

文章编号: 1000-4556(2007)02-0163-06

黄芩的 ^1H NMR 指纹图谱研究

孙庆雷^{1*}, 赵红霞², 林云良¹, 王 晓¹, 陈立宗¹,
程传格¹, 刘建华¹

(1. 山东省科学院 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014;

2. 山东轻工业学院 化学工程学院, 山东 济南 250100)

摘 要: 利用 PFT-NMR 核磁共振波谱仪测定了黄芩提取物的 ^1H NMR 图谱, 对黄芩提取物的 ^1H NMR 指纹图谱进行了解析, 并与黄芩苷元、千层纸素 A、汉黄芩素和黄芩苷进行了比较, 获得了黄芩提取物的特征峰, 并利用向量夹角法计算了不同指纹图谱的相似度; 结果表明不同黄芩提取物的 ^1H NMR 指纹图谱都显示出黄酮类有效成分特征共振峰, 并具有很好的重现性和高度的特征性, 可以成为黄芩真伪鉴别的依据; 不同黄芩的 ^1H NMR 指纹图谱的相似度计算结果定量地评价了不同指纹图谱的相似性。

关键词: ^1H NMR; 指纹图谱; 相似度; 黄芩

中图分类号: O482.53 **文献标识码:** A

目前对植物中药指纹图谱研究的必要性^[1-3]以及核磁共振指纹图谱的方法学研究^[4-7]引起了国内外科研工作者的广泛关注, 核磁共振指纹图谱的研究主要集中在 ^1H NMR 指纹图谱方面, 这主要是因为 ^1H NMR 指纹图谱所需样品量很少, 扫描时间短, 容易获得, 故而被广泛应用. 用规范的提取分离程序获得的特征提取物的核磁共振指纹图谱基本代表了植物中药的整体化学组成, 可以客观、全面地反映植物中药的特征. 中药的物质基础是化学成分, 化学成分通过实验方法可以表征为指纹图谱, 图谱的峰可以代表相应的物质基础, 若物质基础成分群相同, 所表现的指纹图谱应该完全一致, 若基本相同, 应该相似; 若差异大, 相似度低. 因此, 相似度作为重要指标被确立^[8]. 相似度作为中药指纹图谱评价指标, 使研究针对的目标不再是图谱上的某个峰, 而是将图谱所

收稿日期: 2006-07-14; 收修改稿日期: 2006-09-19

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2006C17); 山东省科学院科技发展基金资助项目(200406).

作者简介: 孙庆雷(1976-), 男, 山东省博兴人, 博士, 研究员, 现从事中药指纹图谱研究, 电话: 0531-82605343, E-mail: sunql@keylab.net. * 通讯联系人.

有峰(或所有信号点)作为一个向量来处理,全面反映指纹图谱之间的共性和个性差异,提高了指纹图谱的信息利用率.同时,使用客观参数反映图谱间差异,改变了对图谱只能用像或不像的直观描述的状况.利用相似度来判定指纹图谱的相似情况,被认为符合指纹图谱整体性和模糊性的基本属性.

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科(Labiatae)植物黄芩的干燥根.春、秋二季采挖,除去须根及泥沙,晒后撞去粗皮,晒干.黄芩为常用中药,性苦,味寒,具有清热燥湿,泻火解毒,止血、安胎等功效,用于湿温、胸闷呕恶,湿热痞满,泻痢、肺热咳嗽、高热烦渴等,黄芩是最为广泛应用的中药之一,为此本文以黄芩的特征提取物为研究对象,以核磁共振作为主要研究手段,获得了黄芩的 ^1H NMR 指纹图谱,并比较了不同指纹图谱的相似度,以此作为控制黄芩药材质量的标准.

1 实验部分

1.1 药材来源

黄芩购自山东临沂(No.1)、蒙阴(No.2)、莒县(No.3)、安徽(No.4)、河北(No.5)等地,由山东中医药大学中药学院鉴定.

1.2 样品的制备

取各样品 5 g,加 95%乙醇 50 mL,于水浴上加热回流 2 次,每次 1 h,滤取提取液,将溶剂挥发,取一定量残余物备用.

1.3 ^1H NMR 指纹图谱的测定

黄芩苷元、汉黄芩素和黄芩提取物的 ^1H NMR 指纹图谱用 Varian INOVA 600 型超导傅立叶变换核磁共振波谱仪在 25℃测定,扫描次数为 64 次,DMSO- d_6 做溶剂,TMS 为内标.

1.4 相似度计算方法

N 个数值组成的行 $(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ 称为 N 维向量,简记为大写字母 X . 如果存在两个向量 X 及 Y 则 X, Y 之间的向量夹角按照(1)式计算. 如果 $\cos\theta$ 越接近 1 则说明两个向量越相似^[9,10].

$$\cos\theta = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n Y_i^2}} \quad (1)$$

每个 NMR 指纹图谱都可以看作一组对应化学位移的峰高(或峰面积)的数值,可将这组数值看作多维空间中的向量,使两个指纹图谱间相似性的问题转化为多维空间的两个向量的相似性问题,利用(1)式计算 $\cos\theta$ 来定量表征指纹图谱间的相似性.

2 结果与讨论

2.1 黄芩中黄酮类化合物的 ^1H NMR 谱分析

黄芩主要含有黄酮类化合物、挥发油、氨基酸及糖类. 黄酮类化合物是黄芩的主要有效成分之一,因此获得黄芩中黄酮类化合物的 ^1H NMR 谱对于确认和辨别黄芩的指纹图谱非常重要. 黄芩中黄酮类化合物的结构如图 1 所示. 其中千层纸素 A 和黄芩苷的 ^1H

NMR 数据采用文献中的化学位移值, 黄芩苷为(C₅-OH, 12.57; C₆-OH, 8.51; C_{2'}_{6'}-H, 8.07; C_{3'}_{4'}_{5'}-H, 7.58; C₃-H, 7.07; C₈-H, 7.00; C₂-H(glcUA), 5.38), 千层纸素 A 为(C₅-OH, 12.91; C₇-OH, 10.78; C_{2'}_{6'}-H, 8.07; C_{3'}_{4'}_{5'}-H, 7.61; C₃-H, 6.94; C₈-H, 6.63; C₂-OCH₃, 3.76)^[11].

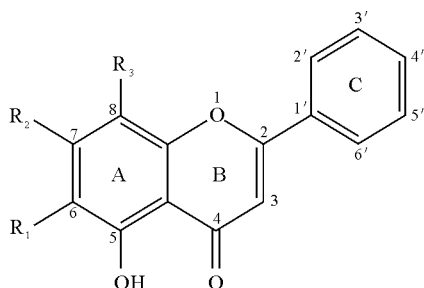


图 1 黄芩中黄酮类化合物的结构

Fig.1 The structure of flavonoid compounds in the extracts of *Scutellaria baicalensis*

	R ₁	R ₂	R ₃
黄芩苷元(Baicalein)	OH	OH	H
千层纸素(oroxylinA)	Ome	OH	H
汉黄芩素(Wogonin)	OH	H	Ome
黄芩苷(Baicalin)	OH	O-glcUA	H

2.2 黄芩的¹H NMR 指纹图谱特征

黄芩中的化学成分比较复杂, 其含有的化学成分也已经有很多报道, 其中包括赖以防治疾病的有效成分、辅助成分及无效成分. 中药材本身固有的特点及其质量的种种影响因素, 增加了质量评价的难度. 因此对于中药材黄芩质量的控制既要在整体上把握其整体特征面貌, 又要对其进行局部解析, 找出特征峰, 获得反映中药药效的有效成分和辅助成分. 采用规范的提取分离程序获得的特征提取物, 基本代表了黄芩的整体化学组成, 可以客观、全面地反映黄芩的特征^[12], 通过对黄芩特征提取物指纹图谱的分析可以获得反映黄芩的整体特征面貌. 黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱包含了黄芩提取物中所有物质的氢信号, 因此可以全面的反映黄芩的整体化学组成, 同时黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱中的特征峰则可以反映黄芩的特征信号, 便于鉴别和指认. 因此黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱可以从整体面貌和局部特征信号两方面的结合来反映黄芩的整体特征. 同时黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱与其黄酮类主要有效成分(黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷)¹H NMR 中特征峰的比较, 则达到了在整体了解黄芩特征面貌的同时, 对其特征成分进行指认和鉴别的目的, 进而对其质量控制提供参考. 黄芩总提取物、黄芩苷元和汉黄芩素的¹H NMR 指纹图谱如图 2 所示.

从图 2 中可以看出, 由于总提取物中的化学成分很多, 获得的提取物指纹图谱为其含有的所有成分氢谱的叠加总包结果, 因此指纹图谱比较复杂, 而且呈现多个包峰. 从总体外貌来看, 5 种不同的黄芩样品(No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 5)¹H NMR 指纹图谱有很好的相似性, 表明不同黄芩样品间特征性化学成分在相对组成和结构方面的一致性, 也进一步说明¹H NMR 指纹图谱作为其质量控制标准的可行性和可靠性. 同时通过不同黄芩之间的比较, 以及与黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷化学位移的对比, 可以看出, 虽然由于提取物中其他物质的影响, 黄芩提取物中的黄酮类化合物与相应纯化合物中的氢化学位移略有偏移, 但五种黄芩的氢化学位移基本一致.

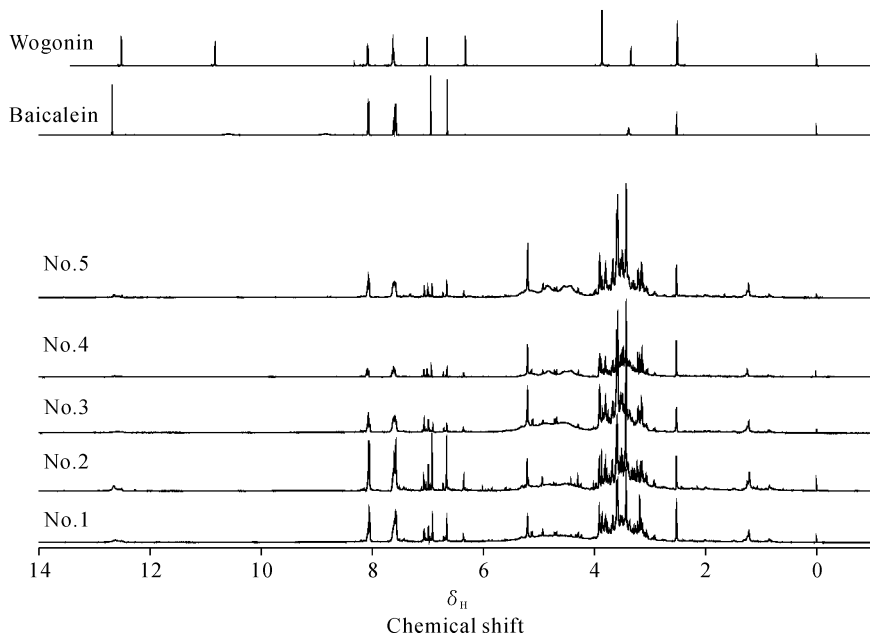


图 2 黄芩特征总提取物的 ^1H NMR 指纹图谱

Fig. 2 600 MHz ^1H NMR spectra of the general characteristic extracts of *Scutellaria baicalensis*

在高场处，由于总提取物含有的糖类成分的影响， δ 3.86 的汉黄芩素中 8 位的 OCH_3 的氢信号和 δ 3.76 的千层纸素 A 中 6 位的 OCH_3 的氢信号相对较弱， OCH_3 的氢信号淹没其中，特征性不明显，难以辨认，加大了辨认的难度。

在相对较低场，由于黄芩中其他化合物在此范围内的氢信号相对较少，故而与高场相比便于辨别和指认。 δ 8.07 和 δ 7.59 附近的氢信号明显，分别为黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷中 C 环的 2'6' 和 3'4'5' 位的芳香氢，黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷中 3 位的烯氢的信号分别在 6.95, 7.01, 7.07 和 6.94, 5 位的羟基氢信号在 12.68, 12.51, 12.57 和 12.91, 这些氢的信号非常明显，而且不同黄芩提取物的氢信号的峰形和化学位移非常相似，同时与黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷的峰形和化学位移也基本一致。由于黄芩中其他物质在低场区域的氢信号很小或是基本没有，因此在 δ 13~6 的低场区黄芩提取物的氢信号与黄芩中黄芩苷元、汉黄芩素、千层纸素 A 和黄芩苷相应的氢几乎一一对应，而且这些信号基本不受黄芩中其他化合物的影响，特征性很强，可以看作黄芩 ^1H NMR 指纹图谱的特征性基本数据。

2.3 黄芩的 ^1H NMR 指纹图谱的相似度

利用向量夹角法计算 ^1H NMR 指纹图谱的相似度能够更定量的对获得的指纹图谱进行科学有效的的评价。不同黄芩 ^1H NMR 指纹图谱的相似度结果见表 1。从表 1 中可以看出，利用向量夹角法计算的同种黄芩相似度都为 1 则从另一个方面印证了向量夹角法计算的相似度的正确性。对于不同黄芩的相似度，除了 No. 2 黄芩外，其余黄芩的 ^1H NMR 指纹图谱相似度都在 0.9 以上，说明不同黄芩有效成分及含量方面的一致性。而 No. 2 黄芩与其他黄芩的相似度略微偏低，说明 No. 2 黄芩与其他黄芩略有差别，这可能

是由于产地不同等原因造成的。利用向量夹角法计算¹H NMR 指纹图谱的相似度能够定量的对获得的指纹图谱进行科学有效的评价, 利用相似度这个客观参数反映图谱间差异, 改变了对图谱只能用像或不像的直观描述的状况, 全面反映指纹图谱之间的共性和个性差异, 提高了指纹图谱的信息利用率。

表 1 不同黄芩¹H NMR 指纹图谱的相似度

Table 1 Similarities of ¹H NMR fingerprints of different *Scutellaria baicalensis*

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
No. 1	1	0. 92	0. 93	0. 92	0. 94
No. 2	0. 92	1	0. 80	0. 77	0. 89
No. 3	0. 93	0. 80	1	0. 97	0. 94
No. 4	0. 92	0. 77	0. 97	1	0. 94
No. 5	0. 94	0. 89	0. 94	0. 94	1

3 结论

通过对不同黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱的研究表明, 不同黄芩提取物的¹H NMR 指纹图谱有很好的重现性和高度的特征性, ¹H NMR 指纹图谱和特征性数据能够准确地反映黄芩特征性化学成分的存在, 可以作为黄芩鉴定的相对标准图谱和数据, 并可以作为黄芩质量评价的相对标准图谱和数据。不同黄芩的¹H NMR 指纹图谱的相似度计算结果定量地评价了不同黄芩的相似性。

参考文献:

- [1] Yan Shi-kai, Xin Wen-feng, Luo Guo-an, *et al.* An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1 090: 90-97.
- [2] Gan Feng, Ye Run-yi. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1 104: 100-105.
- [3] Pereira G E, Gaudillere J P, Leeuwen C V, *et al.* ¹H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in bordeaux grapevine growing areas [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 563: 346-352.
- [4] Sun Qing-lei(孙庆雷), Lin Yun-liang(林云良), Wang Xiao(王晓), *et al.* ¹³C NMR fingerprints of flos lonicera (金银花的¹³C NMR 指纹图谱研究) [J]. *Chinese J Magn Reson (波谱学杂志)*, 2006, 23(2): 28-34.
- [5] Wang Yu-li(王玉莉), Dai Jing-qiu(戴静秋), Hou Li-fen(侯立芬), *et al.* A 2D NMR study of chrysathain, a new dimeric iridoid glucoside isolated from *lonicera chrysantha* (金花忍冬中一个新的二聚体环醚萜甙的 2D NMR 研究) [J]. *Chinese J Magn Reson (波谱学杂志)*, 2003, 20(2): 137-141.
- [6] Chen Hai-yong(陈海永), Zhou Chang-xin(周长新), Yao Wei(姚巍), *et al.* An NMR study of two lignans isolated from *schisandra chinensis* (北五味子中 2 种木脂素的 NMR 数据解析) [J]. *Chinese J Magn Reson (波谱学杂志)*, 2005, 22(1): 43-55.
- [7] Qin Hai-lin(秦海林), Zhao Tian-zeng(赵天增). Study on the identification of traditional Chinese herbal medicines by ¹H NMR (核磁共振氢谱鉴别植物中药的研究) [J]. *Acta pharm sin(药学报)*, 1999, 34(1): 58-62.
- [8] Qiao Shan-lei(乔善磊), Zhu Zhen-yu(朱臻宇), Wang Jian-jun(王建军), *et al.* Standardization study on simi-

- larity calculation for traditional Chinese medicines fingerprints(中药指纹图谱相似度计算的规范化研究)[J]. Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2004, 25(10): 1 114-1 116.
- [9] Wang Long-xing(王龙星), Xiao Hong-bing(肖红斌), Liang Xin-miao(梁鑫淼), *et al.* Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of chinese herb(一种评价中药色谱指纹图谱相似性的新方法: 向量夹角法)[J]. Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 2002, 37(9): 713-717.
- [10] Miao Ai-dong(苗爱东), Sun Dian-jia(孙殿甲). Application of microsoft excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs(Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应)[J]. Progress in Pharmaceutica(药学进展), 2003, 27(1): 51-54.
- [11] Zhang Zhong-peng(张中朋), Yang Zhong-lin(杨中林), Tang Deng-feng(唐登峰), *et al.* Isolation and struture identification of chemical constituents from stachys geobombycis(地蚕化学成分分离与鉴定)[J]. Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2004, 26(12): 1 051-1 053.
- [12] Qin Hai-lin(秦海林). Fine expression and analysis of total chemical characteristics of material foundation of traditional Chinese herbs medicines(中药物质基础整体特征的精细表达与解析)[J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine(世界科学技术-中药现代化), 2002, 4(4): 12-16.

^1H NMR Fringerprints of *Scutellaria Baicalensis*

SUN Qing-lei^{1*}, ZHAO Hong-xia², LIN Yun-liang¹, WANG Xiao¹,
CHEN Li-zong¹, CHENG Chuan-ge¹, LIU Jian-hua¹

(1. Shandong analysis and test center, Shandong academy of science, Jinan 250014, China;

2. School of Chemical Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250100, China)

Abstract: ^1H NMR spectra of *Scutellaria baicalensis* extracts were obtained by PFT-NMR and compared with those of the flavonoids found in the extract including baicalein, oroxylin A, wogonin and baicalin. ^1H NMR chemical shifts were assigned. The spectra of different *Scutellaria baicalensis* extract samples showed good reproducibility, and all contained the spectral fingerprint of flavonoids. It appears feasible to use the ^1H NMR fingerprints of *Scutellaria baicalensis* extract as a criterion to check the authenticity of *Scutellaria baicalensis* and *Scutellaria baicalensis* products.

Key words: ^1H NMR, fingerprints, similarity, *scutellaria baicalensis*

* Corresponding author: Sun Qing-lei, Tel:0531-82605343, E-mail:sunql@keylab.net.