

不同黑种草子挥发油中百里醌的含量

乌云毕力格¹, 浩斯劳¹, 呼格吉勒¹, 特木其乐^{2*}, 胡日查^{3*}

¹鄂尔多斯市伊金霍洛旗蒙医综合医院脑病科、制剂中心, 内蒙古 鄂尔多斯

²内蒙古国际蒙医医院五疗脑病科, 内蒙古 呼和浩特

³内蒙古大学化学与化工学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2025年1月26日; 录用日期: 2025年2月18日; 发布日期: 2025年2月28日

摘要

目的: 测定不同产地黑种草子挥发油中百里醌的含量。方法: 将5种不同产地的黑种草子用两种不同化学提取方法提取挥发油, 建立定量核磁共振波谱法测定挥发油中的百里醌。使用500 MHz Bruker Avance III (TMS, $\delta = 0$ ppm)核磁共振谱仪, 以氘代氯仿为溶剂, 在测定温度25℃、延迟时间2 s和扫描次数64的条件下扫描, 通过化学移位及峰面积归一化法测定各黑种草子挥发油中百里醌相对百分比含量。结果: 以化学位移在 $\delta = 6.5$ ppm与 $\delta = 6.6$ ppm处的百里醌的氢质子峰作为定量峰, 其峰面积比与其质量比的线性回归方程为 $Y = 0.493x - 0.0005$, 相关系数为0.999。5种不同产地黑种草子挥发油中百里醌在方法1中测得USA1 (0.065%)、USA2 (0.093%)、USA3 (0.043%)、Tibe (0.043%)、Guangxi (0.062%)。在方法2中测得USA1 (0.263%)、USA2 (0.153%)、USA3 (0.037%)、Tibet (0.200%)、Guangxi (0.224%)。结论: 分析结果表明, 因产地及提取方法差异, 黑种草子挥发油中百里醌含量测定是有差异的。文章通过测定不同产地黑种草子挥发油中的百里醌含量, 为进一步研究开发黑种草子的药用价值奠定基础。

关键词

黑种草子, 挥发油, 定量核磁共振, 百里醌

Content of Thymoquinone in Volatile Oil from Black Seed (Nigella) of Different Habitats

Yunbilige Wu¹, Silao Hao¹, Gejile Hu¹, Muqile Te^{2*}, Richa Hu^{3*}

¹Department of Encephalology and Preparation Center, Yijinhuoluo Banner Mongolian Medicine General Hospital, Ordos Inner Mongolia

²Department of Encephalopathy (V), International Mongolian Hospital of Inner Mongolia, Hohhot Inner Mongolia

³College of Chemistry & Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot Inner Mongolia

Received: Jan. 26th, 2025; accepted: Feb. 18th, 2025; published: Feb. 28th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 乌云毕力格, 浩斯劳, 呼格吉勒, 特木其乐, 胡日查. 不同黑种草子挥发油中百里醌的含量[J]. 分析化学进展, 2025, 15(1): 101-107. DOI: 10.12677/aac.2025.151011

Abstract

Objective: To determine the content of quinone in volatile oil from black seed (*Nigella*) of different habitats. **Methods:** The essential oils were extracted from the seeds of black grass from five different habitats by two different chemical extraction methods, and the thymoquinone in the essential oils was determined by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. A 500 MHz Bruker Avance III (TMS, $\delta = 0$ ppm) nuclear magnetic resonance spectrometer was used, with deuteriochloroform as the solvent, at a measurement temperature of 25°C, a delay time of 2 seconds, and 64 scans, to determine the relative percentage content of thymoquinone in the volatile oils of black grass seeds by chemical shift and peak area normalization. **Results:** Using the hydrogen proton peak of thymoquinone with a chemical shift at $\delta = 6.5$ ppm and $\delta = 6.6$ ppm as the quantitative peak, the peak area ratio of thymoquinone and its mass ratio were linear regression equation $Y = 0.493x - 0.0005$, the correlation coefficient was 0.999, and thymoquinone in volatile oils of black grass from five different habitats was determined as USA1 (0.065%), USA2 (0.093%), USA3 (0.043%), Tibet (0.043%), Guangxi (0.062%) in method 1. In method 2, USA1 (0.263%), USA2 (0.153%), USA3 (0.037%), Tibet (0.200%), and Guangxi (0.224%) were measured. **Conclusion:** The results showed that there were differences in the determination of thymoquinone content in the essential oil of *Herba Nigella* due to the differences in origin and extraction methods. In this paper, the content of thymoquinone in the essential oil of black seed grass from different habitats was determined to lay a foundation for further research and development of the medicinal value of black seed grass.

Keywords

Nigella, Volatile Oil, Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR), Thymoquinone

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

毛茛科黑种草属(*Nigella*)植物约有 18 种, 其中常见的有 3 种, 黑种草(*Nigella damascena*)、果黑种草(又名家黑种草, *Nigella sativa*)主要分布于南欧、西南亚、北非等地区, 腺毛黑种草(又名瘤果黑种草, *Nigella glandulifera*)是中国新疆特产, 在云南傣族和内蒙古等地区也有应用[1]。蒙医常用腺毛黑种草的干燥成熟种子[2]。黑种草子蒙古名叫“哈日 - 孜拉”, 别名为塞拉纳赫布[3]; 该药味甘、辛、性温、效轻、糙、燥。它可以在食物中当作香料使用, 同时也被作为药物在许多国家使用, 主要用于哮喘、咳嗽、支气管炎、头痛、风湿、糖尿病、高血压等疾病的治疗[4][5]。并且它在蒙医临床上应用也是很广泛的。例如黑种草子在蒙医上用于哈日不日七味散、照山白八味散、黑种草子五味散及额日敦乌日乐等许多蒙药制剂中。黑种草子中的活性物质百里醌(Thymoquinone, TQ), 被报道具有抗氧化、抗炎性反应和抗肿瘤作用, 可用于多种疾病的治疗。百里醌化学名称为 2-异丙基-5-甲基-1,4-苯并醌, 分子式为 $C_{10}H_{12}O_2$ [6]。

核磁共振是一种物理现象, 是电磁波与原子核自旋在强磁场条件下发生的。核磁共振波谱不仅可以用来对各种有机物和无机物的结构、成分进行定性分析, 而且还可以定量研究。近几年来, 定量核磁共振波谱(Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, qNMR)方法已被广泛用于化学药物[7]-[11]、中药与植物提取物[12]-[17]、体液样品[18][19]、异构体[20]、食品[21][22]等的定量分析。

本研究在对 5 种不同产地黑种草子样品进行有效提取的基础上, 建立 qNMR 定量测定黑种草子挥发

油中的百里醌含量,为进一步研究开发黑种草子药用价值奠定基础。

2. 材料

黑种草子分别购自美国、广西、西藏等地区;磁力搅拌加热器(德国 IKA 09002377);旋转蒸发仪(瑞士步琦型号 BUCHI-R-210);电子天平(美国 Ohaus);高分辨核磁共振波谱仪(Bruker Avance III 500M);蛇形冷凝管 1 个;索氏提取器 1 个;100 mL 圆底烧瓶 1 个;干燥器 1 个;石油醚(天津市风船化学试剂科技有限公司);氘代氯仿(产品编号 A111001);百里醌标准样品。

3. 方法与结果

3.1. 提取挥发油的方法

1) 将五种不同产地的黑种草子粉末等量 $m = 0.2\text{ g}$ 各取 6 组,每组分别用石油醚(10 mL)溶剂浸泡 16 h,在旋转仪旋转 17 h,离心机上以转速 8000 rpm/min,离心 15 min。提取 3 mL 清液,氮气吹干。

2) 将五种不同产地的黑种草子粉末各称取 $m = 0.5\text{ g}$ 放入提取筒中,将 100 mL 圆底烧瓶放入油锅中,取石油醚(50 mL)倒入圆底烧瓶内,装好索氏提取装置,将温度调至在 80°C ,恒温回馏 8 h,过滤、旋转蒸馏、氮气吹干、称重。

3.2. 核磁(NMR)测定挥发油中百里醌含量

3.2.1. NMR 的检测条件及方法

测定温度(探头温度):室温 25°C ,脉冲延迟时间: $dl = 2\text{ s}$;扫描次数: $ns = 64$ 。称取 3 mg 百里醌标准样品溶于 0.6 mL 氘代氯仿中,再转入核磁管内,用 500 MHz Bruker Avance III (TMS, $\delta = 0\text{ ppm}$)按上述条件调整仪器参数,核磁共振谱仪测得标准样品百里醌的氢谱标准峰如图 1 所示,在 $\delta = 6.6\text{ ppm}$ 处是 1 位置氢的特征峰, $\delta = 6.5\text{ ppm}$ 处是 1'位置氢的特征峰, $\delta = 3.0\text{ ppm}$ 处是 2 位置氢的特征峰, $\delta = 2.0\text{ ppm}$ 处是 3 位置氢的特征峰, $\delta = 1.0\text{ ppm}$ 处是 3'位置氢的特征峰。

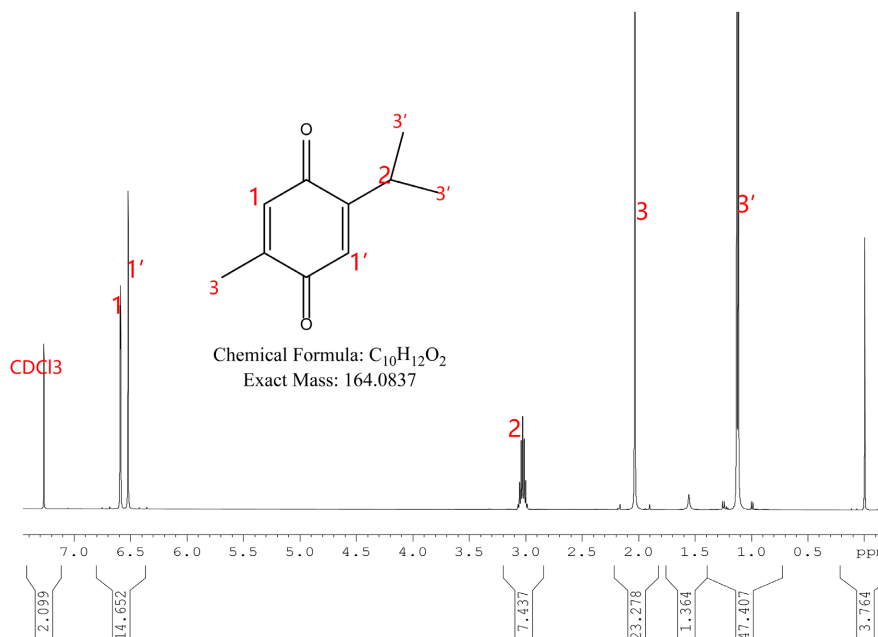


Figure 1. ^1H -NMR spectrum of the standard substance thymoquinone

图 1. 标准物百里醌的 ^1H -NMR 谱图

3.2.2. 以不同浓度的百里醌标准样品制作标准曲线

将百里醌标准样品调配成 0.0625 mg/ml、0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml 四种不同浓度，在 NMR 上以上述条件检测峰面积制作标准曲线，见图 2 (横坐标是浓度，纵坐标是峰面积)。其峰面积比与其质量比的线性回归方程为 $Y = 0.493x - 0.0005$ ，相关系数为 0.999。

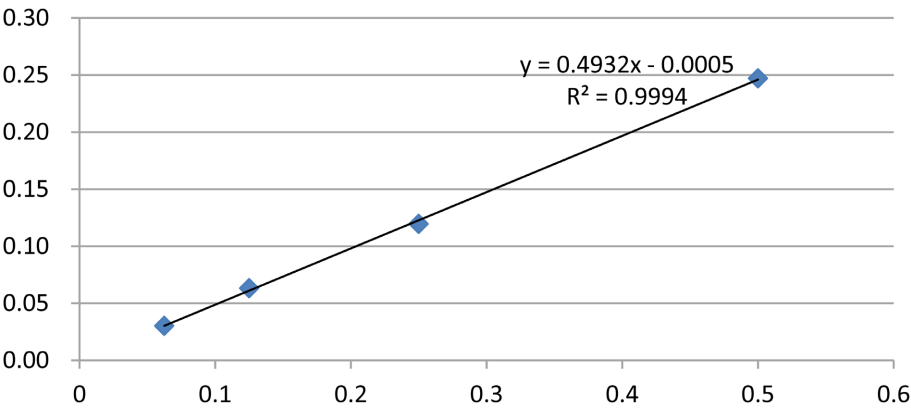


Figure 2. TQ standard curve
图 2. 百里醌(TQ)的标准曲线

3.2.3. 测定不同产地黑种草子挥发油中百里醌含量百分比

将 5 种黑种子在用两种不同方法所提取的挥发油中各提取 20 μ l 溶于 0.6 ml 氘代氯仿中，再转入核磁管中，用 500 MHz Bruker Avance III (TMS, $\delta = 0$ ppm)按上述条件调整仪器参数测量以上样品的氢谱。其中，图谱的横坐标表示化学位移(单位: ppm)，代表谱峰位置，纵坐标表示吸收峰的强度，而在测试结果谱图中一般情况下不画纵坐标，只有横坐标(图 3、图 4)。

按上述的实验条件和方法，测定五种不同产地黑种草子提取的挥发油中百里醌的峰面积，根据峰面积归一化法测定五种样品中百里醌相对含量百分比，结果见表 1。

Table 1. Determination results of thymoquinone content (%)
表 1. 百里醌含量测定结果(%)

样品	方法 1	方法 2
USA1	0.065	0.263
USA2	0.093	0.153
USA3	0.043	0.037
Tibet	0.043	0.200
Guangxi	0.062	0.224

4. 讨论

试验结果表明不同地区生长的黑种草子提取的挥发油中百里醌含量是有差距的。耿东升等[23]从瘤果黑种草的种子中采用水蒸气蒸馏法与 SFE-CO₂ 萃取提取挥发油；郝海峰[24]等将 6700 g 瘤果黑种草的干燥种子粉碎后，以石油醚(30℃~60℃)连续回流提取至无油脂，回收溶剂，得种子油 3646 g。因提取方法的不同导致挥发油中百里醌含量不同。核磁共振波谱法测百里醌含量线性关系、精密度和稳定性良好，

具有快速、简便、不破坏样品的特点,最大优点是在难以得到被测样品的基准物质或对照品时,可以选用其他化合物对照品的特征峰进行定量测定。

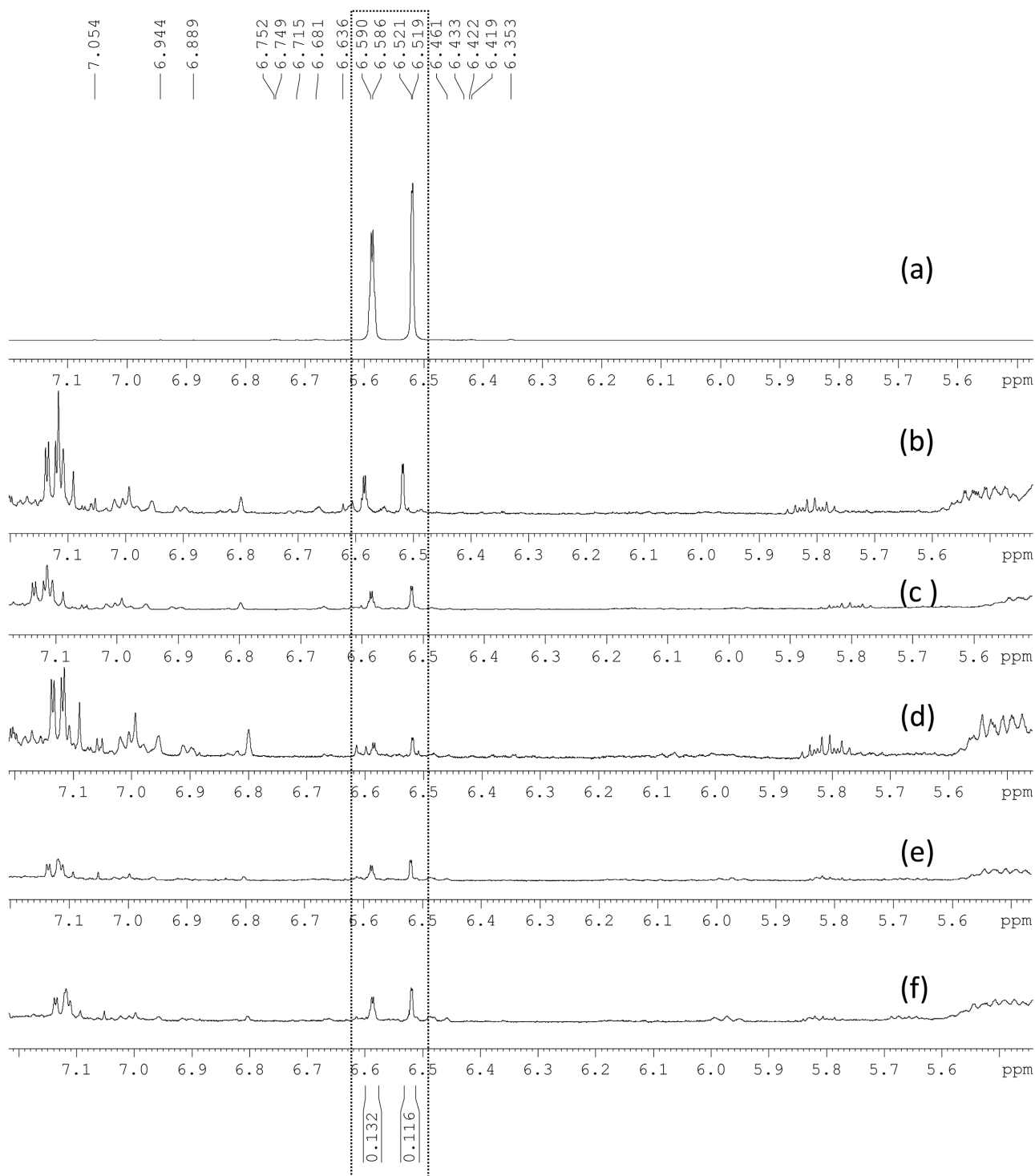


Figure 3. Method 1 extract the ^1H -NMR spectrum of TQ in the volatile oil, (a)~(f) are USA1, USA2, USA3, Tibet, Guangxi, respectively (solvent: CDCl_3)

图 3. 方法 1 提取挥发油中 TQ 的 ^1H -NMR 谱图, (a)~(f) 分别为 USA1、USA2、USA3、Tibet、Guangxi (solvent: CDCl_3)

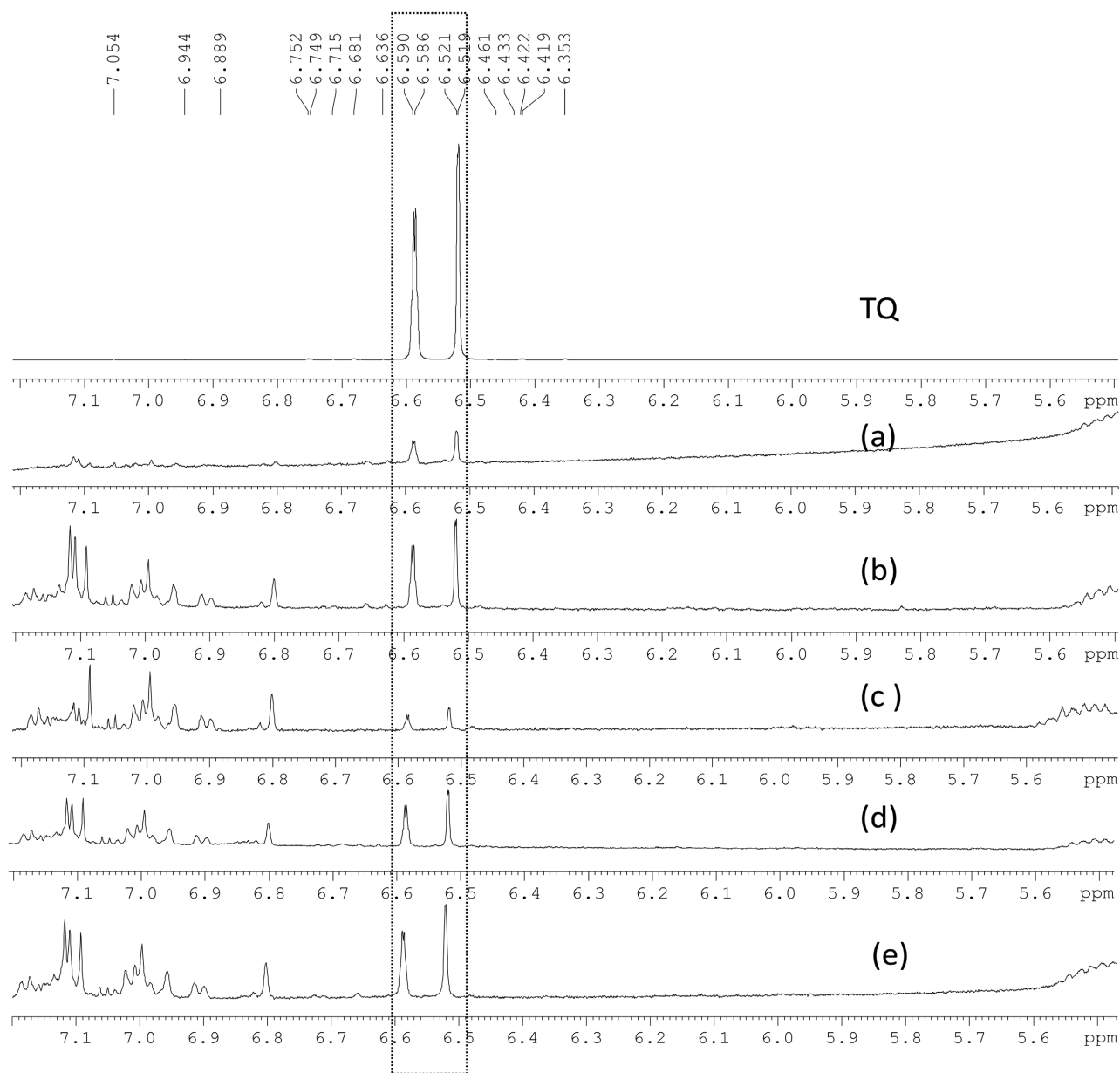


Figure 4. Method 2 extract the ^1H -NMR spectrum of TQ in the volatile oil, (a)~(f) are USA1, USA2, USA3, Tibet, Guangxi, respectively (solvent: CDCl_3)

图 4. 方法 2 提取挥发油中 TQ 的 ^1H -NMR 谱图, (a)~(f) 分别为 USA1、USA2、USA3、Tibet、Guangxi (solvent: CDCl_3)

黑种草子具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用,因而具有止咳平喘、抗肿瘤、保肝、降脂等多方面的药理功效,并可通过其中富含的挥发油、皂苷、黄酮、生物碱等多种生物活性物质发挥功效。近年来发现从黑种草子油中分离出来的主要有效单体百里醌具有抗氧化、抗炎性反应和抗肿瘤作用,可用于多种疾病的治疗。随着今后对黑种草子传统用途及其药效物质基础的进一步深入探索,将为黑种草子的传统临床应用进行科学阐释,为今后黑种草子的深入开发利用提供科学依据。

参考文献

- [1] Xin, X.L., Xue, H.Q., Aisa, H.A., *et al.* (2008) Research Development of the Plants of *Nigella Gerus*. *Lishizhen Medicine*

- and *Materia Medica Research*, **19**, 1514-1517.
- [2] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙药材标准[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1987: 94-95.
- [3] 布和巴特儿. 传统蒙药与方剂[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2013: 65.
- [4] Mohamed, A., Afridi, D.M., Garani, O., *et al.* (2005) Thymoquinone Inhibits the Activation of NF- κ B in the Brain and Spinal Cord of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Biomedical Sciences Instrumentation*, **41**, 388-393.
- [5] Woo, C.C., Kumar, A.P., Sethi, G. and Tan, K.H.B. (2012) Thymoquinone: Potential Cure for Inflammatory Disorders and Cancer. *Biochemical Pharmacology*, **83**, 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.09.029>
- [6] Sakamoto, J., Matsui, T. and Kodera, Y. (2009) Paclitaxel Chemotherapy for the Treatment of Gastric Cancer. *Gastric Cancer*, **12**, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s10120-009-0505-z>
- [7] Sharma, R., Gupta, P.K., Mazumder, A., Dubey, D.K., Ganesan, K. and Vijayaraghavan, R. (2009) A Quantitative NMR Protocol for the Simultaneous Analysis of Atropine and Obidoxime in Parenteral Injection Devices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**, 1092-1096. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.035>
- [8] 高照明, 张玉冰, 于永良. 核磁共振内标法定量分析肝素钠中多硫酸软骨素[J]. 分析化学, 2011, 39(4): 601-602.
- [9] 郭强胜, 石高旗, 宋巍, 许旭. 马来酸氯苯那敏片剂的核磁共振定量测定方法研究[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2011, 11(2): 123-128.
- [10] 郭强胜, 石高旗, 宋巍, 等. NMR 定量测定片剂中的对乙酰氨基酚[J]. 分析测试学报, 2012, 31(1): 117-120.
- [11] 张才煜, 张娜, 何兰. 核磁共振内标法测定波生坦的含量[J]. 药学学报, 2014, 49(2): 249-251.
- [12] 高翔, 陈东军, 马艳春, 等. 消癌平注射液中牛奶菜醇的 NMR 定量分析[J]. 波谱学杂志, 2012, 29(3): 410-418.
- [13] 易进海, 刘云华, 陈燕, 等. 核磁共振波谱法测定藁本内酯对照品的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 680-682.
- [14] 杨扬, 潘勤, 丁黎, 吴晓磊. QNMR 法测定川芎药材中的有效成分[J]. 华西药学杂志, 2013, 28(2): 192-194.
- [15] Fan, G., Zhang, M.Y., Zhou, X.D., Lai, X.R., Yue, Q.H., Tang, C., *et al.* (2012) Quality Evaluation and Species Differentiation of Rhizoma Coptidis by Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **747**, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.038>
- [16] Staneva, J., Denkova, P., Todorova, M. and Evstatieva, L. (2011) Quantitative Analysis of Sesquiterpene Lactones in Extract of Arnica Montana L. by ^1H NMR Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54**, 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.018>
- [17] Chauthé, S.K., Sharma, R.J., Aqil, F., Gupta, R.C. and Singh, I.P. (2012) Quantitative NMR: An Applicable Method for Quantitative Analysis of Medicinal Plant Extracts and Herbal Products. *Phytochemical Analysis*, **23**, 689-696. <https://doi.org/10.1002/pca.2375>
- [18] Salem, A.A., Abdou, I.M. and Saleh, H.A. (2012) Application of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Determination of Amantadine and Acyclovir in Plasma and Pharmaceutical Samples. *Journal of AOAC International*, **95**, 1644-1651. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-165>
- [19] 杨亮, 茹阁英, 唐惠儒, 刘朝阳. 核磁共振信号内标法在人体尿液定量分析中的应用[J]. 分析化学, 2010, 38(6): 789-794.
- [20] Li, J., Geng, Z.F., Liu, P. and Deng, Z.W. (2012) NMR Analysis of a Pair of Isomers. *Chinese Chemical Letters*, **23**, 1181-1184. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2012.07.008>
- [21] del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R. and Zuriarrain, J. (2010) Quantitative Determination of Caffeine, Formic Acid, Trigonelline and 5-(Hydroxymethyl)Furfural in Soluble Coffees by ^1H NMR Spectrometry. *Talanta*, **81**, 367-371. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.010>
- [22] Schievano, E., Guardini, K. and Mammi, S. (2009) Fast Determination of Histamine in Cheese by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2647-2652. <https://doi.org/10.1021/jf803364k>
- [23] 耿东升, 张淑锋, 兰建国, 等. 瘤果黑种草子挥发油的化学成分分析及百里醌的定量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2287-2290.
- [24] Zhivotovsky, B. (2006) Carcinogenesis and Apoptosis: Paradigms and Paradoxes. *Carcinogenesis*, **27**, 1939-1945. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl035>