植物，其味苦、辛，性温，归肝、肾经，主产于广西、广东、云南等地，主治风寒湿痹、腰膝冷痛、拘挛麻木、筋骨痿软，临床上常用于治疗风湿腰腿痛、风湿及类风湿性关节炎、骨折、跌打损伤等，主要化学成分为挥发油和倍半萜类化合物，此外还有酚酸类、生物碱、脂肪酸等^[3-6]。药理研究表明其具有抗炎镇痛、抗阿尔兹海默症、抗骨质疏松、抗病原微生物、抗氧化、抗肿瘤等作用，具有广阔的开发应用前景。2020年版《中华人民共和国药典》采用气相色谱法测定芳樟醇的含量及其他常规鉴别项目作为控制千年健质量的手段和指标，存在耗时长，样品预处理复杂等缺点，且单一指标难以全面、科学地评价千年健药材的质量^[7-9]。

近年来，氢核磁定量(¹H-qNMR)方法由于测试时间短，专属性强，样品前处理简单，不破坏样品自身结构，且定量过程中通过选用合适的内标物避免了对照品的使用，对于稳定性差的化合物是很好的定量分析方法，已被广泛应用于中药有效成分含量的测定等^[10-18]。尚未见千年健相关氢核磁定量方法的报道。本文以吡嗪为内标物，采用¹H – qNMR法同时测定千年健药材中芳樟醇、原儿茶酸的含量，该法快速、简便，不需要对照品，测定结果准确，为千年健的全面质量评价和质量控制提供依据。2个成分的结构见图1。

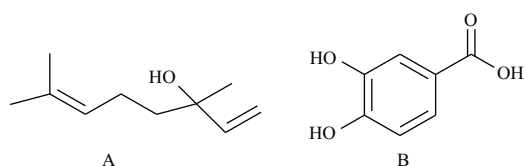


图1 芳樟醇(A)和原儿茶酸(B)的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of linalool (A) and protocatechuate (B)

1 仪器与试剂

Bruker Advance III 400 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司), AL-104 电子分析天平 (精度 0.000 1, 慈溪市天东衡器厂), XO-5200DT 超声波清洗机 (南京先欧仪器制造有限公司), RE-2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), 粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

对照品芳樟醇 (含量 ≥ 98%, 购自希恩思化学技术有限公司)、原儿茶酸 (含量 ≥ 98%, 购自希恩思化学技术有限公司)、吡嗪 (含量 ≥ 99%, 购自上海麦克林生化科技有限公司), DMSO – d₆ (含量 99.8%, 购自萨恩化学技术有限公司)。千年健药材购自当地各大药房并经鉴定, 4批药材分别标记为 1、2、3、4。

2 方法与结果

2.1 实验原理

内标法为 QNMR 分析最常用的方法。测定制备的样品和内标物混合溶液, 通过比较样品特征峰面积与内标峰面积计算样品含量。积分时, 先将 NMR 谱图基线调平, 选定峰积分区间, 每个峰积分 3 次, RSD < 1% 时取平均值。用绝对定量公式计算待测组分的量: $W_s = W_r \times (A_s/A_r) \times (E_s/E_r)$ 其中 W_r 为内标物的量, A_s 和 A_r 分别为供试品特征峰和内标峰的峰面积, E_s 和 E_r 分别为供试品和内标物的质子当量重量 (质量) (以分子量除以特征峰的质子数计算得到), 然后根据称样量计算组分在样品中的含量^[10-18]。

2.2 溶液的配制

2.2.1 内标溶液 精密称取 10 mg 内标物吡嗪, 溶解至 DMSO – d₆ 1 mL 中, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取药材粉末 (过 40 目筛) 5.00 g, 精密称定, 置于 200 mL 锥形瓶中, 加入 80% 乙醇 100 mL, 45 °C 超声 (功率 180 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 抽滤, 重复 2 次, 合并滤液, 于 50 °C 减压回收旋干得粗浸膏。精密称定 10 mg 提取物浸膏于质谱

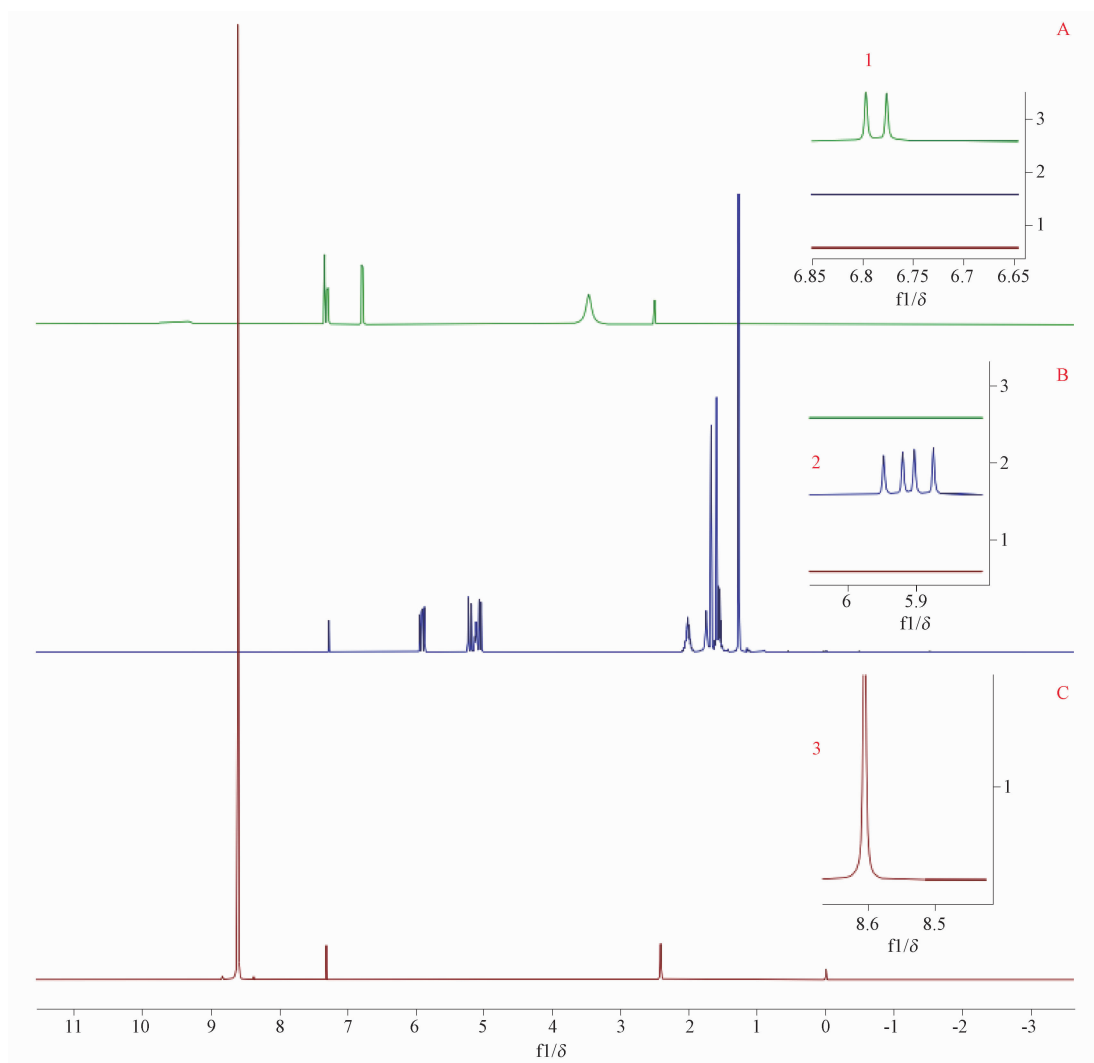
管中,用移液枪精密加入 DMSO- d_6 490 μL 和已配制好的内标溶液 10 μL ,超声溶解,移至核磁管待测。

2.2.3 对照品溶液 精密称定芳樟醇和原儿茶酸各 10 mg,用 DMSO- d_6 配制浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液,分别取 2 个成分的储备液各 13、25、50、100、200、400 μL 于核磁管中,分别加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标液 50 μL (吡嗪),后加 DMSO- d_6 至 500 μL ,混合均匀,得芳樟醇和原儿茶酸质量浓度分别为 0.26、0.5、1、2、4、8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 单一系列对照品溶液,按照“2.3”

条件测定 ^1H -qNMR 波谱。

2.3 ^1H -qNMR 测试条件

采用 zg30 脉冲序列,谱宽 (SWH) 为 11 904.8 Hz,弛豫时间 (D1) 为 1 s,脉冲宽度 (P1) 14.90 s,样品扫描次数 (NS) 32。所有数据均使用 MestReNova 软件处理。得到的检测图谱采用手动调整相位和基线,并进行手动积分。在本测试条件下,内标物吡嗪和原儿茶酸、芳樟醇对照品的 ^1H -qNMR 波谱图见图 2。



1. 原儿茶酸 (protocatechuate) 2. 芳樟醇 (linalool) 3. 吡嗪 (pyrazine)

图 2 原儿茶酸 (A)、芳樟醇 (B)、吡嗪 (C) 氢核磁共振波谱图

Fig. 2 ^1H -NMR spectra of protocatechuate (A), linalool (B) and pyrazine (C)

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系 分别取“2.2.3”项芳樟醇和原儿茶酸系列对照品溶液,分别转移至 5 mm 核磁管中,

按照“2.3”项条件下测定,分别以 (芳樟醇/吡嗪、原儿茶酸/吡嗪) 质量比 X 为横坐标,相应 ^1H -qNMR 定量峰面积比 Y 为纵坐标,

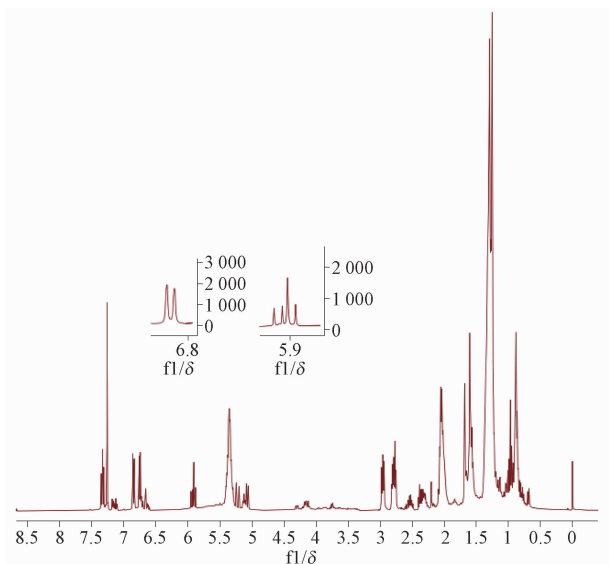


图3 千年健氢核磁共振图谱

Fig. 3 ¹H - NMR Spectra of Homalomena occulta

得芳樟醇、原儿茶酸的线性回归方程:

$$Y = 0.4978X + 0.01580 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 0.2518X \quad r = 0.9985$$

芳樟醇、原儿茶酸与内标物吡嗪质量比值在 0.10 ~ 4.0 内与两者定量峰面积比值呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度考察 取“2.2.2”项中的供试品溶液(样品1),按照“2.3”项条件连续测试6次,连续测

试3d,分别考察仪器日内和日间精密度,结果芳樟醇峰面积和内标峰面积比日内RSD为0.30%,日间RSD为1.5%;原儿茶酸峰面积和内标峰面积比的日内RSD分别为0.40%,日间RSD为1.8%,精密度好,也说明样品稳定性好。

2.4.3 稳定性考察 取“2.2.2”项中的同一份供试品溶液(样品1),按照“2.3”项下条件分别在0、2、4、8、12、24h进行¹H-qNMR测试,记录用于定量的目标峰的积分面积。结果芳樟醇、原儿茶酸积分面积的RSD为1.3%和0.80%。表明样品的供试溶液24h内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取“2.2.2”项中的供试品溶液(样品1),平行制备6份,按照“2.3”项下条件进行测试。经测定芳樟醇、原儿茶酸的平均含量分别为0.340、0.570 mg·g⁻¹,RSD分别为3.8%、3.5%。表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率考察 精密称取6份已知芳樟醇、原儿茶酸含量的浸膏样品(样品1)10mg,按照“2.2.2”项的方法制备供试品溶液且分别精密加入一定量的芳樟醇、原儿茶酸对照品,按照“2.3”项的条件进行测定,计算加样回收率,芳樟醇的平均回收率为99.6%,RSD为3.7%;原儿茶酸的平均回收率为100.1%,RSD为4.4%(见表2),表明试验方法准确可靠。

表2 2种指标成分的回收率和RSD(n=6)

Tab.2 Recoveries and RSDs of 2 index components

化合物 (compound)	样品中的量 (sample)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)%	平均回收 (average recovery)%	RSD/ %
芳樟醇(linalool)	0.346	1.001	1.343	99.6	99.6	3.70
		1.003	1.342	99.3		
		1.015	1.349	98.8		
		1.014	1.350	99.0		
		1.002	1.349	100.1		
		1.002	1.356	100.7		
原儿茶酸(pyrazine)	0.599	1.003	1.605	100.2	100.1	4.4
		1.006	1.609	100.4		
		1.009	1.612	100.3		
		1.015	1.608	99.4		
		1.009	1.614	100.6		
		1.008	1.605	99.8		

2.4.6 样品含量的测定

按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.3”项条件,分别对4批千年健药材的2个有效成分含量进行测定,对每一样品重复测定3次,并计算其含

量。结果见表3,波谱图见图3。4批千年健药材中芳樟醇和原儿茶酸含量分别为 $0.328 \sim 0.398 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.559 \sim 0.630 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$

表3 2个成分含量测定结果

Tab.3 Results of determination of 2 components

样品 (sample)	产地 (habitat)	含量(content)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
		芳樟醇(linalool)	原儿茶酸(protocatechuete)	总量(total)
1	广西(Guangxi)	0.346	0.599	0.945
2	广西(Guangxi)	0.398	0.530	0.928
3	云南(Yunnan)	0.340	0.630	0.97
4	安徽(Anhui)	0.328	0.559	0.887

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

千年健粉末分别用80%甲醇水溶液、70%甲醇水溶液、60%甲醇水溶液、丙酮、95%乙醇、水、80%乙醇水溶液、60%乙醇水溶液等溶剂进行提取。结果显示80%乙醇水溶液提取的浸膏2个有效成分含量均较高,且在DMSO- d_6 中的溶解性比较好,所以选择80%的乙醇水溶液作为提取溶剂。

3.2 内标物和溶剂的选择

内标物的选择考察了苯甲酸、3,5-二硝基苯甲酸、对苯二酚、顺丁烯二酸、苯甲酸苄酯、吡嗪,结果显示吡嗪性质稳定且不与样品发生反应,有1个易于识别的单峰,且信号峰不与待测峰重叠,所以选择吡嗪作为内标物。千年健浸膏和吡嗪在DMSO- d_6 中溶解性最好,并且信号峰不与样品峰重叠,也没有干扰。因此试验选择DMSO- d_6 作为氘代试剂。

3.3 定量峰的选择

通过对芳樟醇、原儿茶酸和吡嗪的谱峰分析,优先选择耦合裂分数最少的,且分离度较好的峰,根据以上要求,以 $\delta 5.85 \sim 5.95$ 为芳樟醇、 $\delta 6.78 \sim 6.80$ 原儿茶酸的峰为定量峰,以 $\delta 8.66$ 为内标吡嗪定量峰(图2)。

3.4 $^1\text{H} - \text{qNMR}$ 测试条件

扫描次数考察了16、32、64、128次,测试结果显示,当扫描次数 ≥ 32 次时,积分面积稳定,RSD $< 1\%$,所以选择扫描32次。

4 结论

$^1\text{H} - \text{qNMR}$ 法具有专属性强,准确快捷,重现性

好,不破坏化合物结构,且不需要使用对照品,仅使用内标物质即可同时对多种成分进行含量测定和鉴别等优点,已广泛应用于中药有效成分含量的测定^[10-18]。本实验建立同时测定千年健中芳樟醇、原儿茶酸含量的 $^1\text{H} - \text{qNMR}$ 法,其结果表明从各药店购买的千年健药材都符合2020年版《中华人民共和国药典》芳樟醇不少于0.20%的标准,说明药材质量都符合要求,各产地的千年健药材中芳樟醇和原儿茶酸的含量差异不明显。

本实验建立了一种快速、简便的同时测定千年健中芳樟醇、原儿茶酸含量的 $^1\text{H} - \text{qNMR}$ 法。该方法操作简单、速度快、特异性强、样品不丢失,不需要标准物质,同时只需用内标物就可以对多种化学成分进行定量,为千年健药材质量控制提供了一种快速、有效的新方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典2020年版.一部[S].2020:34
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 34
- [2] 谢丽莎,龚志强,李婷.千年健研究进展[J].上海中医药杂志,2015,45(11):90
XIE LS, GONG ZQ, LI P. Advances in *Homalomena occulta* research[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2015,45(11):90
- [3] 胡永美,杨中林,叶文才,等.千年健化学成分的研究(I)[J].中国中药杂志,2003,28(4):342
HU YM, YANG ZL, YE WC, et al. Studies on the constituents in Rhizome of *Homalomena occulta* (I) [J]. China J Chin Mater Med, 2003,28(4):342
- [4] 胡永美,杨中林,叶文才,等.千年健化学成分研究(II)[J].中成药,2006,28(12):1794

- HU YM, YANG ZL, YE WC, *et al.* Studies on the constituents in Rhizome of *Homalomena occulta* (II) [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2006, 28(12):1794
- [5] 张珍珍,李晋奇,曾明辉. 千年健化学成分及其药理作用研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 12. 44(4): 98
- ZHANG ZZ, LI JQ, ZENG MH. Advances in research on chemical composition and pharmacological effects of *Homalomena occulta* [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2021, 12. 44(4): 98
- [6] 杨再波,赵超. 固相微萃取/气相色谱/质谱法分析千年健中挥发性化学成分[J]. 精细化工, 2007, 24(2): 149
- YANG ZB, ZHAO C. Analysis of chemical constituents of the essential oil from *Homalomena occulta* schott by SPME - GC - MS [J]. *Fin Chem Cals*, 2007, 24(2): 149
- [7] 茅银燕,岳显可. 基于主成分分析的不同产地千年健 GC 指纹图谱研究[J]. 药学研究, 2017, 20(8): 933
- MAO YY, YUE XK. GC fingerprint combined with principal component analysis in the study for *Homalomena occulta* from different habitats [J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2017, 20(8): 933
- [8] 谢丽莎,蒙田秀,欧阳炜,等. GC 法测定广西千年健芳樟醇的含量[J]. 中国药师, 2012, 12(5): 607
- XIE LS, MENG TX, OUYANG W, *et al.* Determination of Linalool in *Homalomena occulta* from Guangxi by GC [J]. *China Pharm*, 2012, 12(5): 607
- [9] 余金明,刘冰,王宪庆,等. HELP 与 GC - MS 法分析千年健挥发油成分[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1421
- SHE JM, LIU B, WANG XQ, *et al.* Analysis of the volatile oil components of Qianqianjian by HELP and GC - MS methods [J]. *J Chin Med Mater*, 2010, 33(9): 1421
- [10] 杨兰,李欠,冯彦梅,等. 定量核磁共振波谱法测定白芷中欧前胡素含量[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1049
- YANG L, LI Q, FENG YM, *et al.* Determination of imperatorin in *Angelica dahuricae* by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2020, 36(4): 1049
- [11] 范悦,李欠,常宝勤. 定量核磁共振波谱法测定黄芩中的黄芩苷含量研究[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(3): 25
- FAN Y, LI Q, CHANG BQ. Determination of baicalin in *Scutellariae Radix* by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Chin Wild Plant Res*, 2022, 41(3): 25
- [12] 禹珊,郭强胜,王会琳,等. 定量核磁共振波谱法同时测定中药虎杖中白藜芦醇和虎杖苷的含量[J]. 分析化学, 2015, 43(1): 69
- YU S, GUO QS, WANG HL, *et al.* Simultaneous Determination of resveratrol and polydatin in *Polygonum cuspidatum* by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(1): 69
- [13] 马秀琴,张瑜,冯彦梅,等. 定量核磁共振波谱法测定川芎中藜本内酯含量[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(4): 59
- MA XQ, ZHANG Y, FENG YM, *et al.* A validated ^1H - qNMR method for direct quantification of ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* Hort [J]. *J Tradit Chin Veter Med*, 2020, 39(4): 59
- [14] 郭强胜,刘明珂,禹珊,等. 定量核磁共振法同时测定复合维生素 B 片中 B₁、B₂、烟酰胺和泛酸钙[J]. 波谱学杂志, 2016, 33(3): 442
- GUO QS, LIU MK, YU S, *et al.* A Quantitative NMR method to analyze vitamin B₁, vitamin B₂, nicotinamide and calcium pantothenate contents in compound vitamin B tablets [J]. *Chin J Magn Resonance*, 2016, 33(3): 442
- [15] 林珊,苏娟,叶霁,等. 定量核磁共振技术在中药分析中的应用进展[J]. 药学实践杂志, 2014, 32(2): 92
- LIN S, SU J, YE J, *et al.* Application progress in quantitative NMR in analysis of traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm Pract*, 2014, 32(2): 92
- [16] 张芬芬,蒋孟虹,沈文斌,等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展[J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2014, 14(2): 8
- ZHANG FF, JIANG MH, SHEN WB, *et al.* Progress in quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications [J]. *J Nanjing Norm Univ (Eng Technol Ed)*, 2014, 14(2): 8
- [17] 王志伟,闫慧娇,陈跃,等. 氢核磁共振法测定何首乌中大黄素和大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12): 2163
- WANG ZW, YIN HJ, CHEN Y, *et al.* Simultaneous determination of emodin and physcion in *Polygonum multiflorum* by quantitative ^1H NMR [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(12): 2163
- [18] KLYS A, OLSZEWSKA MA. A validated ^1H qNMR method for direct and simultaneous quantification of esculin, fraxin and (-) - epicatechin in *Hippocastani cortex* [J]. *Talanta*, 2019, 192: 263

(本文于 2023 年 10 月 25 日收到)