

乌梅的¹H-NMR 指纹图谱研究^Δ

唐荣伟^{1*}, 田玫瑰¹, 唐玲¹, 杜欢², 范刚^{2#}, 潘正³ (1.达州职业技术学院临床医学系, 四川达州 635001; 2.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 3.重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)19-2644-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.19.12

摘要 目的:为乌梅的质量控制以及功效物质的全面检测和开发利用提供参考。方法:以氘代甲醇-重水(1:0.3, V/V)为提取溶剂,在25℃下采用标准的预饱和和脉冲序列(ZGPR)压制水峰建立10批不同来源乌梅药材的氢核磁共振(¹H-NMR)指纹图谱,通过“加标准品定性”试验、数据库比对和相关文献比对进行信号归属,采用相关系数法计算10批不同来源乌梅药材¹H-NMR指纹图谱的相似性,并采用主成分分析(PCA)法进行药材的质量评价。结果:从乌梅药材中同时检测出19种化合物,包括绿原酸、柠檬酸、丁二酸、乙酸、丙氨酸、缬氨酸、 γ -氨基丁酸等。其中,乙酸、 γ -氨基丁酸和丁二酸为首次从乌梅药材中检测到。10批乌梅药材指纹图谱的相似性均>0.9,平均为0.974。PCA结果显示,前两个主成分的累积贡献率为90.3%,与相似性评价结果基本一致。结论:建立的¹H-NMR方法具有整体性和分析快等优点,可为乌梅的质量控制和功效物质的全面检测提供参考。

关键词 乌梅;氢核磁共振;指纹图谱;主成分分析;质量控制

Study on ¹H-NMR Fingerprints of *Prunus mume*

TANG Rongwei¹, TIAN Meigui¹, TANG Ling¹, DU Huan², FAN Gang², PAN Zheng³ (1.Dept. of Clinical Medicine, Dazhou Vocational and Technical College, Sichuan Dazhou 635001, China; 2.College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 3.College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the quality control of *Prunus mume*, comprehensive detection, development and utilization of active ingredients. METHODS: Using deuterated methanol and deuterium oxide (1:0.3, V/V) as extracting solvent, ¹H-NMR fingerprints of 10 batches of *P. mume* from different sources were established by standard presaturated pulse sequence (ZGPR) at 25℃. The signal was assigned through “adding standard substance qualification” trial, database comparison and related literature comparison. The similarity of ¹H-NMR fingerprints was calculated for 10 batches of *P. mume* from different sources by using correlation coefficient method. The quality of medicinal material was evaluated by principal component analysis (PCA). RESULTS: A total of 19 compounds were detected in *P. mume*, among which chlorogenic acid, citric acid, succinic acid, acetic acid, alanine, valine, γ -aminobutyric acid, etc. Among them, acetic acid, γ -aminobutyric acid and succinic acid were detected for the first time. Moreover, the similarity of ¹H-NMR fingerprinting of 10 samples was higher than 0.9, being 0.974 in average. The results of PCA showed that accumulative contribution rate of former 2 main components was 90.3%, which was consistent with the similarity evaluation. CONCLUSIONS: The established ¹H-NMR method has the advantages of embodying integrity and rapid analysis, and can provide reference for the quality control of *P. mume*, and comprehensive testing of active ingredients.

KEYWORDS *Prunus mume*; ¹H-NMR; Fingerprint; Principal component analysis; Quality control

乌梅又名酸梅、梅实,始载于《神农本草经》,为蔷薇科植物梅[*Prunus mume* (Sieb.) Sieb.et Zucc.]的干燥近成熟果实。乌梅具有较高的营养和药用价值,已入选国家卫生和计划生育委员会药食两用名单(2002年版)。2015年版《中国药典》(一部)记载,乌梅有敛肺、涩肠、生

津、安蛔的功效,可用于治疗肺虚久咳、久泻久痢、虚热消渴、蛔厥呕吐腹痛等^[1]。现代药理学研究表明,乌梅具有明显的抗菌、降血脂、镇静、抗肝纤维化等生物活性^[2]。可见,乌梅具有较好的开发利用价值和前景。乌梅在全国各地均有栽培,主产于四川、贵州、福建等地。研究表明,乌梅中主要含有齐墩果酸、熊果酸等三萜类成分(次生代谢产物),以及柠檬酸、苹果酸、乳酸等有机酸类成分和氨基酸类、糖类成分(初生代谢产物)^[3]。目前,已有文献开展了乌梅药材中特征化学成分的高效液

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81303310)

* 副教授。研究方向:中药质量控制。电话:0818-2308113。E-mail:272226087@qq.com

通信作者:副研究员,博士。研究方向:中药质量控制与评价。电话:028-61800160。E-mail:fangang1111@163.com

相色谱(HPLC)法含量测定研究^[4-5]。然而,常规HPLC测定方法大都只能分析几个或某一类成分,很难同时分析属于不同类型的化学成分。

近年来,随着仪器及信号处理技术的发展,核磁共振方法的准确度和重复性得到极大提高。氢核磁共振(Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)分析技术具有体现整体性、无偏向性、分析快速等特点^[6-7],广泛应用于中药的品种鉴定、质量控制及道地性评价等^[8-12]。¹H-NMR技术提供了一个整体、宏观的分析平台,能同时检测药材中的整体化学成分,有利于提高中药的质量控制和评价水平^[8]。本研究参考乌梅药材中已发现的化学成分^[9],充分利用¹H-NMR分析技术的方法学优势,首次从整体上检测分析乌梅中的初生和次生代谢产物,建立¹H-NMR指纹图谱,以期为乌梅的质量控制及功效物质的全面检测和开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

400 MHz型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司);BP221S型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-300B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

本研究共收集了10批乌梅药材样品(药材来源见表1),经成都中医药大学民族医药学院范刚副研究员鉴定均为蔷薇科植物梅*P. mume*的干燥近成熟果实;绿原酸对照品(批号:110753-200413,纯度:98.5%)、齐墩果酸对照品(批号:110709-200505,纯度:98.7%)、熊果酸对照品(批号:110742-200517,纯度:98.8%)均购自中国食品药品检定研究院;氘代甲醇(CD₃OD)、重水(D₂O)、3-(三甲硅基)-2,2,3,3-四氘代丙酸钠盐(TSP)均购自美国Sigma-Aldrich公司;磷酸二氢钾(KH₂PO₄)购自成都市科龙化工试剂厂;苹果酸对照品(批号:M0020,纯度:99.0%)、酒石酸对照品(批号:T0001,纯度:99.0%)、抗坏血酸对照品(批号:A0537,纯度:99.0%)、乳酸对照品(批号:L0226,纯度:98.5%)、柠檬酸对照品(批号:C1949,纯度:98.0%)均购自成都普思生物科技股份有限公司。

表1 药材来源

Tab 1 Source of medicinal materials

编号	药材来源	编号	药材来源
WM-1	四川达县百节镇蔡家坡村	WM-6	成都中一堂大药房
WM-2	湖南邵东药材市场	WM-7	贵阳太极大药房
WM-3	成都荷花池中药材市场	WM-8	浙江磐安中药材市场
WM-4	四川达州贝尔康药房	WM-9	成都吉安康药业有限公司
WM-5	四川大邑县金星乡雁鹅村	WM-10	福州海王星辰健康药房

2 方法与结果

2.1 ¹H-NMR测定条件

测定温度为25℃;观察频率为400.13 MHz;脉冲延

迟时间为2 s;谱宽为6 393.9 Hz;采样时间为2.56 s,采样次数为64次;以CD₃OD为频率内锁,并采用标准的预饱和脉冲序列(ZGPR)压制水峰信号。

2.2 数据处理

将测得的¹H-NMR信号导入MestReNova软件进行傅里叶转换,调整相位和基线,以TSP(0 ppm)为基准校正化学位移。以0.04 ppm为单位对0.50~8.50 ppm范围的图谱进行分段积分,并以总峰面积为参照进行归一化处理,得到各化学位移段与之相对应的信号峰面积值,扣除属于甲醇的信号(3.28~3.32 ppm)及水峰信号(4.86~4.94 ppm),用最终得到的数据进行统计分析。

2.3 供试品溶液的制备

取干燥的乌梅药材粉末0.2 g,置于锥形瓶中,分别加入1 mL的CD₃OD溶液和0.3 mL的D₂O溶液(内含12.32 mg/mL的KH₂PO₄和0.04% TSP),混匀,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,取出,滤过,取0.6 mL续滤液至核磁管中,按照上述的¹H-NMR条件进行测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 取同一乌梅供试品(批号:WM-1)溶液,在上述¹H-NMR条件下连续测定5次,依法处理得到积分数据后,利用Excel软件计算5次测定的相关系数,结果分别为0.999、0.997、0.998、0.998和0.996,均大于0.9,表明精密度良好^[11]。

2.4.2 重复性试验 取同一批次乌梅药材(批号:WM-1)粉末5份,按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液,分别进行¹H-NMR测定和数据处理后,利用Excel软件计算相关系数,结果分别为0.998、0.995、0.996、0.999和0.997,均大于0.9,表明重复性良好^[13]。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品(批号:WM-1)溶液,分别于室温条件下放置0、2、4、8、12、24 h,分别进行¹H-NMR测定和数据处理后,利用Excel软件计算相关系数,结果分别为0.994、0.995、0.998、0.994、0.991和0.992,均大于0.9,表明室温条件下放置24 h供试品溶液稳定^[13]。

2.5 乌梅化学成分的¹H-NMR检测及信号归属

取同一批次(批号:WM-1)乌梅药材,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在上述波谱条件下进行¹H-NMR测定。采用“加标准品定性”试验进行齐墩果酸、绿原酸、酒石酸、熊果酸、苹果酸、抗坏血酸和柠檬酸等7种成分的¹H-NMR信号归属。此外,通过比对数据库及参考相关文献^[6]进行氨基酸、糖类等成分的¹H-NMR信号归属。最终,从乌梅药材样品中共鉴定出了19种化合物,包括绿原酸、乳酸、柠檬酸(枸橼酸)、蔗糖、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖、丁二酸、乙酸、丙氨酸、缬氨酸、 γ -氨基丁酸、脂肪酸类和甾醇类等。其中,乙酸、 γ -氨基丁酸和丁二酸为首次从乌梅样品中检测到。乌梅药材代表性的¹H-NMR

图谱见图1[为了清晰地指明各化学成分的归属情况,特以NMR图谱的高场区(0.0~2.7 ppm)、中场区(2.8~4.7 ppm)和低场区(4.8~8.2 ppm)分别进行展示],19种鉴定化合物的特征信号化学位移及多重态见表2。

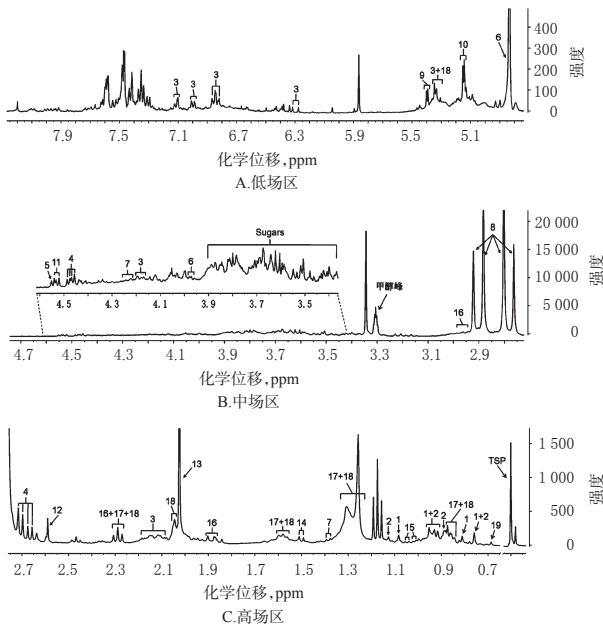


图1 乌梅药材的¹H-NMR图

Fig 1 ¹H-NMR of *P. mume*

表2 乌梅药材中的化学成分鉴定及信号归属

Tab 2 Identification of chemical constituents and signal attribution in *P. mume*

色谱峰序号	化学成分	特征信号(化学位移(ppm)及多重态)
1	熊果酸	1.08(s), 0.95(s), 0.93(s), 0.86(s), 0.85(s), 0.81(s), 0.76(s)
2	齐墩果酸	1.13(s), 0.95(s), 0.93(s), 0.92(s), 0.89(s), 0.76(s)
3	绿原酸	2.16~2.23(m), 5.34(m), 4.20(m), 5.10(m, J=2.0 Hz), 6.99(dd, J=2.0, 8.0 Hz), 6.30(d, J=16 Hz)
4	苹果酸	4.54(dd, J=4.8, 7.6 Hz), 2.69(dd, J=7.4, 16.0 Hz)
5	酒石酸	4.55(s)
6	琥珀酸	3.97(m), 3.69(m), 4.84(d, J=2.0 Hz)
7	乳酸	1.39(d, J=7.0 Hz), 4.28(q, J=7.0 Hz)
8	柠檬酸(枸橼酸)	2.78(d, J=15.6 Hz), 2.90(d, J=15.6 Hz)
9	蔗糖	5.39(d, J=3.8 Hz)
10	α-葡萄糖	5.15(d, J=3.6 Hz)
11	β-葡萄糖	4.53(d, J=8.0 Hz)
12	琥珀酸(丁二酸)	2.58(s)
13	醋酸	2.01(s)
14	丙氨酸	1.50(d, J=7.2 Hz)
15	缬氨酸	1.05(d, J=6.8 Hz), 1.01(d, J=6.8 Hz)
16	γ-氨基丁酸	1.90(m), 2.29(t, J=7.4 Hz), 3.04(m)
17	饱和脂肪酸类	0.88(m), 1.24~1.35(m), 1.57(m), 2.29(t, J=7.4 Hz)
18	不饱和脂肪酸类	0.88(m), 1.24~1.35(m), 1.57(m), 2.04(m), 2.29(t, J=7.4 Hz), 5.34(m)
19	甾醇类	0.69(s)

注:s表示单峰;d表示双峰;dd表示双二重峰;t表示三重峰;q表示四重峰;m表示多重峰

Note: s means singlet; d means doublet; dd means double doublet; t means triplet; q means quartet; m means multiplet

2.6 ¹H-NMR指纹图谱的建立及相似度评价

取10批乌梅药材样品,分别按“2.3”项下方法制备

供试品溶液,再按上述¹H-NMR条件进样测定后,通过MestReNova软件对各批次药材的¹H-NMR图谱,确定共有峰,并进行信号归属和化学成分鉴定,最终建立10批乌梅药材的¹H-NMR特征指纹图谱。以不同批次样品的积分面积为数据,以相关系数为测度,通过中位数矢量法计算得出多个¹H-NMR图谱的共有模式(对照图谱R),并以此共有模式为基准,利用Excel软件计算10批乌梅药材样品的相似度。结果,10批乌梅药材¹H-NMR指纹图谱的相似度均大于0.9,平均相似度为0.974,表明不同来源乌梅药材间的总体¹H-NMR图谱相似。其中,样品WM-2、WM-7、WM-10的相似度相对较低,提示这3批样品与其他样品有一定的差异。10批乌梅药材的¹H-NMR指纹图谱见图2,相似度评价结果见表3。

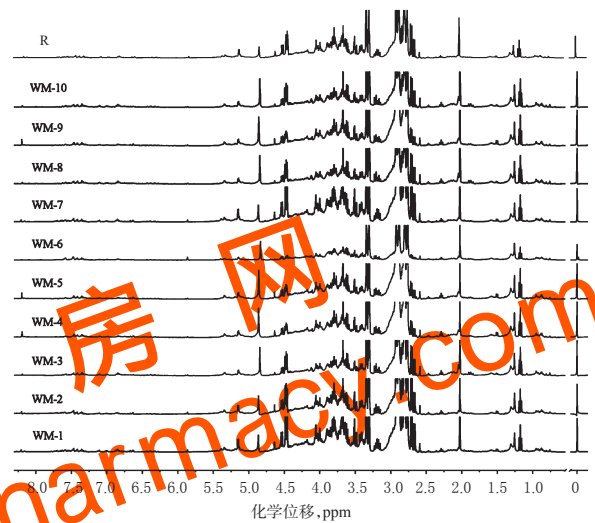


图2 10批乌梅药材的¹H-NMR指纹图谱

Fig 2 ¹H-NMR fingerprints of 10 batches of *P. mume*

表3 相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation of 10 batches of *P. mume*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
WM-1	0.992	WM-4	0.982	WM-7	0.954	WM-10	0.964
WM-2	0.942	WM-5	0.986	WM-8	0.985		
WM-3	0.978	WM-6	0.985	WM-9	0.975		

2.7 主成分分析

为了进一步评价不同来源乌梅药材的质量,将不同批次样品的¹H-NMR数据导入SIMCA-P 11.5软件进行主成分分析。数据采用中心化方法(Mean-centering and not scaling)进行尺度同一化处理。结果,前两个主成分的累积贡献率为90.3%[第一主成分的贡献率为73.2%,第二主成分的贡献率为17.1%]。样品WM-1、WM-4、WM-5、WM-6、WM-8聚为一类,表明这5批样品的化学成分更加相似;其他批次样品聚为一类,其中样品WM-2离中心点最远,表明其质量差异最大。主成分分析研究结果与相似度评价结果基本一致,表明所建立的¹H-NMR指纹图谱结合多元统计分析方法可用于乌梅药材的质量控制和评价。主成分分析的二维得分图见图3。

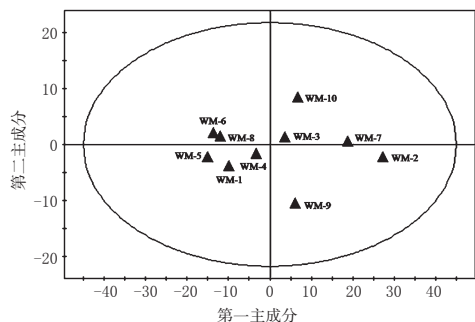


图3 乌梅药材主成分分析的得分图

Fig 3 PCA score plot of *P. mume*

3 讨论

目前,基于¹H-NMR分析技术的中药质量控制及评价采用的提取溶剂主要有水、甲醇、含水甲醇、氯仿等^[8],每种溶剂均有其独特的提取效果,实际应用中应根据目标成分的极性大小选择最佳的提取溶剂。在前期研究中笔者分别考察了CD₃OD-D₂O、CD₃OD、CDCl₃和D₂O作为提取溶剂的提取效果。结果,以D₂O为提取溶剂时主要提取出了柠檬酸和糖类成分,以CDCl₃为提取溶剂时可提取出更多低极性的脂肪酸类成分,但是两者对绿原酸、齐墩果酸等成分的提取效果均不好;以CD₃OD和CD₃OD-D₂O为提取溶剂能够得到更多的次生代谢产物,但CD₃OD对醋酸、糖类和氨基酸类成分的提取效果又相对较差。为了尽可能地提取乌梅中多种类型的化学成分,故最终选择以CD₃OD和D₂O的混合溶剂(1:0.3 V/V)进行药材提取。此外,为了防止由于化学成分浓度差异所引起的化学位移变化,特加入一定量的KH₂PO₄缓冲盐控制样品溶液的pH值。

乌梅药材含有多种生物活性成分,如齐墩果酸、熊果酸、柠檬酸等^[9]。由于这些成分的极性相差较大,采用HPLC等常规方法很难通过单次检测就同时分析出不同类型的化学成分,不能反映乌梅的整体质量和功效价值。本研究采用体现整体性的¹H-NMR分析技术,首次同时检测并分析了乌梅的整体化学成分,鉴定了包括五环三萜类、有机酸类、糖类等在内的19种成分,并首次发现了乌梅药材中含有乙酸、 γ -氨基丁酸和丁二酸这3种成分。本研究检测出的蔗糖、葡萄糖、丙氨酸、抗坏血酸为人体需要的基本营养物质;而 γ -氨基丁酸具有降血压、提高免疫力、延缓衰老等生理功能^[14];苹果酸能有效提高运动能力,并可抗疲劳和抗氧化^[15];绿原酸具有保护心脑血管、抗糖尿病及免疫调节等作用^[16];齐墩果酸和熊果酸具有改善胰岛素抵抗及调节血脂等多种生物活性^[17]。

本研究结果表明,¹H-NMR分析技术单次检测就能同时分析乌梅样品中的有机酸类、五环三萜类、糖类等活性成分,反映了乌梅药材的内在质量和药用价值。本文所建立的¹H-NMR方法具有体现整体性、重复性好、分析快速等优点,可为乌梅内在质量的控制和整体效应物质的全面检测奠定基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 79.
- [2] 张小琼, 侯晓军, 杨敏, 等. 乌梅的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3567-3570.
- [3] 杨莹菲, 胡汉昆, 刘萍, 等. 乌梅化学成分、临床应用及现代药理研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 415-418.
- [4] 范成杰, 刘友平, 陈鸿平, 等. 乌梅药材中齐墩果酸和熊果酸的高效液相色谱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1843-1844.
- [5] 陈战国, 恩伯提, 张志琪. RP-HPLC同时测定乌梅中8种有机酸含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1783-1786.
- [6] KIM HK, CHOI YH, VERPOORTE R. NMR-based metabolomic analysis of plant[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 536-549.
- [7] KOOY VDF, MALTESE F, CHOI YH, et al. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting[J]. *Planta Med*, 2009, 75(7): 763-775.
- [8] 范刚, 罗尚华, 李艳, 等. 基于¹H-NMR代谢组学技术的中药质量评价[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(9): 1862-1870.
- [9] LIU Y, FAN G, ZHANG J, et al. Metabolic discrimination of sea buckthorn from different Hippophae species by ¹H-NMR based metabolomics[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1585.
- [10] FAN G, ZHANG MY, ZHOU XD, et al. Quality evaluation and species differentiation of Rhizoma coptidis by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Anal Chim Acta*, 2012. DOI: 10.1016/j.aca.2012.08.038.
- [11] FAN G, LUO WZ, LUO SH, et al. Metabolic discrimination of Swertia mussotii and Swertia chirayita known as "Zangyinchen" in traditional Tibetan medicine by ¹H-NMR-based metabolomics[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.06.014.
- [12] 钱进, 肖草茂. 基于¹H-NMR共振技术对缙麦冬与绵麦冬化学成分的比较研究[J]. 中国药房, 2012, 23(23): 2161-2164.
- [13] 姜苗苗, 张宇, 冯毅凡. 银翘解毒液¹H-NMR指纹图谱研究[J]. 中成药, 2012, 34(4): 589-592.
- [14] 吴珊, 钟杨生, 陈芳艳, 等. γ -氨基丁酸的生理功能及研究开发进展[J]. 广东蚕业, 2016, 50(2): 30-31.
- [15] 吴军林, 吴清平, 张菊梅, 等. L-苹果酸的生物学功能研究新进展[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 225-228.
- [16] 魏明, 杨晓梅, 刘佳红, 等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2016, 37(4): 511-512.
- [17] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸调血脂、抗肥胖药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 90-97.

(收稿日期: 2018-05-28 修回日期: 2018-08-05)

(编辑: 林 静)