

低场-高场核磁联用分析缔合态对平肺方中芒果苷提取分离的影响

吴鑫¹, 左雯雯¹, 李存玉^{1,2}, 顾佳美¹, 彭国平^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 采用低场-高场核磁联用技术探索缔合态对平肺方中芒果苷提取、分离行为的影响。方法 以 1-脱氧野尻毒霉素(DNJ)-柠檬酸成分为对照, 以氢 T_2 弛豫时间及氢化学位移值的变化为指标, 采用低场核磁分析缔合态氢的弛豫特征, 结合高场核磁技术验证缔合物结构。结果 DNJ-芒果苷在溶液中以缔合态的形式存在, 相对分子质量增大, 从而抑制了成分从药材向溶液的迁移, 透过率下降, 图谱中 T_2 峰向左偏移, 高场核磁中化学位移也发生变化。结论 阐明了成分存在状态对芒果苷提取分离行为的影响机制, 为研究中药复方煎煮方法及机制探索提供了技术支撑。

关键词: 复方提取; 平肺方; 芒果苷; 缔合物; 核磁共振技术; T_2 弛豫时间

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1316-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.008

Effects of association state on decocting rate of mangiferin in Pingfei Decoction by using low-field and high-field NMR

WU Xin¹, ZUO Wen-wen¹, LI Cun-yu^{1,2}, GU Jia-mei¹, PENG Guo-ping^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To study the effects of association complexes on extraction and separation behavior of mangiferin in Pingfei Decoction by low-field and high-field NMR. **Methods** Using the T_2 relaxation time and chemical shifts value of hydrogen as index, and group DNJ-citric acid as control, the relaxation characteristics of hydrogen in association state was analyzed by low field NMR to verify the structure of association complexes combined with high-field NMR. **Results** DNJ and mangiferin existed in the form of association state with larger molecular weight, which inhibited the migration of components from medicinal materials to solution and caused lower transmittance. And the T_2 peak shifted to the left in the spectrum, and the chemical shift in the high field nuclear magnetic field also changed. **Conclusion** This experiment clarified the mechanism of the effect of presence of components on extraction and separation behavior of mangiferin and provided technical support for studying the decocting method and mechanism of Chinese herbal compound.

Key words: extraction of compound Chinese herbal medicine; Pingfei Decoction; mangiferin; association complex; nuclear magnetic technology; T_2 relaxation time

中药复方是指由两味或两味以上药味组成, 针对相对确定的病证而设的方剂, 是中医方剂的主体组成部分。其煎煮提取方法分为分煎、合煎, 但由于中药成分的复杂多样性, 相互作用规律不明确, 导致煎煮提取科学内涵不清, 引起制药行业争论^[1-2]。

中药复方提取效率与成分存在状态有关, 复杂

溶液环境中可分为游离态、缔合态、复合盐等, 因成分存在状态不同引起提取效率的差异性^[3]。基于成分存在状态及分子间作用力特征, 在前期探索平肺方提取工艺时发现, 加水量、煎煮次数、煎煮时间等因素的变化, 难以改善知母中芒果苷的提取率, 推测在复方煎煮提取过程中, 因成分存在状态的变

收稿日期: 2018-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(81503258); 国家自然科学基金(81373980); 国家自然科学基金(81603307); 江苏省高校自然科学基金(17KJB360010); 中药标准化项目“新生化颗粒的标准化建设”(ZYBZH-C-JS-34); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20151005)

作者简介: 吴鑫(1993—), 女, 硕士, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 18851823865 E-mail: wuxin4741@163.com

*通信作者 彭国平, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药成分分离精制及新药研究。Tel: (025)86798186 E-mail: guopingpeng@126.com

化抑制了芒果苷溶出^[4]。低场核磁共振技术通过检测成分结构中氢所处物理化学环境及存在状态决定了弛豫时间的长短^[5-7],可用于分析中药成分间的结构特征和相互作用行为,判断成分在溶液中的存在状态。

借助低场核磁检测技术优势并采用高场核磁相互佐证,基于缔合物或复合物的形成规律,对平肺方中的芒果苷和1-脱氧野尻毒霉素(DNJ)进行存在状态分析,并采用柠檬酸-DNJ复合盐为对照,以平肺方煎煮中缔合物存在状态为切入点,解析芒果苷复方提取效率低下的内在机制,为阐明中药复方提取的科学内涵提供新的科研思路与方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PQ001-20-010 型核磁共振成像分析仪(上海纽迈电子科技有限公司);NF-1812-S2 型膜分离实验装置(海安宏麦机械有限公司);聚醚砜超滤膜(截留相对分子质量 10 000),星达(泰州)膜科技有限公司;Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);FA 1004 型万分之一电子天平(上海安亭电子仪器厂);KH-250B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);Bruker Avance 400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

1.2 试剂与材料

芒果苷提取物(批号 FY161022,质量分数≥98%)购于郑州丰耀农业科技有限公司;DNJ 提取物(质量分数≥95%),实验室自制;L-苯丙氨酸(批号 201406,分析纯)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司;无水柠檬酸(批号 160801213U,分析纯)购于南京化学试剂股份有限公司;一水合柠檬酸(批号 110119-2,分析纯)、磷酸二氢钠(批号 110909,分析纯)购于西陇化工股份有限公司;磷酸氢二钠(批号 150715411E,分析纯)购于南京化工试剂股份有限公司;氢氧化钠(批号 160304,分析纯)西陇化工股份有限公司;氘代二甲基亚砜(DMSO-*d*₆,质量分数 99.9%,含 0.03%四甲基硅烷)和氘代水(D₂O,质量分数 99.9%)均购于美国 CIL 公司。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

知母饮片(批号 20151101)、人参饮片(批号 20151003)、丹参饮片(批号 20160201)、桑白皮饮片(批号 20160203)、地骨皮饮片(批号 20151202-Y)、甘草饮片(批号 20151103)、橘红饮片(批号 20160203)、天冬饮片(批号 20160201),

均购自安徽亳州。经南京中医药大学刘圣金副教授鉴定知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎;人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎;丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎;桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮;地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 或宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥根皮;甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎;橘红为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥外层果皮;天冬为百合科植物天冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根。以上均符合《中国药典》2015 年版相关要求。

2 方法与结果

2.1 供试品配制

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芒果苷对照品 2.65 mg 置 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶解并定容至刻度,制得质量浓度为 53.0 μg/mL 的芒果苷对照品溶液。

2.1.2 水煎液的制备 平肺方组成为地骨皮 30 g、甘草 15 g、丹参 30 g、人参 18 g、知母 30 g、桑白皮 30 g、橘红 30 g、天冬 30 g。称取该方中各药材及单一知母药材,加 10 倍量水,加热回流提取 2 次,1.5 h/次,合并提取液,浓缩 1.2 倍后离心,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得复方煎液及知母单煎液。

2.1.3 超滤原液的制备

(1)单一供试品溶液:称取芒果苷提取物适量、DNJ 提取物、无水柠檬酸适量,加纯化水配制成质量浓度为 0.10 mg/mL 的药液,超声 15 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

(2)混合溶液:以物质的量比 1:1 称取芒果苷提取物和 DNJ 提取物适量,加纯化水配制成芒果苷质量浓度为 0.10 mg/mL 的混合溶液,超声 15 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得芒果苷与 DNJ 的混合溶液。以物质的量比 1:1 配制无水柠檬酸与 DNJ 的复合盐溶液,无水柠檬酸质量浓度为 0.10 mg/mL,操作方法同上。

2.1.4 核磁样品的制备

(1)单一供试品溶液:分别称取芒果苷提取物、DNJ 提取物、L-苯丙氨酸、无水柠檬酸、一水合柠檬酸适量,加入 0.6 mL 的氘代试剂(D₂O-DMSO-*d*₆

90:10) 震荡溶解, 8 000 r/min 离心 5 min, 转移到 5 mm 核磁管中, 待测。

(2) 混合溶液的制备: 称取芒果苷提取物适量, 分别与 *L*-苯丙氨酸、DNJ 以及 NaOH 以物质的量比 1:1 混合, 以 0.6 mL 的氘代试剂 (D_2O -DMSO- d_6 90:10) 震荡溶解。称取 DNJ 提取物适量, 与无水柠檬酸以物质的量比 1:1 混合。称取 *L*-苯丙氨酸适量, 与芒果苷以物质的量比 1:1 混合, 以 0.6 mL 的氘代试剂 (D_2O -DMSO- d_6 90:10) 溶解。将上述样品溶液在 8 000 r/min 离心 5 min, 随后转移到 5 mm 核磁管中, 待测。

2.2 色谱条件^[8]

芒果苷: 流动相为乙腈-0.1%冰醋酸水溶液 (15:85); 检测波长为 258 nm; 色谱柱为 Heder ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}C$; 进样量为 10 μ L。无水柠檬酸: 流动相为磷酸二氢铵-磷酸盐缓冲液 (pH 3.0); 检测波长为 210 nm; 色谱柱为 Heder ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}C$; 进样量为 10 μ L。DNJ: 流动相为乙腈-6.5 mmol/L 醋酸铵水溶液 (85:15); 色谱柱为 Venusil HILIC (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); ELSD 漂移管温度为 105 $^{\circ}C$; 载气体积流量为 3.0 L/min; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}C$; 进样量为 10 μ L。

2.3 复方提取实验

根据成分种类进行拆方提取, 考察平肺方拆方配伍提取对芒果苷提取率的影响, 根据公式计算提取率。

$$E = VC/0.0080$$

E 为提取率, V 为滤液体积, C 为实际测得芒果苷质量浓度; 0.0080 为本次实验用知母中芒果苷的平均质量分数 (0.80%)

2.4 超滤实验

取浓度为 0.10 mg/mL 的芒果苷、DNJ、无水柠檬酸供试品溶液以及芒果苷与 DNJ、无水柠檬酸与 DNJ 配伍溶液, 选用孔径 10 000 超滤膜进行超滤 (操作温度 25 $^{\circ}C$, 操作压力 13.8 kPa), 将超滤膜装置的进液端、超滤端、截留端均放入装有供试品溶液的容器内, 平衡 4 倍溶液体积, 以排除膜对溶质的吸附^[9], 随后将容器内的溶液搅拌均匀, 取样为平衡液, 之后将超滤端取出进行滤液收集, 待超滤完全后混匀取样超滤液, 根据公式计算透过率 (T)。

$$T = C_{\text{超滤}}/C_{\text{平衡}}$$

$C_{\text{超滤}}$ 是超滤液中溶质的质量浓度, $C_{\text{平衡}}$ 是平衡液中溶质的质量浓度

2.5 核磁共振技术解析缔合态方法的建立

2.5.1 低场核磁 NMR 数据采集 利用 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 多脉冲回波序列测定样品的横向弛豫时间 (T_2)。将 4 mL 样品移入直径为 15 mm 的核磁共振专用试管中, 并将其置于样品槽内进行测定, 测定温度为 (32.0±0.1) $^{\circ}C$ 。设备参数设置如下: 共振频率为 21.295 MHz, 90°脉冲时间为 2.8 μ s, 180°脉冲时间为 5.4 μ s, 重复采样次数 (NS) 为 4, 回波个数 (NECH) 为 1 800, 重复采样等待时间 (TW) 为 6 000 ms, 回波时间 (TE) 为 0.6 ms, 模拟增益 (RG1) 为 20, 前置放大增益 (PRG) 为 2, 数字增益 (DRG1) 为 3; 每个样品重复测定 2 次, 求取平均值, 作为该组样品的检测结果。测试后, 使用 T_2 反演软件, 使用 SIRT 算法 100 000 次迭代拟合, 得到谱图结果。

2.5.2 高场核磁 NMR 数据采集 1H 图谱由 Bruker Avance 400 核磁共振波谱仪在恒温 (25 $^{\circ}C$) 下采集得到。实验采用 zg30 脉冲序列, 具体参数设置如下: 谱宽 (SWH) 为 8 223; 采样点数 (TD) 为 65 000; 采样时间 (AQ) 为 3.98 s; 弛豫延迟时间 (D1) 为 1 s; 采样次数 (NS) 为 16 次; 增益 (RG) 为 124。

2.6 结果与分析

前期在考察平肺方提取工艺的时候, 发现知母中芒果苷合煎提取率相较单煎提取率降低很多, 因此进行拆方分析, 考察知母单煎进行比较。

2.6.1 复方及知母单煎对芒果苷提取率的影响 将平肺方整方合煎以及知母单煎, 通过液相检测, 比较芒果苷提取率, 相关提取率见表 1。

由表可知, 复方合煎知母中芒果苷的提取率不足单煎提取的一半, 推测在整方提取过程中, 处方中其他药味的某些成分在提取时影响了芒果苷向溶剂中迁移。复方药材中皂苷、酚酸及生物碱类成分

表 1 复方提取对芒果苷提取率的影响

Table 1 Extraction rate of mangiferin under different conditions

组别	药材组成	$E/\%$
复方合煎	知母、地骨皮、甘草、丹参、 人参、桑白皮、橘红、天冬	43.05
知母单煎	知母	93.21
知母-酚酸类中药	知母、橘红、丹参	52.66
知母-碱基类中药	知母、地骨皮、桑白皮	28.93
知母-皂苷类中药	知母、人参、甘草、天冬	90.15

均会抑制芒果苷溶出,选取芒果苷和生物碱类成分 DNJ 以透过率为指标,进行存在状态分析,并采用柠檬酸-DNJ 复合盐作为对照,以解析复方提取芒果苷效率低下的机制。

2.6.2 复合物膜分离行为研究 选取芒果苷与 DNJ 作为研究对象,以柠檬酸-DNJ 复合盐作为对照,用以分子筛为原理的膜分离技术对芒果苷、DNJ、柠檬酸及其芒果苷-DNJ 复合物、柠檬酸-DNJ 复合盐水溶液进行分离滤过,并分析其存在状态,以解析芒果苷复方提取效率低下的机制,结果见表 2。通过高效液相色谱检测,在以 T 为指标分析 2 类复合物的超滤行为中,发现芒果苷、DNJ 和柠檬酸三者单独超滤时 T 均在 80% 以上,而将 DNJ 分别与芒果苷、柠檬酸混合溶解后滤过,其透过率却有所下降。其中芒果苷与柠檬酸所配伍生成的复合盐 T 下降 20% 以上,而 DNJ 与芒果苷形成的复合物则降低超过了 50%。由此推测平肺方煎煮时芒果苷的提取率低是由于弱碱性成分与芒果苷形成这种特殊复合物,抑制了该成分从植物细胞中迁出。故采用低场-高场核磁共振技术对该复合物的结构特征进行具体解析。

表 2 2 种复合物超滤行为对比研究

Table 2 Comparison on permeating behavior of two complexes

成分	$T/\%$
芒果苷	82.4
DNJ	95.3
无水柠檬酸	94.6
芒果苷-DNJ	36.2
无水柠檬酸-DNJ	68.5

2.6.3 缔合物存在状态低场核磁技术表征

(1) 无水柠檬酸、一水合柠檬酸 T_2 弛豫图谱分析: T_2 弛豫时间(自旋-自旋弛豫时间)反映出样品氢所处的化学环境,与其所受的束缚力有关,而氢束缚程度又与样品内部结构密不可分^[10]。本实验对结晶水的典型缔合态进行结构表征的方法学探索,为缔合物的状态表征研究提供方法与思路。其中无水柠檬酸、一水合柠檬酸结晶水分子上的氢键较为典型,检测结果见图 1。

低场核磁共振法测定所得柠檬酸图谱中有多个峰,来自于不同运动状态的氢核。其中一水合柠檬酸的 T_2 图谱比无水柠檬酸多出 2 个小峰,分别对应

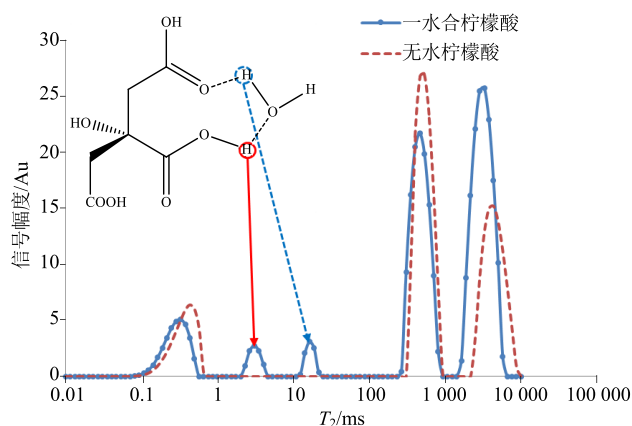


图 1 无水柠檬酸和一水合柠檬酸 T_2 弛豫时间图谱

Fig. 1 Distribution of LF-NMR T_2 relaxations time in anhydrous citric acid and citric acid monohydrate

为一水合柠檬酸上羧基和羟基这 2 种缔合水分子的弛豫氢,并由于水与羰基、羧基形成氢键的强度不同,导致 2 个缔合氢的弛豫时间也有所不同。同样,测定不同芒果苷缔合物中缔合氢的弛豫时间,从而分析芒果苷酚羟基的氢及配伍化合物缔合氢键上氢的特征。

(2) 芒果苷及其缔合物 T_2 弛豫图谱分析:在相同参数条件下,对 DNJ 和芒果苷与 DNJ 的混合物进行检测获得多组分 T_2 对比弛豫图谱,并分析芒果苷在平肺方提取过程中成分之间的相互作用特征,结果见图 2。

观察发现, DNJ 与芒果苷混合后主体 T_2 峰向左移且信号幅值降低。这是由于芒果苷的加入分子间

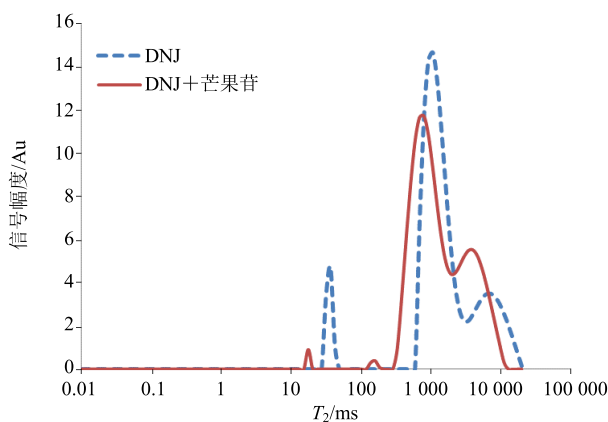


图 2 DNJ 和 DNJ+芒果苷 T_2 图谱对比

Fig. 2 Comparison on relaxation time distributions obtained in case of DNJ and mixture of DNJ + mangiferin samples

作用力增强, 氢束缚力增大, 导致分子运动变慢, 体系分布更均一且更易受外界环境的影响, T_2 时间变短。而芒果苷与 DNJ 的酸碱性决定二者无法以复合盐的形式存在, 因此判定芒果苷与 DNJ 以缔合态的形式在水溶液中存在。

从图 2~3 中可以看出, 单一化合物和芒果苷缔合物氢的 T_2 弛豫时间相比不同, 芒果苷缔合物的弛豫时间比单一化合物短, 说明芒果苷缔合物形成后分子间作用力增强, 氢束缚力增大, 从而造成低场核磁图谱中氢弛豫时间缩短。

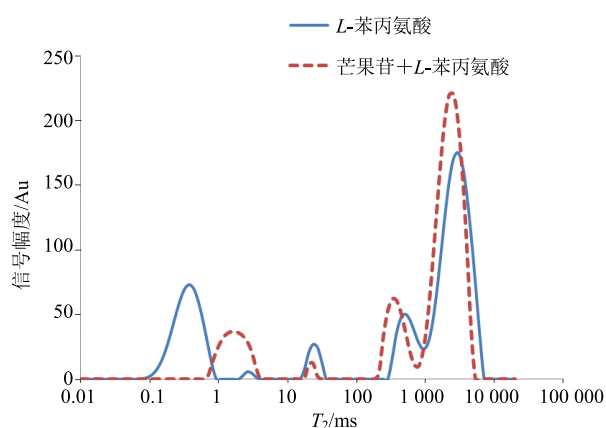


图 3 L -苯丙氨酸和芒果苷+ L -苯丙氨酸 T_2 图谱对比

Fig. 3 Comparison on relaxation time distributions obtained in case of phenylalanine and mixture of phenylalanine + mangiferin samples

2.6.4 缔合物结构高场核磁技术解析 复合盐(复合物)与缔合态(缔合物)核磁特征区别: 中药复合盐主要是由酸碱对药结合生成, 大多以离子对的形式存在。与复合盐不同, 缔合物是分子态物质通过氢键等较弱的分子间作用力结合而产生, 复合物与缔合物因不同的结合方式而产生不同强度的作用力。 $^1\text{H-NMR}$ 被广泛用于化合物结构解析^[11-13], 通过该技术离子作用力和氢键的差异可以被进一步解释, 并在氢谱图中表现出一定的差异。

实验首先选用无水柠檬酸与 DNJ 制成复合盐、芒果苷与 DNJ 制成缔合物, 将无水柠檬酸、DNJ 以及芒果苷分别溶于氘代水, 并用 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲盐溶液将其调至与混合物相同的 pH 环境, 观察典型酸碱复合物之间离子作用力以及缔合物氢键作用力的氢谱特征。相关物质结构及氢谱图见图 4、5, DNJ 提取物的氢谱 (400 MHz, D_2O) δ : 2.32 (1H, dd, $J = 12.4, 10.8$ Hz, H-1), 2.41 (1H, ddd, $J = 2.8, 6.3, 9.6$ Hz, H-5), 2.98 (1H, dd, $J = 5.2,$

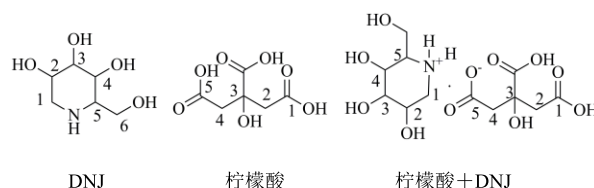


图 4 相关物质结构式

Fig. 4 Structural formula of matter chemistry

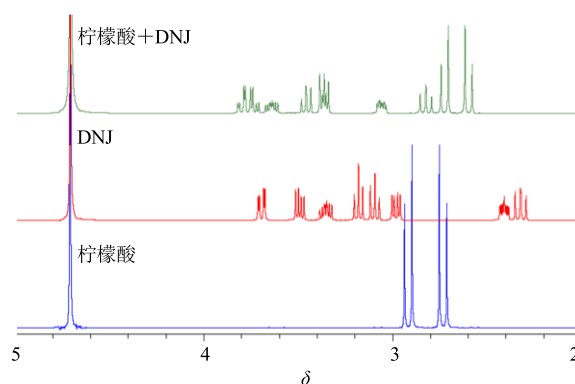


图 5 无水柠檬酸、DNJ 以及无水柠檬酸 DNJ 复合盐的核磁共振氢谱图

Fig. 5 ^1H NMR spectra of citric acid anhydrous, DNJ and compound salt of DNJ and citric acid anhydrous

12.4 Hz, H-1a), 3.09 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-4), 3.18 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-3), 3.35 (1H, ddd, $J = 5.2, 9.6, 10.8$ Hz, H-2), 3.49 (1H, dd, $J = 6.3, 11.7$ Hz, H-6b), 3.69 (1H, dd, $J = 2.8, 11.7$ Hz, H-6a)。无水柠檬酸的氢谱 (400 MHz, D_2O) δ : 2.73 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-b), 2.83 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-a)。

DNJ 氢谱特征变化见图 6, DNJ 与无水柠檬酸结合生成盐, 其亚氨基上的氮离子化, 使其邻碳上的氢向低场明显移动。

芒果苷在水溶液中的溶解性较差, 故将其用少量 $\text{DMSO-}d_6$ 助溶后加入氘代水 ($\text{D}_2\text{O-DMSO-}d_6$ 90:10), 随后加入 DNJ 混合。芒果苷提取物的氢谱化学位移 (400 MHz, $\text{D}_2\text{O-DMSO-}d_6$ 90:10) 如下: δ 3.12~3.20 (3H, m, H-3', 4', 5'), 3.43 (1H, dd, $J = 5.1, 11.0$ Hz, H-6'b), 3.66 (1H, d, $J = 2.0, 11.0$ Hz, H-6'a), 3.87 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, 2'-OH), 4.05 (1H, t, $J = 2.0, 11.0$ Hz, H-2'), 4.57 (1H, s, 6'-OH), 4.66 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-1'), 4.95 (2H, s, 3', 4'-OH), 6.37 (1H, s, H-4), 6.87 (1H, s, H-5), 7.38 (1H, s, H-8), 9.94 (1H, s, 3-OH), 10.78 (2H, s, 6, 7-OH), 13.75 (1H, s, 1-OH)。相关物质结构及氢谱位移图见图 7、8。

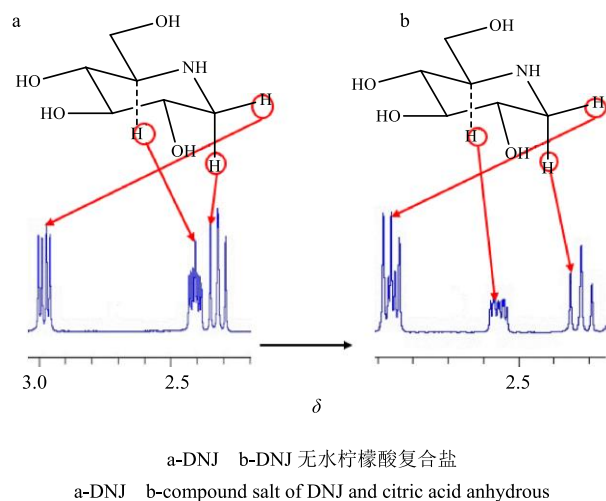


图 6 DNJ 以及 DNJ 与无水柠檬酸形成的复合盐化学位移变化

Fig. 6 Chemical shift differences in ^1H NMR spectra of DNJ and compound salt of DNJ and citric acid anhydrous

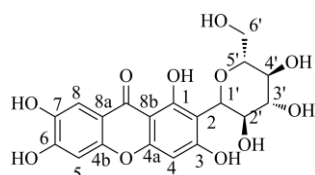


图 7 芒果苷结构

Fig. 7 Chemical structure formula of mangiferin

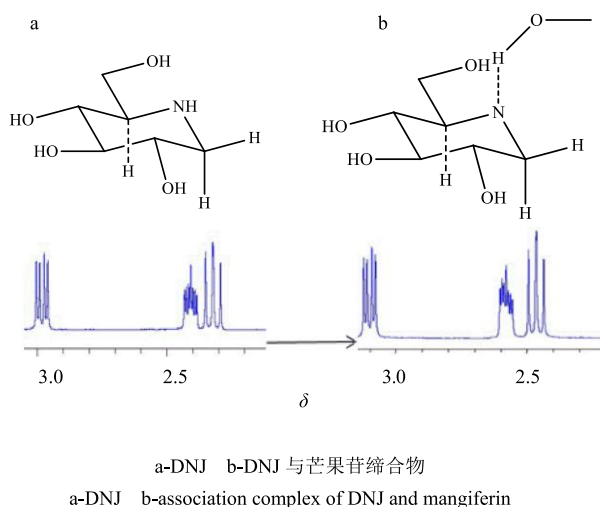


图 8 核磁位移对比

Fig. 8 Chemical shift differences in ^1H NMR spectra of two compounds

从图 8 可发现, DNJ 与芒果苷结合后, 亚氨基与其邻碳上的氢的化学位移向低场稍微移动。这是由于氮与芒果苷上的酚羟基形成氢键后, 氢核外的

电子云密度降低, 由此产生了去屏蔽效应, 这与复合盐中的亚氨基有明显区别。复合盐中主要存在离子作用力, 而缔合物则主要通过氢键作用相互连接而成。离子键作用力一般强于氢键, 因此在碳谱中化学位移值也存在明显区别。将芒果苷分别与 DNJ 以及 NaOH 配伍, 选用 $\text{DMSO}-d_6$ 溶解后进行核磁共振谱检测, 从碳化学位移变化角度考察芒果苷与 DNJ 结合情况。由表 3 发现, 加入 DNJ 后芒果苷 δ_{4b-C} 值向低场位移 1.35, δ_{6-C} 值低场位移 5.04, δ_{7-C} 值向低场位移 1.46, δ_{8a-C} 值向高场位移 2.89, $\delta_{C=O}$ 值向高场位移 5.74。而芒果苷与 NaOH 配伍后芒果苷 C-4b、C-6、C-7、C-8a 以及羰基碳 δ 值同样发生变化。芒果苷与 NaOH 配伍成盐后位移变化明显, 并且 C-6、C-7 位移差值大于芒果苷与 DNJ 配伍, 侧面表明芒果苷与 DNJ 之间并没有以较强的离子作用力结合。综合考虑, 推断出 1 分子芒果苷与 2 分子 DNJ 以氢键形式结合形成缔合物。DNJ 上醇羟基与芒果苷 6、7 位上酚羟基形成氢键, 吸电子效应使得酚羟基碳核外围电子云密度降低, 因此 C-6、C-7 化学位移值向低场位移。芒果苷羰基与 DNJ 形成氢键, 共轭双键断裂, 羰基碳电子云密度增大, 化学位移值向高场位移。

3 讨论

本研究以芒果苷为对象, 首次通过低场核磁共振技术检测中药缔合态成分弛豫氢质子的特征, 考察氢

表 3 ^{13}C -NMR 化学位移变化

Table 3 ^{13}C -NMR chemical shifts of mangiferin

碳位	δ		
	芒果苷	芒果苷+DNJ	芒果苷+NaOH
1-C	161.75	161.69	163.49
2-C	107.59	105.49	102.45
3-C	163.80	163.60	164.53
4-C	93.27	93.14	93.00
4a-C	156.19	156.01	155.80
8b-C	101.27	101.00	99.75
4b-C	150.74	152.09	153.70
5-C	102.60	101.31	100.63
6-C	153.96	159.00	161.60
7-C	143.68	145.14	146.53
8-C	108.06	107.25	105.46
8a-C	111.71	108.82	108.84
C=O	179.06	173.32	177.29

键强弱;并结合高场核磁分析缔合氢键引起的化学变化,探究缔合物结构特征。平肺方中芒果苷是黄酮醇类结构,分子平面结构影响其提取效率,与DNJ形成缔合物,相对分子质量增加,进一步抑制了其提取行为。同时,基于分子筛分原理的膜分离过程中,芒果苷-DNJ缔合物透过率的大幅下降进一步验证了其存在状态对提取、分离行为的影响。

为了进一步分析成分结构、存在状态对提取过程中的影响规律,下一步选取酚酸、生物碱、黄酮、氨基酸类成分,进行配比效应研究,筛选多个缔合态寻找大量缔合态配对成分,低场核磁解析缔合态质子特征,高场核磁解析缔合态结构。

通过分析缔合态对成分提取率的影响,探索了成分存在状态改变溶解特征从而影响其提取过程中由植物组织向溶液的迁移变化的特征。缔合态是中药溶液中成分离子形成复盐外最重要的中药成分结合形式,通过对中药复方配伍引起的理化性质变化与溶液成分存在状态的相关性研究,结合低场-高场核磁联用技术,为中药复方配伍效应及制药工艺影响研究提出新的思路与方法,对中药复方汤药临床合煎、另煎及制剂生产工艺的制定具有重要意义。

参考文献

- [1] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展 (II)——中药单煎与合煎对比研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 240-245.
- [2] 邓轶渊,高文远,陈海霞,等. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1909-1911.
- [3] 彭国平. 中药制药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [4] 姜 苏,陈亚军,郑云枫,等. 双参平肺方中药味配伍对知母芒果苷提取率的影响与成分作用探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(6): 581-584.
- [5] Shao J H, Deng Y M, Song L, *et al.* Investigation the effects of protein hydration states on the mobility water and fat in meat batters by LF-NMR technique [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 66: 1-6.
- [6] 段文娟,李 月,崔 莉,等. 低场核磁共振及成像技术分析白芍炮制过程中水分变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2092-2096.
- [7] Fundo J F, Amaro A L, Madureira A R, *et al.* Fresh-cut melon quality during storage: An NMR study of water transverse relaxation time [J]. *J Food Eng*, 2015, 167: 71-76.
- [8] 邓树强,陈彩瑜. HPLC 法测定知柏地黄丸中芒果苷的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24(32): 3054-3055.
- [9] 李存玉. 超微孔过滤原理的研究与应用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [10] Fullerton G D, Potter J L, Dornbluth N C. NMR relaxation of protons in tissues and other macromolecular water solutions [J]. *Magn Reson Imag*, 1982, 1(4): 209-226.
- [11] 栗进才,黄 鹏. 天然产物白藜芦醇的 ^1H -NMR 图谱中顺反式结构分析 [J]. 广州化工, 2016, 44(3): 109-110.
- [12] 蓝 蓉,陶 炳. 分子动力学模拟研究温度对甲醇缔合体系中氢键和弱氢键作用的影响 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2008, 27(1): 1-4.
- [13] 史 晗,常宗明,尹 花,等. 高浓酿造后稀释啤酒中氢键缔合体系的初步研究 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 6-11.