

同时测定复方阿胶浆中间体中 17 种化学成分的定量核磁方法

谢欣媛, 杨嘉誉, 潘坚扬, 瞿海斌*

浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: **目的** 建立定量核磁方法, 同时测定复方阿胶浆 (Compound E'jiao Jiang, CEJ) 的药材提取液中多类成分的含量, 为中间体的质量评价提供可靠的分析手段。**方法** 采用水信号预饱和脉冲序列 Noesygppld 采集样品的 ¹H-NMR 图谱。通过文献调研、数据库检索以及加标实验的方式进行核磁谱峰归属。进一步确定各化合物的定量峰, 采用内标法定量。开展方法学考察, 考察项包括线性、精密度、稳定性、重复性、耐用性、准确度。另基于核磁共振氢谱的信噪比确定方法的检测限和定量限, 并对 3 批中间体样本进行分析。**结果** 共指认 22 种化合物, 其中 17 种可同时定量分析, 包括缬氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、焦谷氨酸、 γ -氨基丁酸 5 种氨基酸, 乙酸根、富马酸根、丙酮酸根、琥珀酸根、甲酸根、乳酸 6 种小分子有机酸根, 葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖 4 种糖类以及尿苷、胆碱。线性考察结果得出相关系数均不小于 0.9995, 精密度考察结果显示, RSD 均小于 2.7%, 重复性考察 RSD 均小于 2.5%, 耐用性及稳定性考察 RSD 均小于 2.6%, 加样回收实验得出平均回收率为 90.0%~105.0%、RSD 小于 2.2%, 分析值与参考值平均相对偏差小于 4.0%。对 3 批样品进行定量分析, 17 种成分的测定结果均高于定量限, 且满足线性范围。3 批样品可定量部分占总固体含量的质量分数分别为 71.09%、84.44%、70.09%。**结论** 各方法学考察均满足要求; 研究开发的定量核磁方法检测时间短、制样方式简单, 能有效提高分析效率, 为 CEJ 的生产过程物质转移规律研究打下基础。

关键词: 核磁共振; ¹H-qNMR; 定量方法; 多类成分; 复方阿胶浆; 质量评价; 缬氨酸; 丙氨酸; 异亮氨酸; 焦谷氨酸; γ -氨基丁酸; 乙酸根; 富马酸根; 丙酮酸根; 琥珀酸根; 甲酸根; 乳酸; 葡萄糖; 果糖; 半乳糖; 蔗糖; 尿苷; 胆碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1532-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.012

Quantitative NMR method for simultaneous determination of 17 chemical components in intermediate of Compound E'jiao Jiang

XIE Xinyuan, YANG Jiayu, PAN Jianyang, QU Haibin

Institute of Pharmaceutical Informatics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To establish a quantitative nuclear magnetic resonance (NMR) method for simultaneous determination of multiple components of extract solutions in the production of Compound E'jiao Jiang (复方阿胶浆, CEJ), in order to provide a reliable analytical means for the quality evaluation of midbody. **Method** The ¹H-NMR spectra of the samples were acquired using the water suppression pulse sequence Noesygppld. Peak assignments of the NMR spectra were performed through literature research, database retrieval, and spiking experiments to further determine the quantitative peaks of each compound. Compounds were quantified via an internal standard method, with methodological validation encompassing linearity, precision, stability, repeatability, durability, and accuracy. Detection and quantification limits were based on the signal-to-noise ratio of the proton NMR spectra. Three batches of intermediaries were analyzed. **Results** A total of 22 compounds were identified, among which 17 compounds could be simultaneously quantitatively analyzed. These compounds include five amino acids (valine, proline, isoleucine, glutamic acid, and γ -aminobutyric acid), six organic acids (acetate, fumarate, pyruvate, succinate, formate, and lactate), four sugars (glucose, fructose, galactose, and sucrose), uridine and choline. Linearity showed correlation coefficients above 0.9995. Precision, repeatability, durability, and stability reflected RSDs below 2.7%. Spike recovery tests indicated an average recovery rate between 90.0% and 105%, with an RSD below 2.2%. Relative deviations between analyzed and reference values were under 4.0%. Quantitative analysis for three batches of samples

收稿日期: 2023-08-07

基金项目: 国家中医药管理局“组方中药与智能制药多学科交叉创新团队”项目 (ZYXCXTD-D-202002)

作者简介: 谢欣媛, 博士研究生, 研究方向为中药质量分析。E-mail: xiexy96@zju.edu.cn

*通信作者: 瞿海斌, 博士生导师, 教授, 从事中药制药过程质量控制研究。E-mail: quhb@zju.edu.cn

showed that the determined results for all 17 components were above the quantification limit and within the linear range. The mass fraction of the quantifiable portion relative to the total solid content was 71.09%, 84.44%, and 70.09%, respectively. **Conclusion** Our method met stringent standards, with expedited detection and streamlined sample preparation, enhancing analytical efficiency and elucidating material transfer during its production.

Key words: nuclear magnetic resonance; ^1H -qNMR; quantitative method; multiple components; Compound E'jiao Jiang; qualitative assessment; valine; proline; isoleucine; glutamic acid; γ -aminobutyric acid; acetate; fumarate; pyruvate; succinate; formate; lactate; glucose; fructose; galactose; sucrose; uridine; choline

核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 波谱法能同时提供定性和定量信息, 是一种非靶向分析工具。其定量基本原理是信号强度与产生特定共振的原子核数量成正比。通过向样本中加入已知浓度内标化合物, 可以基于该比例关系实现相对定量, 或结合摩尔质量换算实现绝对定量^[1]。近年来, 定量质子核磁共振 (quantitative nuclear magnetic resonance, ^1H -qNMR) 技术在制药、代谢组学、食品等领域有着广泛的应用^[2-6]。 ^1H -qNMR 具有样品制备简便、分析过程中不破坏样品、无需被测物对照品的特点, 虽然其灵敏度低于质谱技术, 但上述特点使其比常规色谱技术更便捷、快速, 适用于混合物分析^[7], 因此, 在中药质量评价研究中具有优势^[8-10]。

复方阿胶浆 (Compound E'jiao Jiang, CEJ) 源自明代医家张介宾《景岳全书》中的两仪膏, 是一种补益剂, 临床用于治疗气血两虚证^[11]。其制备工艺的第一步是合并煎煮红参、党参、熟地黄和山楂, 得到提取液。阿胶则单独加水煮沸, 得到胶液。胶液与上述提取液混合后用碳酸钠调整 pH 值, 滤过后浓缩至指定密度, 再进行酸碱调节和滤过, 最终得到成品制剂^[12]。

为探究生产过程中物质传递规律, 确定会导致显著成分变化的工艺环节, 需对中间体进行全成分分析。提取环节将化学成分从药材转移至溶剂, 故提取液是物质传递规律研究的起点。提取液中化学成分可分为植物初级代谢产物、植物次级代谢产物和无机盐离子 3 大类, 其中初级代谢产物的含量最高, 包括氨基酸、小分子有机酸、核苷等化合物。目前报道的定量方法, 均以药效相关的植物次级代谢产物为主^[13-17], 全成分视角尚且欠缺。

本研究基于 ^1H -qNMR 技术开发了一种同时对其提取液中 17 种化学成分准确定量的方法。该方法检测时间短、制样方式简单, 能实现更全面的定量分析, 为 CEJ 的生产过程物质转移规律研究打下基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Bruker Avance III 600 型核磁共振光谱仪, 德国布鲁克公司, 配 24 位自动进样器与 5 mm BBO 探头, Topspin 工作站; XS105 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 5425 型高速离心机、Multipette M4 手动连续分液器、Research plus 移液器, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 试剂

3 批 CEJ 的 4 味药材提取液样本 (中间体) 由东阿阿胶股份有限公司提供, 批号分别为 1907075、1909010、2020616。3-(三甲基硅基)氘代丙酸钠 (TSP, 批号 SZBA183XV, 质量分数 $\geq 99\%$)、氘代水 (D_2O , 氘质量分数 $\geq 99.9\%$)、缬氨酸 (批号 P500172, 质量分数 98.9%)、异亮氨酸 (批号 P500099, 质量分数 98.9%)、丙氨酸 (批号 P500110, 质量分数 98.9%)、苏氨酸 (批号 P500242, 质量分数 99.9%)、 γ -氨基丁酸 (批号 BCCC4017, 质量分数 $\geq 99\%$)、焦谷氨酸 (批号 BCCB9703, 质量分数 $\geq 99\%$)、丙酮酸 (批号 G2119085, 质量分数 $\geq 98\%$, 20 $^\circ\text{C}$ 下密度 1.267 g/mL)、尿苷 (批号 SLCB8621, 质量分数 $\geq 99\%$) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。乳酸 (批号 200617, 质量分数 98.30%)、乙酸钠 (批号 190810, 质量分数 99.80%)、柠檬酸 (批号 211019, 质量分数 99.80%)、琥珀酸 (批号 200524, 质量分数 99.61%)、氯化胆碱 (批号 201028, 质量分数 99.53%)、葡萄糖 (批号 200323, 质量分数 99.80%)、果糖 (批号 210519, 质量分数 99.80%)、蔗糖 (批号 190825, 质量分数 98.83%)、半乳糖 (批号 191016, 质量分数 99.37%)、富马酸 (批号 190914, 质量分数 99.47%)、甲酸钙 (批号 200805, 质量分数 99.35%) 均购自上海融禾医药科技有限公司。去离子水由纯化水系统 Milli-Q Synthesis (美国 Millipore 公司) 制备得到。

2 方法与结果

2.1 样品制备

精确称取 50 mg TSP 于 100 mL 量瓶中, 用 D_2O

定容至刻度，混合均匀，得到含 0.5 mg/mL TSP 的 D₂O 溶液。将提取液 11 000 r/min 离心 13 min，取上清，与水以体积比 1 : 5 混合得到样品液。精密移取 540 μL 样品液与 60 μL 含 0.5 mg/mL TSP 的 D₂O 溶液混合均匀，并转移入 5 mm 标准核磁管中，即得 NMR 样品。

2.2 分析参数

使用 Bruker Avance III 600 型核磁共振光谱仪记录所有样品的 ¹H-NMR 图谱，光谱仪频率为 600.13 MHz，测定温度为 298 K。采用脉冲序列 zg30 优化中心频率 (O1)，采用水信号预饱和脉冲序列 Noesygppr1d 采集样品的 ¹H-NMR 图谱。

具体采集参数如下：采样数据点 32 768，谱宽 (SW) 7 211.539 Hz，中心频率 (O1) 2 828.63 Hz，90°脉冲宽度 (P1) 14.40 μs，弛豫延迟时长 (D1) 15.00 s，混合时间 (D8) 0.05 s，采集时间 (AQ) 2.27 s，接收器增益 (RG) 为 50.8，扫描次数 (NS) 为 32，空扫次数 (DS) 为 4。

2.3 数据处理

在 TopSpin 3.6.5 (Bruker Bio Spin) 工作站中对得到的 ¹H-NMR 图谱进行初步处理。首先用窗口函数并进行傅里叶变换，其中窗口函数选择指数函数模式，线宽 (LB) 取 0.3 Hz。以 TSP 信号峰 (δ 0.00) 为参考，校正化学位移，并进一步进行手动相位校正和基线校正。

将完成上述处理的图谱数据导入 MestReNova 14.0.0 (Mestrelab Research S. L.) 软件中。首先进行多点基线校正，算法选择 Smooth Segments，再用“线性拟合”方法对定量峰和内标峰 (TSP) 进行积分，后根据式 (1) 计算各待测成分质量浓度^[18]。

$$C_x = A_x N_{TSP} M_x C_{TSP} / A_{TSP} N_x M_{TSP} \quad (1)$$

C_x 和 C_{TSP} 分别是待测化学成分和内标 TSP 的质量浓度， A_x 和 A_{TSP} 分别是待测化学成分和内标 TSP 的特征峰面积， N_x 和 N_{TSP} 分别是待测化学成分和内标 TSP 的特征峰质子数， M_x 和 M_{TSP} 分别是待测化学成分和内标 TSP 的相对分子质量

2.4 图谱信号峰指认与定量峰选择

前期对红参、党参、熟地黄和山楂分别进行了水提，并采集 ¹H-NMR 图谱进行定性分析。本研究通过文献调研，结合前期定性分析结果，初步确定中间体的化学成分组成。在此基础上，通过数据库 (Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca/>) 检索以及标准品图谱比对的方式，进行中间体的核磁共振峰归属，最后通过对照品加标法对指认结果进行

确认。从 ¹H-NMR 图谱 (图 1) 中共归属出 22 种化合物，包括 7 种氨基酸 (峰 1 亮氨酸、峰 3 异亮氨酸、峰 2 缬氨酸、峰 5 苏氨酸、峰 6 丙氨酸、峰 8 焦谷氨酸、峰 9 γ-氨基丁酸)，7 种小分子有机酸 (峰 4 乳酸、峰 7 乙酸根、峰 11 琥珀酸根、峰 12 柠檬酸根、峰 10 丙酮酸根、峰 21 富马酸根、峰 22 甲酸根)，6 种糖类 (峰 14 葡萄糖、峰 16 果糖、峰 17 蔗糖、峰 18 半乳糖、峰 15 甘露三糖、峰 19 水苏糖) 和 2 种核苷类成分 (峰 13 胆碱、峰 20 尿苷)。谱峰指认结果见图 1，各化合物按峰化学位移顺序进行编号。

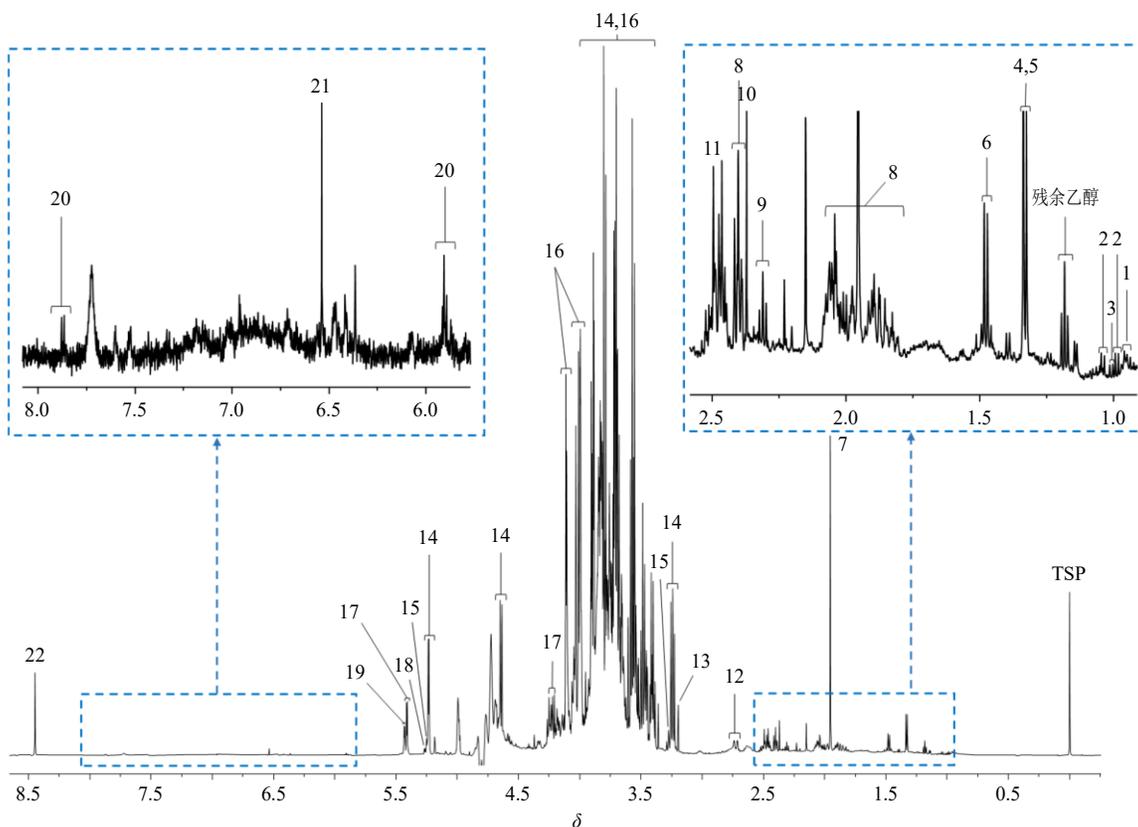
逐一为成功归属的化合物选定定量峰。为保证定量结果的可靠性，要求定量峰的信噪比不小于 10。最理想的定量峰应不与其他无关化合物峰重叠。由于中药为复杂混合物，常含有十余种甚至数十种组分，导致 ¹H-NMR 图谱较为拥挤，实际定量工作中难以找到最理想的定量峰。对于重叠部分少的峰，若其积分受到的干扰非常小，则亦可选为定量峰。若化合物有多组峰，则优先选择响应更高的峰作为定量峰。葡萄糖、果糖、半乳糖在水溶液中存在不同构型，不同构型间会相互转化且处于动态平衡之中。为得到可靠的定量结果，以不同构型对应峰的峰面积之和来进行计算^[19-20]。发现 β-半乳糖对应的 δ 4.58 处的双峰受水峰压制影响，出现了严重的峰形扭曲，且存在较多重叠，无法用于定量。因此，选择 α-半乳糖对应的 δ 5.27 处的双峰作为定量峰。本研究在相同条件下分析已知准确质量浓度的 D-半乳糖溶液，通过式 (2) 换算，得出该定量峰实际对应的质子数，用于后续计算。最终为 17 个化合物选定定量峰，各定量峰的峰型及位置如图 2 所示，具体参数以及化学结构中对应的氢原子见表 1 和图 3，同一化合物编号与图 1 相同。

$$N_x = A_{Gal} C_{TSP} M_{Gal} N_{TSP} / A_{TSP} C_{Gal} M_{TSP} \quad (2)$$

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

将缬氨酸、异亮氨酸、乳酸、丙氨酸、乙酸钠、γ-氨基丁酸、焦谷氨酸、琥珀酸、氯化胆碱、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、尿苷、富马酸、甲酸钙对照品置于装有五氧化二磷 (P₂O₅) 的干燥器中，减压干燥 24 h 以上。精密称取一定量的对照品，用去离子水定容，得到相应的对照品母液；移取一定体积的丙酮酸液体，用去离子水定容得到母液。设置 7 档质量浓度梯度，取上述对照品母液以及去离子水配制不同质量浓度梯度的样品液。



1-亮氨酸; 2-缬氨酸; 3-异亮氨酸; 4-乳酸; 5-苏氨酸; 6-丙氨酸; 7-乙酸根; 8-焦谷氨酸; 9- γ -氨基丁酸; 10-丙酮酸根; 11-琥珀酸根; 12-柠檬酸根; 13-胆碱; 14-葡萄糖; 15-甘露三糖; 16-果糖; 17-蔗糖; 18-半乳糖; 19-水苏糖; 20-尿苷; 21-富马酸根; 22-甲酸根; 图2和表1同。

1-leucine; 2-valine; 3-isoleucine; 4-lactic acid; 5-threonine; 6-alanine; 7-acetate; 8-pyroglutamate; 9- γ -aminobutyrate; 10-pyruvate; 11-succinate; 12-citrate; 13-choline; 14-glucose; 15-mannotriose; 16-fructose; 17-sucrose; 18-galactose; 19-stachyose; 20-uridine; 21-fumarate; 22-formate; same as Fig. 2 and table 1.

图1 CEJ中间体的¹H-NMR谱峰指认

Fig. 1 Signal identification of ¹H-NMR spectrum of intermediate of CEJ

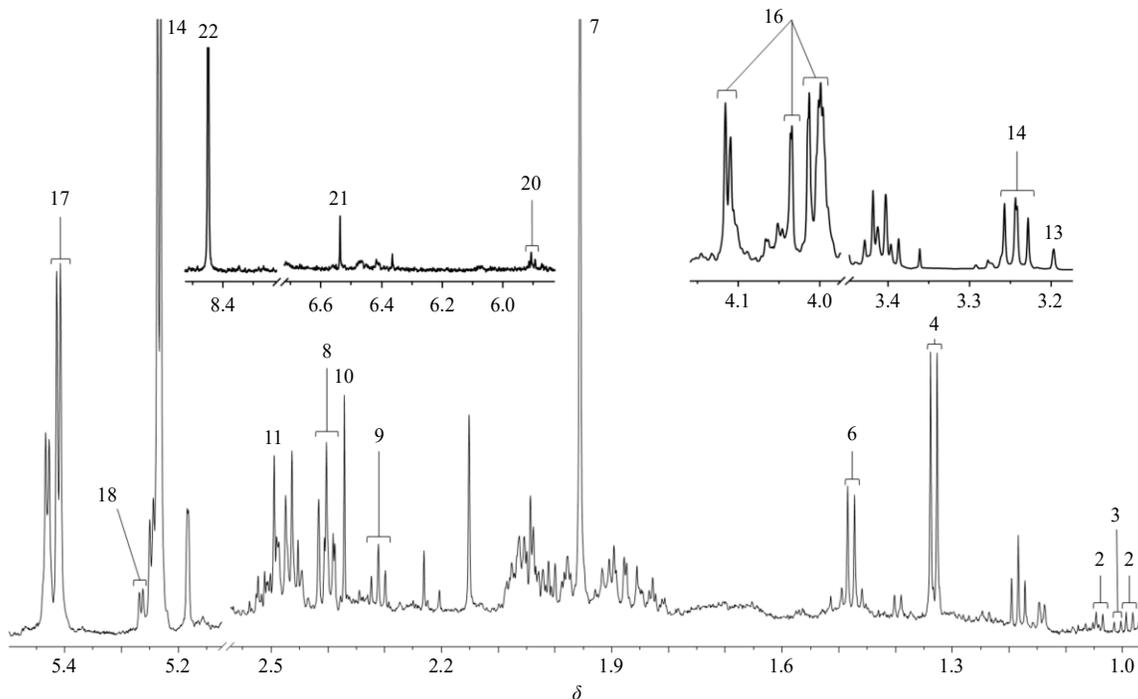


图2 17种化学成分定量峰

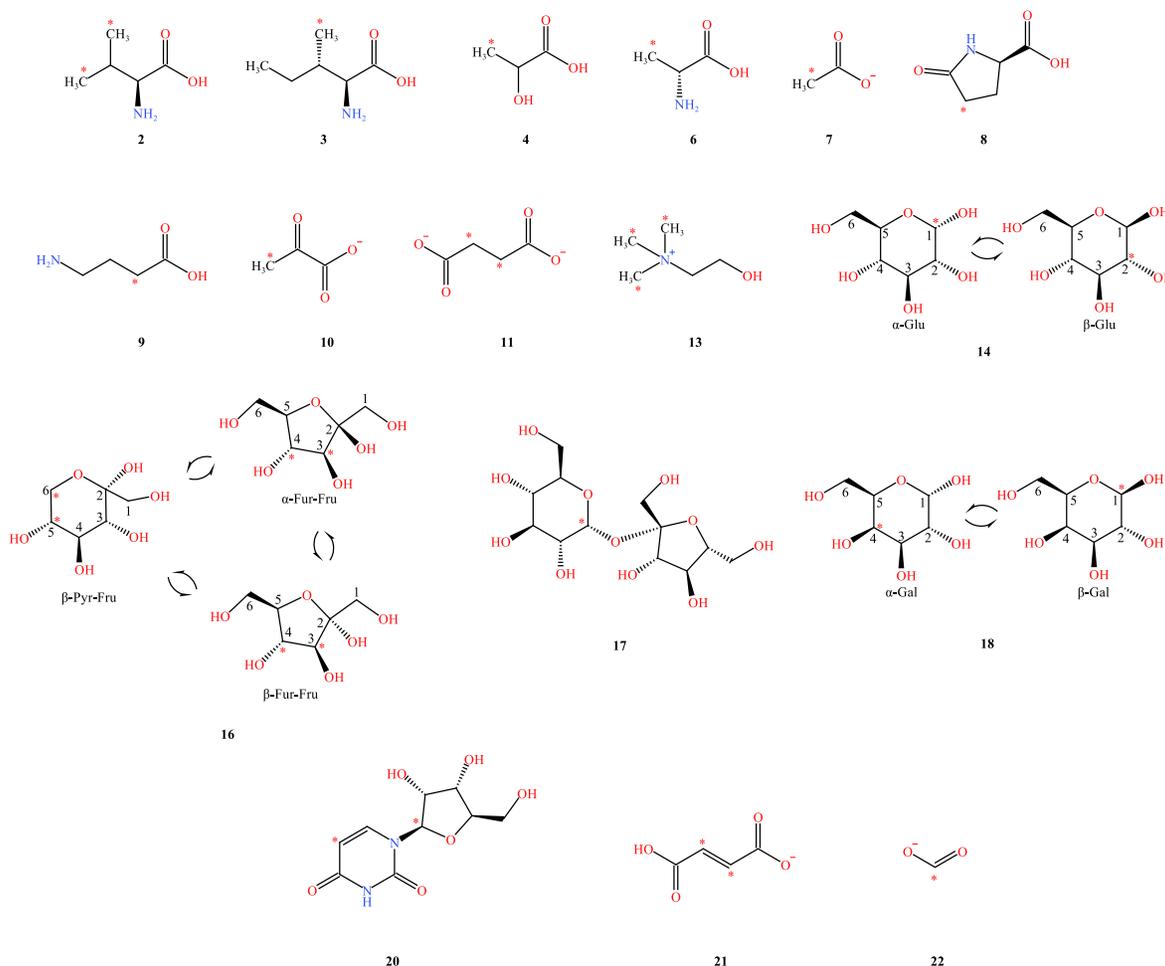
Fig. 2 Quantitative peaks of 17 chemical components

表 1 定量峰的具体参数

Table 1 Parameters of quantitative peaks

编号	化学成分	化学式	δ_{H}	编号	化学成分	化学式	δ_{H}
2	缬氨酸	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	0.99 (d, $J = 7.0$ Hz), 1.04 (d, $J = 7.0$ Hz)	13	胆碱	$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_2$	3.20 (s)
3	异亮氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	1.01 (d, $J = 7.1$ Hz)	14	<i>D</i> -葡萄糖 ^a	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	3.24 (dd, $J = 9.4, 8.0$ Hz, β -H-2), 5.23 (d, $J = 3.8$ Hz, α -H-1)
4	乳酸	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	1.33 (d, $J = 7.0$ Hz)	16	<i>D</i> -果糖 ^b	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	4.11 (m, β -fur-H-3, 4, α -fur-H-3), 4.01 (m, β -pyr-H-6), 4.11 (m, β -pyr-H-5, α -fur-H-4)
6	丙氨酸	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	1.48 (d, $J = 7.4$ Hz)	17	蔗糖	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	5.41 (d, $J = 3.9$ Hz)
7	乙酸根	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$	1.93 (s)	18	<i>D</i> -半乳糖 ^c	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5.27 (d, $J = 3.8$ Hz, α -H-1)
8	焦谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	2.40 (m)	20	尿昔	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	5.90 (m)
9	γ -氨基丁酸	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$	2.31 (m)	21	富马酸根	$\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_4^-$	6.54 (s)
10	丙酮酸根	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^-$	2.37 (s)	22	甲酸根	CHO_2^-	8.46 (s)
11	琥珀酸根	$\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4^{2-}$	2.44 (s)				

a-*D*-葡萄糖在水溶液中的主要构型分别为 β -葡萄糖 (β -Glu) 和 α -葡萄糖 (α -Glu); b-*D*-果糖在水溶液中主要构型分别为 β -吡喃果糖 (β -Pyr-Fru)、 β -呋喃果糖 (β -Fur-Fru) 和 α -呋喃果糖 (α -Fur-Fru); c-*D*-半乳糖在水溶液中的主要构型分别为 β -半乳糖 (β -Gal) 和 α -半乳糖 (α -Gal)。
a-there are mainly two configurations of *D*-glucose in aqueous solution, namely β -glucose (β -Glu) and α -glucose (α -Glu); b-there are mainly three configurations of *D*-fructose in aqueous solution, namely β -fructopyranose (β -Pyr-Fru), β -fructofuranose (β -Fur-Fru), and α -fructofuranose (α -Fur-Fru); c-there are mainly two configurations of *D*-galactose in aqueous solution, namely β -galactose (β -Gal) and α -galactose (α -Gal).



结构式编号同表 1; 结构中的*表示定量峰所对应的氢原子。

the molecular formula number is the same as table 1; the corresponding protons in the structures of characteristic peaks are marked by asterisk.

图 3 定量峰在化学结构中对应的氢原子

Fig. 3 Corresponding protons in structures of quantitative peaks

将样品液与“2.1”项配制的含 0.5 mg/mL TSP 的 D₂O 溶液以体积比 9 : 1 混合得到待测样品。

按“2.2”项所述参数采集样品的 ¹H-NMR 图谱，并对目标成分的特征峰进行积分。以对照品和内标化合物的峰面积之比为纵坐标 (Y)，以待测样品中对照品和内标化合物的质量浓度比值为横坐标 (X) 进行线性回归。得到的 17 个成分回归方程见表 2，

表 2 CEJ 中间体 ¹H-qNMR 定量方法的线性关系和检测限与定量限及方法学考察结果

Table 2 Results of linear relationship investigation of ¹H-qNMR method for intermediate of CEJ

化学成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (mg·L ⁻¹)	检测限/ 定量限/ (mg·L ⁻¹)		RSD/%				加样回收率/%	
				精密性	稳定性	重复性	耐用性	平均值	RSD		
缬氨酸	$Y=1.0313X+0.0042$	0.9999	5.6~55.6	0.9	3.0	1.65	1.82	1.74	1.29	100.88	2.11
异亮氨酸	$Y=0.4297X+0.0004$	0.9996	1.8~19.0	1.1	3.5	1.99	1.47	2.17	1.47	100.86	0.44
乳酸	$Y=0.6574X+0.0187$	0.9996	9.5~106.8	0.6	2.0	2.16	2.48	2.19	1.47	96.59	1.61
丙氨酸	$Y=0.9908X+0.0061$	0.9998	5.0~52.9	0.5	1.6	1.12	2.58	1.38	1.64	102.04	1.40
乙酸根	$Y=1.1019X-0.0252$	0.9996	21.5~217.8	0.2	0.5	0.60	1.07	1.36	0.69	100.45	0.86
γ-氨基丁酸	$Y=0.4151X+0.0042$	0.9996	9.6~101.6	1.1	3.5	2.26	2.12	0.40	1.67	100.55	0.82
丙酮酸根	$Y=0.5382X+0.0096$	0.9996	5.3~52.6	0.3	1.0	2.21	2.02	1.17	1.75	95.18	2.11
焦谷氨酸	$Y=0.3019X+0.0080$	0.9997	28.4~301.6	2.4	8.0	2.20	1.21	1.32	1.93	99.90	0.81
琥珀酸根	$Y=0.7495X+0.0024$	0.9997	4.9~52.9	0.3	0.8	2.69	2.48	1.71	2.56	100.53	1.33
胆碱	$Y=1.5463X-0.0106$	0.9998	4.5~44.0	0.2	0.6	1.87	1.97	1.37	2.05	92.54	2.00
葡萄糖	$Y=0.1298X+0.0247$	0.9995	595.3~6340.0	8.7	28.9	0.34	1.14	2.44	1.90	104.79	0.67
果糖	$Y=0.2216X+1.0888$	0.9996	2969.4~13406.7	8.9	29.7	0.34	1.29	1.20	1.60	100.54	0.83
蔗糖	$Y=0.0568X+0.0047$	0.9997	97.3~1002.0	9.5	31.5	0.32	2.57	1.24	2.21	93.30	2.17
半乳糖	$Y=0.0366X+0.0038$	0.9996	40.8~509.4	14.7	49.1	0.27	1.34	1.89	2.56	91.30	1.08
尿苷	$Y=0.1951X+0.0050$	0.9996	3.6~40.6	2.5	8.2	0.94	1.68	2.26	2.22	100.77	0.73
富马酸根	$Y=0.4286X+0.0024$	0.9997	2.0~21.7	0.4	1.3	2.51	2.33	1.42	2.13	104.79	0.46
甲酸根	$Y=0.4755X+0.0043$	0.9999	28.3~283.0	0.4	1.2	0.41	2.08	1.16	2.40	102.58	1.05

2.5.3 精密性 随机取一批 (批号 1909010) 中间体，按“2.1”项所述方法制备 1 份供试样品，连续采集 6 张 ¹H-NMR 图谱，按“2.3”项所述方法进行图谱处理，并计算目标成分质量浓度。精密性结果用 6 组质量浓度计算值的 RSD 表示，结果见表 2。各成分的结果均小于 2.7%，表明仪器精密性良好。

2.5.4 重复性 随机取一批 (批号 1909010) 中间体，按“2.1”项所述方法平行制备 6 份供试样品，分别采集 ¹H-NMR 图谱，按“2.3”项所述方法进行图谱处理，并计算目标成分质量浓度。重复性结果用 6 组质量浓度计算值的 RSD 表示，结果见表 2。各成分的结果均小于 2.5%，证明制样重复性良好。

2.5.5 耐用性 随机取一批 (批号 2020616) 中间体，按“2.1”项所述方法制备 1 份供试样品，分别于 296.5、297.0、297.5、298.0、298.5、299.0 K 温

度下进行分析，按“2.3”项所述方法进行图谱处理，并计算目标成分质量浓度。方法耐用性结果用 6 组质量浓度计算值的 RSD 表示，结果见表 2。各成分的结果均小于 2.6%，证明分析温度在 296.5~299.0 K 波动时对测定结果无显著影响。

2.5.2 检测限与定量限 以化合物定量峰响应为 3 倍信噪比时的质量浓度为检测限，10 倍信噪比时的质量浓度为定量限。信噪比的计算利用 MestReNova 14.0.0 软件完成，其中每个成分均取 3 次结果的平均数。各成分的检测限与定量限结果如表 2 所示。

2.5.6 稳定性 随机取一批 (批号 1909010) 中间体，按“2.1”项所述方法制备 1 份供试样品，在室温下保存，分别于第 0、2、4、8、12、24 小时采集 ¹H-NMR 图谱，按“2.3”项所述方法进行图谱处理，并计算目标成分质量浓度。样品稳定性结果用 6 组质量浓度计算值的 RSD 表示，结果见表 2。各成分的结果均小于 2.6%，说明样品溶液在室温下存放 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 准确度 本研究通过 2 种方式考察准确度。首先是加样回收试验，取已完成定量分析的批次 (批

号 1909010), 分别加入相当于原样品质量浓度 80%、100%、120%的待测成分对照品, 记为低、中、高质量浓度组, 每组平行制备 3 份样品进行分析。按“2.3”项所述方法进行图谱处理, 并计算目标成分质量浓度。各成分的最终回收率结果取 3 份的平均值, 并计算 RSD, 如表 2 所示。各成分的平均加样回收率在 90.0%~105.0%, RSD 小于 2.2%, 证明方法分析准确度良好。

其次, 将分析值与参考值作比, 以考察所提出方法的分析准确度。将缬氨酸、异亮氨酸、乳酸、丙氨酸、乙酸钠、 γ -氨基丁酸、焦谷氨酸、琥珀酸、氯化胆碱、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、尿苷、富马酸、甲酸钙对照品置于装有 P_2O_5 的干燥器中, 减压干燥 24 h 以上。精密称取一定量的对照品, 用去离子水定容得到相应的对照品母液; 移取一定体积的丙酮酸液体, 用去离子水定容得到母液。设置高、中、低 3 档质量浓度, 取上述对照品母液以及去离子水配制不同质量浓度的样品液, 以配制质量浓度为参考值。

将样品液与“2.1”项配制的含 0.5 mg/mL TSP 的 D_2O 溶液以体积比 9 : 1 混合得到待测样品。按“2.2”项所述参数采集样品的 1H -NMR 图谱, 并按

“2.3”项所述进行数据处理, 得出分析值。将分析值与参考值进行比较, 结果用平均相对偏差 (RD) 表示, RD 值的计算式如式 (3) 所示, 其中 c 和 c_r 分别为分析值和参考值。结果缬氨酸、异亮氨酸、乳酸、丙氨酸、乙酸钠、 γ -氨基丁酸、丙酮酸根、焦谷氨酸、琥珀酸根、胆碱、葡萄糖、果糖、蔗糖、半乳糖、尿苷、富马酸根、甲酸根的 RD 分别为 3.38%、3.43%、2.21%、2.77%、3.15%、3.32%、3.75%、3.28%、3.94%、2.89%、3.90%、1.69%、1.52%、3.89%、3.00%、3.49%、3.55%, 结果显示, 各成分的 RD 值均在 4.0% 以内, 证明方法分析准确度良好。

$$RD = |c - c_r| / c_r \quad (3)$$

2.6 样本测定

对 3 批 CEJ 中间体样本进行检测, 各项测定结果均高于定量限, 且满足线性范围。17 个化合物的定量结果见表 3。

3 批中间体样本中, 大多组分的质量浓度在 0.1~1.0 mg/mL, 质量浓度最低的是异亮氨酸, 最高的是果糖。质量浓度低于 0.1 mg/mL 的有缬氨酸、异亮氨酸和富马酸根。4 种糖类成分的质量浓度均大于 1.0 mg/mL, 其中葡萄糖、果糖质量浓度均大于 15.0 mg/mL。

表 3 3 批 CEJ 中间体中 17 种化学成分的质量浓度结果

Table 3 Quantitative results of 17 chemical components in three batches of intermediate of CEJ

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)								
	缬氨酸	异亮氨酸	乳酸	丙氨酸	乙酸钠	γ -氨基丁酸	丙酮酸根	焦谷氨酸	琥珀酸根
1907075	0.068	0.063	0.379	0.269	0.537	0.418	0.135	1.529	0.149
1909010	0.055	0.039	0.394	0.239	0.400	0.464	0.120	1.244	0.250
2020616	0.048	0.042	0.315	0.209	0.616	0.316	0.121	0.947	0.115

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)								
	胆碱	葡萄糖	果糖	蔗糖	半乳糖	尿苷	富马酸根	甲酸根	
1907075	0.154	26.684	63.434	2.695	4.712	0.130	0.070	0.622	
1909010	0.147	26.444	69.185	1.342	5.413	0.074	0.047	0.445	
2020616	0.124	18.594	38.319	1.136	3.226	0.086	0.040	0.480	

为评价该方法可定量成分总量, 用干燥称重法测定了 3 批中间体的总固体含量, 并计算可定量成分在总固体含量中的质量占比。结果见表 4, 3 批中间体可定量成分的质量占比分别为 71.09%、84.44%、70.09%。另分别计算了氨基酸、小分子有机酸、糖类和核苷 4 类成分的质量占比。结果显示, 糖类的质量占比均高于 65%, 为 CEJ 中间体中的主要成分, 其余可定量成分质量占比不足 5%。

表 4 各类可定量成分质量浓度在总固体中的占比

Table 4 Proportion of mass concentration of various measurable components in total solids

批号	测定成分占比/%				总计/%
	氨基酸	小分子有机酸	糖类	核苷	
1907075	1.34	1.61	67.94	0.20	71.09
1909010	1.25	1.68	81.29	0.22	84.44
2020616	1.35	2.17	66.35	0.23	70.09

3 讨论

为证明所提出 $^1\text{H-qNMR}$ 方法的可靠性,进行了一系列方法学考察。线性考察旨在评价测试结果与试样中被测物浓度成比例关系的程度,以相关系数为指标。精密度考察旨在评价多次测定所得结果之间的接近程度,重复性考察评价的是多次制样对测定结果的影响,耐用性考察评价采集温度发生变动时测定结果受影响的程度,稳定性考察评价样品在室温条件下存放时长对测定结果的影响,上述 3 项考察均以分析值的 RSD 作为指标。准确度考察评价的是方法测定结果与实际值或参考值接近的程度,此处采用两种方式进行考察,其一为加样回收实验,以回收率作为指标;其二是通过配制标准品溶液得到参考值,计算分析值与参考值的 RD 值来进行评价。

成功归属出的 22 种化合物中,17 种(如表 1 所列)得到了理想的方法学考察结果,证明所提出方法可行且可靠。余下 5 种化合物中,亮氨酸、苏氨酸、柠檬酸根均谱峰重叠相对严重,无法选定合适的定量峰,导致无法进行定量;甘露三糖和水苏糖虽分别选定了重叠最少的峰作为定量峰,但是在加样回收实验中得出的回收率非常糟糕,无法通过方法学验证,故无法准确定量。这一结果说明所选择的定量峰不够合理,峰重叠程度对积分产生了过大负面影响。

样品检测结果显示,批号 2020616 的糖类质量浓度明显低于另 2 批,其中果糖质量浓度约为另 2 批的 70%,葡萄糖质量浓度约为另 2 批的 58%。化学成分的组成和含量决定了提取液的物理属性情况,由批号 2020616 样本糖类含量最低可以推测其密度最低,该推论与实际密度测定结果相符。在药典中,密度为提取液、浸膏的检查项之一。由此展望,全面成分定量有望成为提取液、浸膏化学组成与关键物理属性关系发现研究的基础工作。

与目前广泛应用的基于液相色谱技术的定量方法相比, $^1\text{H-qNMR}$ 方法的分析范围更广,且一次检测可定量的成分数目更多,更适合混合物高效分析;检测快捷,检测单个样本的仪器占用时间在 10 min 以内,对高通量分析友好;定量无需建立随行标准曲线,大大减少对照品和有机溶剂的消耗,在降低时间和经济成本的同时更加环保。目前 $^1\text{H-qNMR}$ 方法推广的主要阻力来自核磁共振波谱仪的高昂成本,设备共享平台的构建是一种解决方案。方法的局限性

在于灵敏度相对较低,且 NMR 技术不具备分离混合物的能力,化合物频域峰重叠会对定性和定量造成负面影响。如将低含量的植物次级代谢产物以及个别由于频域峰重叠导致无法正常进行核磁定量的成分利用色谱或质谱技术进行定量,则能弥补上述局限,从而实现真正的全成分定量分析,有望拓宽 $^1\text{H-qNMR}$ 技术的适用范围。

综上所述,本研究基于 $^1\text{H-qNMR}$ 技术开发了 CEJ 中间体的定量分析方法,能同时定量 17 种成分,包括 4 种氨基酸、7 种小分子有机酸、4 种糖类以及 2 种核苷,具有耗时短、定量信息全面、环境友好等特点,能作为 CEJ 生产过程物质传递规律研究的基础工作,对实现制药全过程控制有积极意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Simmler C, Napolitano J G, McAlpine J B, *et al.* Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 51-59.
- [2] Tynkkynen T, Wang Q, Ekholm J, *et al.* Proof of concept for quantitative urine NMR metabolomics pipeline for large-scale epidemiology and genetics [J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(3): 978-993.
- [3] Benevelli F, Vella S, Crosta C, *et al.* NMR as powerful technology for noninvasively monitoring cell health and expansion during bioprocessing [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(12): 3497-3508.
- [4] Pei Y, He C X, Liu H L, *et al.* Compositional analysis of four kinds of *Citrus* fruits with an NMR-based method for understanding nutritional value and rational utilization: From pericarp to juice [J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2579.
- [5] Ghosh S, Tugarinov V, Clore G M. Quantitative NMR analysis of the mechanism and kinetics of chaperone Hsp104 action on amyloid- β 42 aggregation and fibril formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(21): e2305823120.
- [6] Huang X W, Wang Y L, Wang W, *et al.* Quantitative ^1H NMR with global spectral deconvolution approach for the determination of gamma-aminobutyric acid in Chinese yam (*Dioscorea polystachya* Turczaninow) [J]. *Anal Sci*, 2023, 39(2): 221-227.
- [7] Giraudeau P. Quantitative NMR spectroscopy of complex mixtures [J]. *Chem Commun*, 2023, 59(44): 6627-6642.
- [8] Zhao F, Li W Z, Pan J Y, *et al.* A novel critical control point and chemical marker identification method for the multi-step process control of herbal medicines via NMR spectroscopy and chemometrics [J]. *RSC Adv*, 2020,

- 10(40): 23801-23812.
- [9] Zhao F, Li W Z, Pan J Y, *et al.* Process characterization for ethanol precipitation of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen) using ^1H NMR spectroscopy and chemometrics [J]. *Process Biochem*, 2021, 101: 218-229.
- [10] Li W Z, Zhao F, Yang J Y, *et al.* Development of a comprehensive method based on quantitative ^1H NMR for quality evaluation of traditional Chinese medicine injection: A case study of Danshen Injection [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(7): 1006-1016.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1322-1323.
- [12] 郝向慧, 周祥山, 秦玉峰, 等. 无糖复方阿胶浆及其制备工艺: 中国, CN103610974A [P]. 2014-03-05.
- [13] 张淹, 王春艳, 赵婷婷, 等. HPLC-MS 同时测定复方阿胶浆中的 5 种药效成分 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(4): 551-555.
- [14] 许啸, 张淹, 任雪阳, 等. 基于特征图谱、化学计量学和分子对接的复方阿胶浆质量标志物研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(23): 7148-7161.
- [15] 许啸, 张淹, 刘晓云, 等. 复方阿胶浆质量标准提升研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6226-6233.
- [16] Han H F, Zhang L, Zhang Y, *et al.* Rapid analysis of the in-process extract solutions of compound E Jiao oral liquid using near infrared spectroscopy and partial least-squares regression [J]. *Anal Methods*, 2013, 5(19): 5272-5278.
- [17] Li W L, Han H F, Zhang L, *et al.* A feasibility study on the non-invasive analysis of bottled Compound E Jiao Oral Liquid using near infrared spectroscopy [J]. *Sens Actuat B*, 2015, 211: 131-137.
- [18] Bharti S K, Roy R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2012, 35: 5-26.
- [19] Li W Z, Zhao F, Xie X Y, *et al.* Quantitative profiling of comprehensive composition in compound herbal injections: An NMR approach applied on Shenmai Injection [J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(7): 1045-1057.
- [20] 李文竹, 谢欣媛, 杨嘉誉, 等. 同时测定丹红注射液中 21 个化学成分含量的 NMR 方法研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(23): 6399-6408.

[责任编辑 郑礼胜]