

黄芩中黄酮类成分的分离鉴定及其体外对凝血系统的影响

陈佩东, 徐丹洋, 孔祥鹏, 李 芳, 丁安伟

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 研究黄芩 *Scutellaria baicalensis* 中的黄酮类成分及其对体外凝血系统的影响。方法 使用反复硅胶柱色谱进行分离纯化, 并根据其理化性质和波谱数据鉴定结构。通过测定黄酮类成分对凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血酶原时间 (APTT)、纤维蛋白量 (FIB) 的影响研究其体外凝血活性。结果 从黄芩的乙醇提取物中分离得到 12 个黄酮类化合物, 分别鉴定为黄芩素 (1)、汉黄芩素 (2)、千层纸素 A (3)、鞣黄芩素-I (4)、黄芩黄酮-II (5)、5, 7, 2', 5'-四羟基-8, 6'-二甲基黄酮 (6)、5, 7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮 (7)、5-甲氧基-7-羟基二氢黄酮 (8)、黄芩苷 (9)、汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯 (10)、汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (11)、木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (12)。所有化合物均对 FIB 没有影响, 部分化合物能显著缩短 TT、PT, 同时能显著延长 APTT。结论 化合物 11 和 12 为新化合物。黄芩中黄酮类化合物体外对凝血系统有双向调节作用, 其对凝血系统的不同作用体现在凝血过程的不同环节。

关键词: 黄芩; 黄酮; 汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯; 木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯; 凝血

中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2333-04

Isolation and identification of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* and study on their effects on *in vitro* coagulation system

CHEN Pei-dong, XU Dan-yang, KONG Xiang-peng, LI Fang, DING An-wei

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To study the flavonoids from *Scutellaria baicalensis* and investigate their effects on *in vitro* coagulation system. **Methods** Flavonoids were extracted by repeated column chromatography and their structures were identified based on physicochemical properties and spectral data. The *in vitro* coagulation activities of flavonoids were investigated through evaluating thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and fibrinogen (FIB) content. **Results** Twelve flavonoids were isolated from the ethanol extract of *S. baicalensis* and identified as baicalein (1), wogonin (2), oroxylin A (3), tenaxin-I (4), skullcapflavone-II (5), 5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone (6), dihydroroxyl A (7), 5-methoxy-7-hydroxyl-flavone (8), baicalin (9), wogonin-7-O- β -D-glucuronic acid methyl ester (10), wogonin-7-O- β -D-glucuronic acid butyl ester (11), and oroxylin A-7-O- β -D-glucuronic acid butyl ester (12). All the compounds showed no effect on FIB, and some flavonoids could obviously shorten TT and PT but lengthen APTT at the same time. **Conclusion** Compounds 11 and 12 are new. Flavonoids in *S. baicalensis* have bidirectional regulation on *in vitro* coagulation system. The different effects of flavonoids on coagulation system are observed at different stages in the coagulation process.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; flavonoids; wogonin 7-O- β -D-glucuronic acid butyl ester; oroxylin A-7-O- β -D-glucuronic acid butyl ester; coagulation

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 是我国常用的中药材之一, 始载于《神农本草经》, 归草部山草类, 列为中品。黄芩生品有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎之功效, 炒炭后可治疗便血尿血。黄芩中的主要化学成分为黄酮类化合物, 主要用于抗菌^[1]、抗炎、抗病毒等。对黄芩的研究发现黄酮可预防 UVB

对大鼠皮肤的急性辐射损伤^[2]、抑制痉挛用^[3]、抑制纤维化^[4]、对幽门螺杆菌的抑制作用^[5]和对肝脏的保护作用^[6]等。为研究黄芩对凝血系统的影响, 在前期工作的基础上^[7], 本实验进一步对黄芩的化学成分和生物活性进行研究。从黄芩中共分离得到 12 个黄酮类化合物, 分别鉴定为黄芩素 (baicalein, 1)、

收稿日期: 2012-04-04

基金项目: 国家中医药管理局行业专项 (20110700707)

作者简介: 陈佩东 (1970—), 男, 副教授, 博士, 从事中药活性成分及复方配伍机制、中药炮制和中药质量标准等领域的研究。

Tel: 13851948464 E-mail: chenpeidong1970@163.com

汉黄芩素 (wogonin, 2)、千层纸素 A (oroxylin A, 3)、韧黄芩素-I (tenaxin-I, 4)、黄芩黄酮-II (skullcapflavone-II, 5)、5, 7, 2', 5'-四羟基-8, 6'-二甲基黄酮 (5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone, 6)、5, 7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮 (dihydro roxylin A, 7)、5-甲氧基-7-羟基二氢黄酮 (5-methoxy-7-hydroxyflavonone, 8)、黄芩苷 (baicalin, 9)、汉黄芩素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸甲酯 (wogonin-7-*O*- β -D-glucuronic acid methyl ester, 10)、汉黄芩素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (wogonin-7-*O*- β -D-glucuronic acid butyl ester, 11)、木蝴蝶素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (oroxylin A-7-*O*- β -D-glucuronic acid butyl ester, 12), 其中化合物 11 和 12 为新化合物。同时考察 12 个化合物体外对凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血酶原时间 (APTT) 和纤维蛋白量 (FIB) 的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker AV500 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); Waters 515 高效液相色谱仪, 2996 检测器, Empower 色谱工作站。Waters Acquity Ultra-performance TM Liquid Chromatography System, 光电二极管阵列检测器 (DAD), 电喷雾离子化接口的四级杆飞行时间质谱检测器 (Micromass, Milford, MA, 美国), 高分辨用 Waters Q-TOF 质谱仪。X-4 数字显示显微熔点仪 (北京泰克仪器有限公司)。柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂)、GF254 薄层硅胶 (青岛海洋化工厂)。高效液相色谱所用试剂为色谱纯, 其余均为分析纯。血小板聚集凝血因子分析仪 (北京世帝科学仪器公司, LG-PABER), pH 计 (Themro 公司)。

1.2 试剂

PT 试剂盒 (批号 STG20101-41)、TT 试剂盒 (批号 STG40302-29)、APTT 试剂盒 (批号 ST20201-39)、FIB 试剂盒 (批号 STQ20401-28) 均为北京世帝科学仪器公司生产。5%二甲基亚砷 PBS 缓冲液 (pH 7.4, 自制), 3.8%枸橼酸钠抗凝剂 (自制)。

1.3 药材

黄芩药材购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司, 经南京中医药大学吴德康教授鉴定为黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

1.4 动物

雄性家兔, 体质量 (2.2 $\pm$ 0.2) kg, 许可证号: SCXK (苏) 2007-0008。

2 方法与结果

2.1 黄芩中黄酮化合物的提取与分离

黄芩干燥根 8 kg, 粉碎, 以 75%乙醇提取, 每次 2 h。浸膏用适量的水分散后分别用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 得氯仿部位 (400 g) 和正丁醇部位 (480 g)。氯仿部位经石油醚-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱, 依次得到千层纸素 A (3)、5, 7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮 (7) 和韧黄芩素-I (4); 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 依次得到汉黄芩素 (2)、黄芩素 (1) 和黄芩黄酮-II (5); 石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 洗脱, 依次得到 5-甲氧基-7-羟基二氢黄酮 (8) 和 5, 7, 2', 5'-四羟基-8, 6'-二甲基黄酮 (6)。正丁醇部位经二氯甲烷-甲醇 (10:1) 洗脱依次得到汉黄芩素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (11) 和木蝴蝶素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (12); 二氯甲烷-甲醇 (5:1) 洗脱依次得到汉黄芩素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸甲酯 (10) 和黄芩苷 (9)。

2.2 化合物 11 和 12 的结构鉴定

化合物 11: 淡黄色针晶, mp 203~204 °C (甲醇)。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 324, 274, 205。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 667, 1 738, 1 655, 1 614, 1 500。TOF-MS: 539 [M+Na]⁺, 517, 437, 285, 高分辨质谱给出相对分子质量为 516.165 0, 分子式为 C₂₆H₂₈O₁₁。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.07 (1H, s, H-3), 6.72 (1H, s, H-6), 8.10 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2', 6'), 7.61 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3', 5'), 7.63 (1H, m, H-4'), 5.32 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1''), 3.38 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-3''), 3.46 (1H, m, H-4''), 3.38 (1H, m, H-5''), 3.88 (3H, s, -OCH₃), 4.08 (2H, m, -OCH₂-a), 1.57 (2H, m, -CH₂-b), 1.32 (2H, m, -CH₂-c), 0.86 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, -CH₃-d), 12.53 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.8 (C-2), 105.6 (C-3), 182.6 (C-4), 156.2 (C-5), 98.7 (C-6), 156.1 (C-7), 129.5 (C-8), 149.4 (C-9), 105.4 (C-10), 130.7 (C-1'), 126.4 (C-2'), 129.5 (C-3'), 132.5 (C-4'), 129.2 (C-5'), 126.4 (C-6'), 99.7 (C-1''), 73.1 (C-2''), 75.4 (C-3''), 71.4 (C-4''), 75.6 (C-5''), 168.6 (C-6''), 61.6 (-OCH₃), 64.6 (-OCH₂-a), 30.2 (-CH₂-b), 18.7 (-CH₂-c), 13.7 (-CH₃-d)。

通过 HSQC 和 HMBC 归属了所有的信号, 其中端基质子 (*J* = 7.7 Hz) 表明该化合物糖苷键构型为 β 型, HMBC 中 δ 4.08 (2H, m, -OCH₂-a) 与 δ 168.6 (C-6'') 的羰基碳相关, 显示丁基连接在酯基上。经文献检索和对照^[8], 鉴定化合物 11 为汉黄芩素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸丁酯, 为新化合物 (图 1)。

化合物 **12**: 灰白色针晶, mp 204~205 °C (甲醇)。
 UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 307, 272, 244, 213。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 654, 1 740, 1 660, 1 610, 1 505。TOF-MS: 539 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 517, 285, 高分辨质谱给出相对分子质量为 516.165 0, 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.06 (1H, s, H-3), 7.10 (1H, s, H-8), 8.10 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-2', 6'), 7.60 (2H, $J = 6.4$ Hz, H-3', 5'), 7.63 (1H, m, H-4'), 5.35 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-1''), 3.38 (1H, m, H-2''), 4.18 (1H, m, H-3''), 3.46 (1H, m, H-4''), 3.38 (1H, m, H-5''), 3.77 (3H, s, -OCH₃), 4.08 (2H, m, -OCH₂-a), 1.54 (2H, m, -CH₂-b), 1.32 (2H, m, -CH₂-c), 0.79 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, -CH₃-d); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 163.7 (C-2), 106.1 (C-3), 182.5 (C-4), 152.5 (C-5), 132.6 (C-6), 156.1 (C-7), 94.2 (C-8), 152.1 (C-9),

106.0 (C-10), 130.6 (C-1'), 126.8 (C-2'), 129.1 (C-3'), 132.6 (C-4'), 129.1 (C-5'), 126.8 (C-6'), 99.5 (C-1''), 72.8 (C-2''), 75.3 (C-3''), 71.1 (C-4''), 75.7 (C-5''), 168.6 (C-6''), 60.3 (C-OMe), 64.3 (-OCH₂-a), 29.9 (-CH₂-b), 18.4 (-CH₂-c), 13.4 (-CH₃-d)。

端基质子 ($J = 6.9$ Hz) 表明该黄酮是 β -D 型糖苷, HMBC 谱中氢 δ 4.08 与羰基碳 δ 168.6 相关, 表明丁基连接在酯基上。经文献检索和对照^[9], 鉴定化合物 **12** 为木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯, 为新化合物。

但在黄芩甲醇提取液的液质分析图谱中 (图 2) 并未发现以上 2 个化合物, 而色谱图中 t_R 9.68 和 10.45 min 分别是木蝴蝶素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷和汉黄芩苷的吸收峰, 再经过 TLC 比对确认以上 2 个新化合物可能是提取分离过程中产生的人工产物。

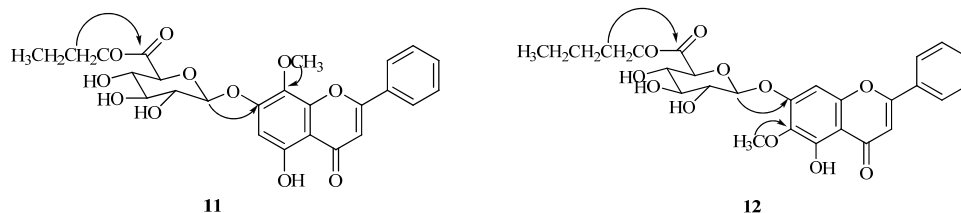


图 1 汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (11) 和木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 (12) 的结构

Fig. 1 Structures of wogonin 7-O- β -D-glucuronic acid butyrate ester (11) and oroxylin A-7-O- β -D-glucuronic acid butyrate ester (12)

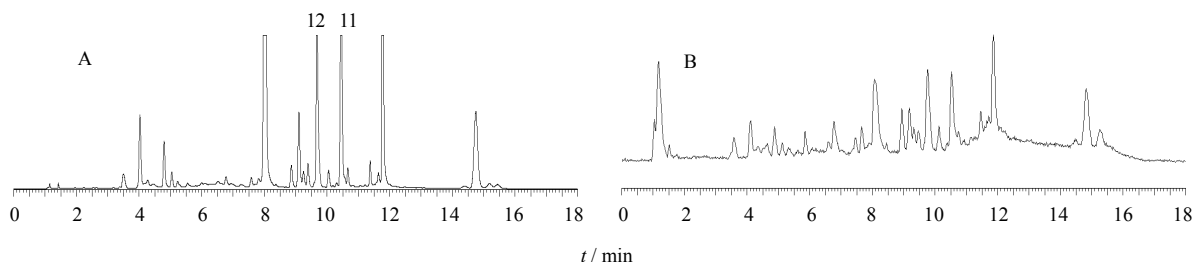


图 2 黄芩甲醇提取液 HPLC 色谱图 (A, 278 nm) 及总离子流图 (B)

Fig. 2 HPLC (A, 278 nm) and total ion current (B) of methanol extract from *S. baicalensis*

2.3 黄芩中黄酮类化合物凝血实验

2.3.1 供试品的制备 分别精密称取黄芩素 4.320 mg, 汉黄芩素 4.544 mg, 千层纸素 A 4.544 mg, 5, 7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮 4.576 mg, 5-甲氧基-7-羟基二氢黄酮 4.320 mg, 黄芩黄酮-II 5.984 mg, 鞣黄芩素-I 5.504 mg, 5, 7, 2', 5'-四羟基-8, 6'-二甲基黄酮 5.536 mg, 黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 8.256 mg, 木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯 8.256 mg, 汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯 7.584 mg, 黄芩苷 7.136 mg, 用含 5% DMSO, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液^[10]定

容至 10 mL, 配制成各 1.6 mmol/L 的供试品溶液。

2.3.2 数据统计方法 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行方差分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.3.3 实验方法与结果 家兔颈动脉插管取血, 血液装进含有 0.9 mL 枸橼酸钠的 10 mL 离心管中, 将血取尽, 血液样本以 3 000 r/min 离心 10 min, 得贫血小板血浆 (PPP), 取供试品溶液 10 μL 与血浆 50 μL 在测试杯中混匀^[11], 得到药物终质量浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 预热 3 min, 其余按凝血 4 项试剂盒要求进行测定。平行测定 3 次, 结果见表 1。

表1 黄酮类化合物对凝血四项体外作用的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Observation of flavonoids on four indexes of *in vitro* coagulation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

化合物 (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TT / s	PT / s	APTT / s	FIB / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白	21.55 $\pm$ 0.33	7.45 $\pm$ 0.24	42.42 $\pm$ 1.74	5.92 $\pm$ 0.39
黄芩素	16.60 $\pm$ 0.47**	6.35 $\pm$ 0.08**	47.03 $\pm$ 3.61 ^{▲▲}	5.98 $\pm$ 0.22
汉黄芩素	16.04 $\pm$ 0.35**	7.08 $\pm$ 0.18*	49.48 $\pm$ 2.69 ^{▲▲}	6.14 $\pm$ 0.44
千层纸素 A	16.48 $\pm$ 0.10**	6.55 $\pm$ 0.30**	50.25 $\pm$ 2.04 ^{▲▲}	5.89 $\pm$ 0.31
切黄芩素-I	16.79 $\pm$ 0.33**	4.25 $\pm$ 0.13**	47.95 $\pm$ 1.41 ^{▲▲}	6.01 $\pm$ 0.36
黄芩黄酮-II	17.58 $\pm$ 0.05**	6.63 $\pm$ 0.21**	45.10 $\pm$ 2.77	5.88 $\pm$ 0.25
5, 7, 2', 5'-四羟基-8, 6'-二甲基黄酮	16.05 $\pm$ 0.57**	6.65 $\pm$ 0.17**	58.38 $\pm$ 1.54 ^{▲▲}	5.94 $\pm$ 0.21
5, 7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮	13.08 $\pm$ 0.34**	6.26 $\pm$ 0.13**	54.00 $\pm$ 2.80 ^{▲▲}	6.06 $\pm$ 0.19
5-甲氧基-7-羟基二氢黄酮	17.28 $\pm$ 0.25**	4.28 $\pm$ 0.13**	56.95 $\pm$ 4.34 ^{▲▲}	5.87 $\pm$ 0.23
黄芩苷	16.98 $\pm$ 0.49**	6.80 $\pm$ 0.17**	68.20 $\pm$ 3.77 ^{▲▲}	6.02 $\pm$ 0.34
汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯	16.68 $\pm$ 0.46**	7.13 $\pm$ 0.31	54.98 $\pm$ 4.30 ^{▲▲}	5.70 $\pm$ 0.28
汉黄芩素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯	17.08 $\pm$ 0.56**	6.78 $\pm$ 0.40*	53.33 $\pm$ 1.07 ^{▲▲}	5.84 $\pm$ 0.17
木蝴蝶素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸丁酯	17.45 $\pm$ 0.17**	7.28 $\pm$ 0.53	40.38 $\pm$ 1.73*	6.06 $\pm$ 0.22

* $P<0.05$ 与空白组比较时间缩短, ** $P<0.01$ 与空白组比较时间显著缩短; [▲] $P<0.05$ 与空白组比较时间延长, ^{▲▲} $P<0.01$ 与空白组比较时间显著延长

* $P<0.05$ shorten time vs control group; ** $P<0.01$ obviously shorten time vs control group; [▲] $P<0.05$ prolonged time vs control group; ^{▲▲} $P<0.01$ obviously prolonged time vs control group

3 讨论

凝血实验结果表明, 黄芩中黄酮类化合物能显著缩短 TT、PT, 显著延长 APTT, 对 FIB 没有影响。各化合物构效关系呈现以下特点: ①黄酮苷元在外源性凝血途径的效果优于黄酮苷类化合物, 而黄酮苷类化合物的抗凝效果优于黄酮苷元。②对于 TT 和 PT, 二氢黄酮的凝血活性比黄酮类的强。③当黄酮苷元 B 环中有 2'-OH 时, 可显著缩短 TT, 而随着 B 环上取代基增多, 对凝血系统的影响也减弱。

参考文献

- [1] 路俊仙, 崔璐, 张才波, 等. 不同种质黄芩体外抑菌作用的研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 364-366.
- [2] Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of various flavonoids isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(12): 1613-1623.
- [3] Yoon S Y, dela Peña I C, Shin C Y, et al. Convulsion-related activities of *Scutellaria* flavones are related to the 5, 7-dihydroxyl structures [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 659(23): 155-160.
- [4] Kong E K, Yu S, Sanderson J E, et al. A novel anti-fibrotic agent, baicalein, for the treatment of

myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3): 175-178.

- [5] 吴静, 胡东, 王克霞. 黄芩和黄芩苷对幽门螺杆菌的体外抗菌活性研究 [J]. 中药材, 2008, 31(5): 707-710.
- [6] Kim S J, Moon Y J, Lee S M. Protective effects of baicalin against ischemia/reperfusion injury in rat liver [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(12): 2003-2008.
- [7] 徐丹洋, 陈佩东, 张丽, 等. 黄芩的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 78-80.
- [8] Wu S J, Sun A L, Liu R M. Separation and purification of baicalin and wogonoside from Chinese medicine plant *scutellaria baicalensis* Georgi. by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066(1/2): 243-247.
- [9] Tomimori T, Miyaichi Y, Kizu H. On the flavonoid constituents from the roots of *Scutellaria baicalensis* Geogei I [J]. *Yakukaku Zasshi*, 1982, 102(4): 388-391.
- [10] 刘立, 马宏越, 段金殿, 等. 凝血酶时间法的改进及对四物汤类方筛选研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 68-71.
- [11] Li L, Ma H, Yang N, et al. A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: structure-activity relationships [J]. *Thromb Res*, 2010, 176(5): e365-e378.