

本文引用:欧阳文,张恒,王玉凤,韩越,王雄龙,裴刚,何桂霞.中药化学教研实践体会商榷:以土牛膝物质基础研究为例[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1403-1409.

中药化学教研实践体会商榷 ——以土牛膝物质基础研究为例

欧阳文^{1,2,3},张恒¹,王玉凤¹,韩越¹,王雄龙³,裴刚¹,何桂霞¹

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.浏阳市中医医院,湖南浏阳410300;
3.湖南时代阳光博士后科研流动站协作研发中心,湖南永州410116)

[摘要] 中药化学是运用现代科学理论与方法研究中药化学成分的一门学科。中药化学的教研内容主要包括各类有效成分的提取分离、结构鉴定、生源途径等。本文以土牛膝的物质基础研究为例,对课题组的科研经验进行交流,和师生商榷中药化学领域的实践问题。

[关键词] 中药化学;教研;实践体会;土牛膝;物质基础

[中图分类号]R284 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.029

Discussion on teaching and research practice of Chinese medicine chemistry: Taking the study of material basis of *Achyranthes bidentata* as an example

OUYANG Wen^{1,2,3}, ZHANG Heng¹, WANG Yufeng¹, HAN Yue¹, WANG Xionglong³, PEI Gang¹, HE Guixia¹

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang, Hunan 410300, China; 3. Hunan Era Sunshine Collaborative R&D Center for Post-doctoral Studies, Yongzhou, Hunan 410116, China)

[Abstract] Chinese medicine chemistry is a discipline that studies the chemical constituents of Chinese medicine by using modern scientific theories and methods. The teaching and research contents of Chinese medicine chemistry mainly include the extraction and separation of various effective components, structure identification, and biosynthetic pathways. In this paper, study on the material basis of *Achyranthes bidentata* was taken as an example to exchange the scientific research experience and discuss the practical problems with teachers and students in the field of Chinese medicine chemistry.

[Keywords] Chinese medicine chemistry; teaching and research; practice experience; *Achyranthes bidentata*; material basis

“中药化学”是指在中医药理论指导下,结合临床用药经验,运用现代的科学理论和技术研究中药化学成分的学科^[1]。该学科通过研究中药药

效物质基础来探索中药发挥药效的化学成分,从而构建中医药与现代医学的桥梁,加快推进中医药现代化^[2]。

[收稿日期]2022-03-30

[基金项目]湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJG-2021-0577);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30500);湖南省中医药科研计划项目(2021060);湖南省研究生科研创新项目(CX20210709);湖南省大学生创新创业训练计划项目(湘教通[2021]197号);湖南中医药大学学位与研究生教育教学改革研究课题(2021JG04)。

[第一作者]欧阳文,男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药效物质基础与作用机制研究,E-mail:oyw810225@126.com。

在中药化学的教学过程中,有部分师生对该课程还存在一定的理解误区,容易导致错误的思维定式。因此,不论是教师还是学生,仅掌握书本理论是远远不够的,必须不断学习该领域的新发展、新动态,通过科研工作积累的知识和经验,补充和丰富该课程的教学内容,从而能更好地教好该门课程。课题组在土牛膝的物质基础研究实践中获得了很多有意义的知识,并成功将科研成果运用到中药化学的理论教学之中,取得了较好成效,现从成分提取、分离、鉴定等方面进行交流。

1 成分提取的教研体会

中药化学的提取方法有多种,在平时提取中运用最多的方法仍然是溶剂提取法,该方法运用的是“相似相溶”的原理,即成分与溶剂两者的极性越相近,则溶解度更大^[3]。如提取皂苷类化合物,因极性较大,一般推荐采用甲醇或70%乙醇进行提取。

土牛膝主要的物质基础是皂苷类,然而在实践中发现采用100%乙醇提取、70%乙醇提取或热水煎煮,很难有效提取出总皂苷,通过实践发现,30%~50%乙醇提取的总皂苷提取率可达到2%。另外,因土牛膝主要为酸性皂苷,含醇溶剂中加入适当的氢氧化钾等碱性物质,提取效率更高。在提取、浓缩时,土牛膝皂苷类成分很容易析出,析出物若再采用30%~50%乙醇进行溶解时则难以溶解,在实践中探索发现,正丁醇-甲醇-水系统具有较好的溶解能力。本文拟通过该案例说明,将科研实践知识与教科书理论相结合,探索出最优的提取条件。

2 化合物分离的教研体会

2.1 结晶的化合物可能是混合物

结晶和重结晶是利用温度或溶剂不同引起化合物溶解度的改变,通过析出晶体,从而达到分离纯化物质的目的,是中药有效成分分离最重要的一种方法^[4-5]。在实践教学中,有相当多的同学误认为结晶就是纯化合物,应该指明的是,结晶虽一般是同种分子定向排列,但也可以是同类分子的定向排列,因此,析出的晶体仍然有可能是混合物。

在近期研究中,本课题组对土牛膝中低极性组分进行分离,获得了菠菜甾醇类混合结晶。通过对

该晶体进行高效液相色谱分析,可见3个不同保留时间的色谱峰,进一步经过制备液相色谱分离和核磁共振波谱法鉴定,3个峰分别鉴定为菠菜甾醇、7,8-二氢菠菜甾醇、22,23-二氢菠菜甾醇,具体结构如图1所示。从结构上看,3种菠菜甾醇分子的结构极其类似,仅存在双键位置和数量的差异,容易共同析出结晶。

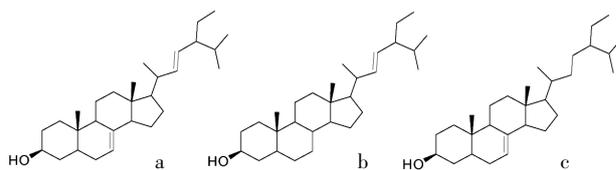


图1 3种菠菜甾醇结构

注:a.菠菜甾醇;b.7,8-二氢菠菜甾醇;c.22,23-二氢菠菜甾醇

2.2 低极性化合物宜采用反相色谱分离

一般极性偏小的化合物或中极性的化合物,中药化学教材推荐采用硅胶或氧化铝吸附层析法分离,原理是利用化合物的极性差异,选择合适的洗脱溶剂,让被分离成分在流动相和固定相之间进行连续多次的吸附与解析吸附,从而达到分离目的^[6]。通过实践发现,能够被固定相保留是能否使用该种方法分离的最重要依据。硅胶和氧化铝均为极性吸附剂,对极性很小的化合物没有保留差异,因此分离效果并不理想。

仍以图1中3种菠菜甾醇混合结晶的分离为例。在实践中采用硅胶柱层析分离,无论硅胶是否活化及采用哪种溶剂系统洗脱分离,3种物质之间均没有保留差异,因此没有明显分离效果。相反,C₁₈反向色谱柱对小极性化合物的吸附能力较强^[7],上述3种菠菜甾醇混合结晶可以被C₁₈反向填料牢牢吸附,虽然用纯甲醇或纯乙腈都很难洗脱下来,但通过摸索,在乙腈或甲醇中添加少许异丙醇(具体见后续制备液相色谱条件),3种菠菜甾醇混合结晶的分离度明显得到优化,达到满意的分离效果。

2.3 极性较大的皂苷类化合物宜采用正相硅胶色谱分离

皂苷是一类极性偏大的化合物,教材所介绍的具体分离方法包括反相色谱、正相硅胶柱色谱等,尤其现代研究认识到反相色谱因其具有分离效率高、重现性好等优点,在皂苷的分离分析方面应用广泛^[8-9]。

课题组分离土牛膝皂苷类化合物时,首先采用了反相硅胶柱色谱进行分离,虽然可以达到一定的分离效果,却存在着吸附力不牢固、易串点、分离度差等缺点。根据被分离化合物能否被固定相保留这一依据,改用正相硅胶柱色谱来分离,因硅胶是强极性吸附剂,皂苷类化合物的极性也比较大,因此应增大洗脱剂极性,通过摸索取得了一定研究进展,以土牛膝酸性皂苷竹节参皂苷IVa为例,最终确定分离条件为正相硅胶柱层析分离,乙酸乙酯:88%甲酸水溶液(体积比为20:1),通过两次硅胶柱分离,从皂苷混合物中获得了竹节参皂苷IVa的针状结晶。

2.4 制备液相色谱应用心得

制备液相色谱是指采用液相色谱技术制备纯物质,即分离收集一种或多种物质,是中药有效成分分离最有效的一种手段。制备液相色谱中的“制备”这一概念指获得一定量的单一化合物,但实验用制备色谱仪一次能分离的化合物量太少,因此,常规正相、反相柱色谱能分离的情况下,则不宜采用制备液相进行分离。且当样品还很复杂时,不建议直接进行制备分离。

使用制备液相色谱时,首先需保证样品尽可能纯净,或样品只含两至三个单体化合物。另外,制备液相色谱流动相条件的摸索非常重要,由于样品中可能存在结构相似的化合物,因此对流动相条件的要求极其苛刻。以土牛膝中3种菠菜甾醇类混合结晶为例,通过不断摸索得出最佳制备方法为:YMC-Pack ODS-A半制备色谱柱(日本YMC公司,10 mm×250 mm,5 μm粒径),乙腈:异丙醇(体积比为2.1:0.9),每次进样0.1 mL,检测波长205 nm。3种菠菜甾醇的高效液相色谱图,如图2所示。

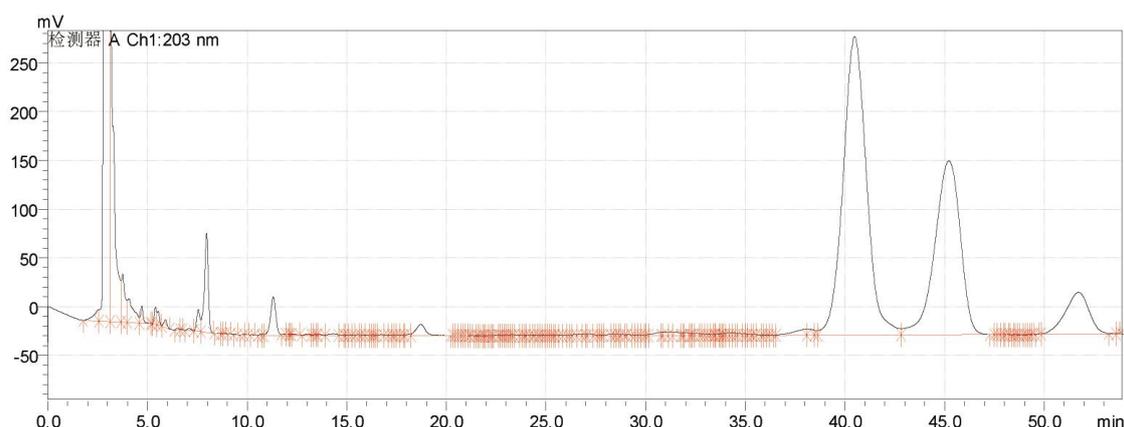


图2 3种菠菜甾醇混合晶体样品的高效液相色谱图

3 化合物结构鉴定的教研体会

3.1 氢谱可用于化合物纯度分析

核磁共振氢谱可以对化合物中不同化学环境的氢原子进行判别,用来确定分子结构。值得注意的是,氢谱中峰的面积与所含氢的个数成正比关系,因此,可以通过分析氢谱来判断化合物纯度。

图3为前文所述的菠菜甾醇类混合结晶的氢谱图,由图可见,在化学位移0.80~0.90的区间,各峰之间的峰面积比例不合理,以最高场 δ_{H} 0.559 3、0.574 1两个峰为例,根据氢谱知识,该两峰显然各自为甲基,两者峰面积之比为2.19:2.65,提示分子不纯。对混合结晶制备分离后的氢谱见图4。通过对比可以看出,分离纯化之后的氢谱更加合理,最高场之处只有1个 δ_{H} 0.575 2的甲基峰,其他各峰之间的峰面积也成比例,说明化合物已经纯化。

3.2 碳谱解析中重视类似化学结构碳谱数据的收集

不同于化学合成分子的结构鉴定,有机合成中,起始的原料都是已知的,还可通过反应的原理推测最终产物分子的结构,然而对于天然分子,即使是已知化合物,包括结构类型、取代基等结构信息仍是有限度的,因此,中药活性成分鉴定是中药化学教学的重点和难点。碳谱是一种重要的结构鉴定的波谱手段,可以给出有机化合物包括季碳在内的“骨架”信息,以及判断分子是否对称,并具有分辨率高的特点。

碳谱中,取代基具有位移效应,增加或减少一个取代基,一般对碳谱中 α -C、 β -C、 γ -C的影响较大,尤以直接相连的 α -C变化最大,但 δ -C及以上的化学位移值变化就不明显了。换言之,取代基位移效应

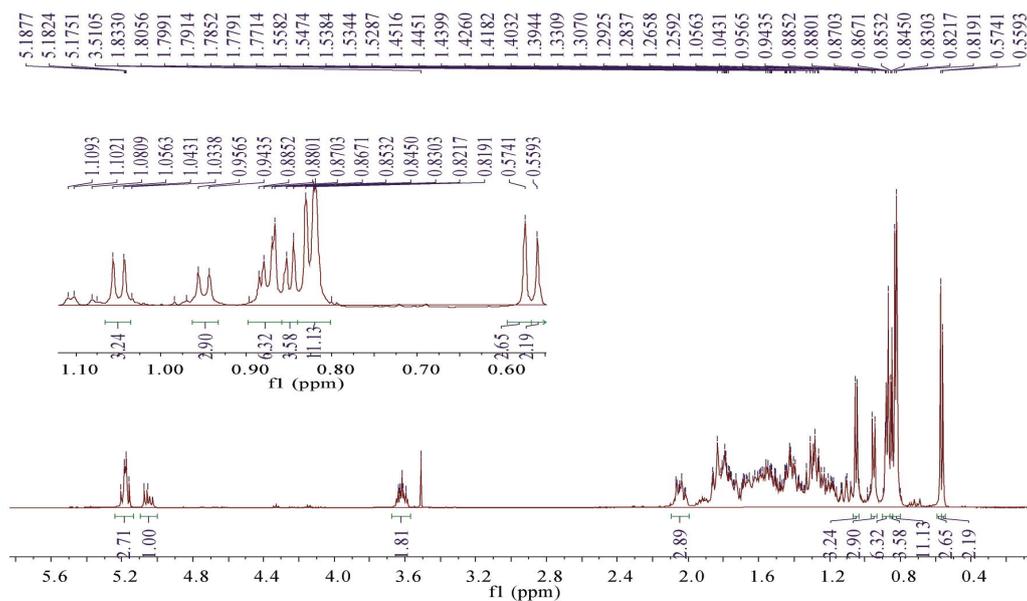


图3 混合结晶的氢谱图

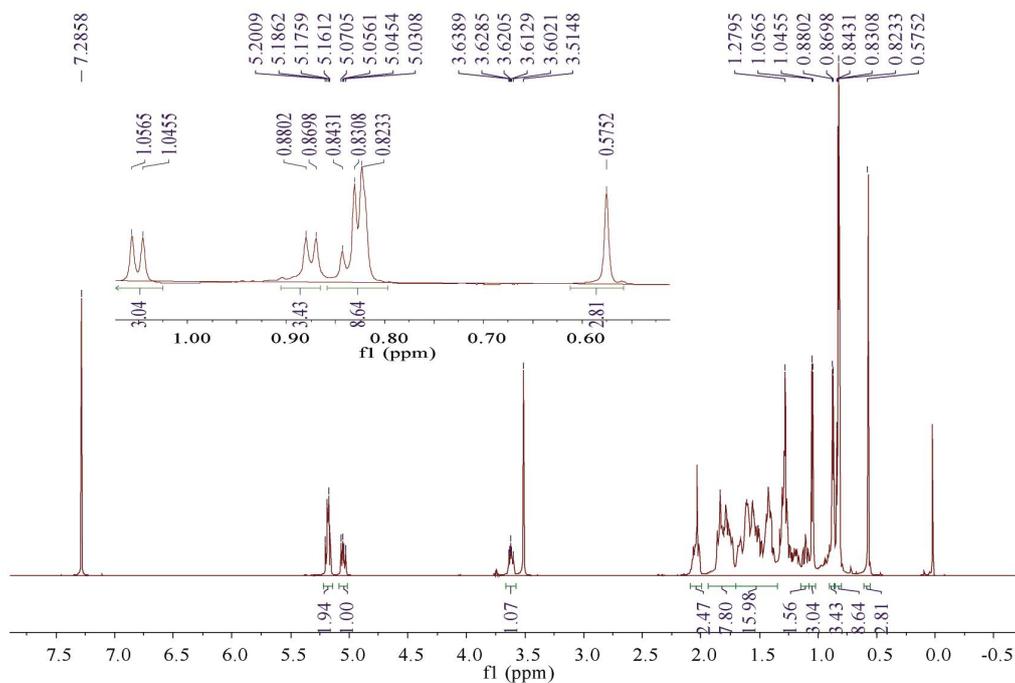


图4 菠菜甾醇(分离后峰1)的氢谱图

主要影响的是局部碳化学位移值,因此,掌握收集更多种类类似结构的碳谱数据在碳谱解析中具有重要的意义。实践中可将未知化合物的碳谱与相似模型化合物碳谱数据比较,数据相同部分的结构也应该一致,不同的碳谱数据,可能是由差异取代基所产生。

例如,土牛膝中竹节参皂苷 I、竹节参皂苷 IVa 和竹节参皂苷 IVa 丁酯 3 种皂苷类的化学结构和碳谱数据分别见图 5、表 1。比较竹节参皂苷 I 和竹节参皂苷 IVa,竹节参皂苷 IVa 是竹节参皂苷 I 中 C-3 羟基葡萄糖醛酸苷化,因此,其 C-3 化学位移相比竹

节参皂苷 I 变化较大,相邻位点的 C-2 和 C-4 化学位移也有一定变化,其余位置碳谱数据变化不大。竹节参皂苷 IVa 丁酯是在竹节参皂苷 IVa 的 Glu-6 上羧基丁酯基化,因此,其碳谱数据中 Glu-6 碳的化学位移相比于竹节参皂苷 IVa 具有较大变化,而对其他距离取代基较远碳原子的化学位移影响较小或无。

同种植物中次生代谢产物都有相似的生物合成路径,或者不同次生代谢产物生物合成过程是相互关联的,因此,在中药活性成分结构鉴定时,应该重视类似结构的收集,掌握同一植物中一些基本母核

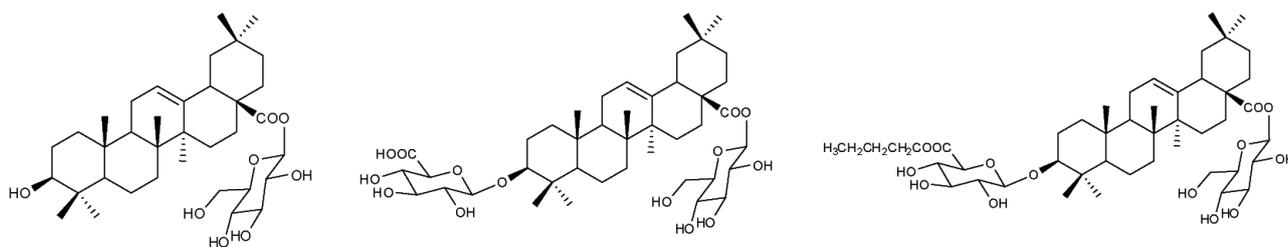


图5 土牛膝中3种皂苷类化合物的化学结构

表1 土牛膝中3种相似皂苷谱学数据(150 MHz, δ ppm)

NO	δ			NO	δ		
	I	IVa	IVa 丁酯		I	IVa	IVa 丁酯
C-1	38.7	38.6	38.4	C-16	23.6	23.7	23.5
C-2	27.8	26.5	26.4	C-17	46.7	46.9	46.7
C-3	77.8	89.0	88.8	C-18	41.5	41.6	41.5
C-4	39.1	39.4	39.2	C-19	46.0	46.1	45.9
C-5	55.5	55.7	55.5	C-20	30.5	30.7	30.6
C-6	18.6	18.4	18.2	C-21	33.7	33.9	33.7
C-7	32.8	33.0	32.9	C-22	32.3	32.4	32.3
C-8	39.7	39.8	39.6	C-23	28.5	28.1	27.9
C-9	47.9	47.9	47.7	C-24	16.3	16.9	16.6
C-10	37.1	36.8	36.7	C-25	15.4	15.5	15.3
C-11	23.2	23.3	23.1	C-26	17.3	17.3	17.2
C-12	122.6	122.7	122.6	C-27	25.8	26.1	25.8
C-13	143.9	144.0	143.9	C-28	176.2	176.5	176.2
C-14	41.9	42.0	41.8	C-29	32.9	33.1	32.9
C-15	28.0	28.0	28.0	C-30	23.4	23.6	23.4
Glc-1	95.5	95.5	95.5	Glu-1	/	107.1	107.1
Glc-2	73.9	73.8	73.9	Glu-2	/	75.2	75.1
Glc-3	78.7	78.6	78.6	Glu-3	/	77.6	77.1
Glc-4	70.8	70.9	70.8	Glu-4	/	73.2	72.8
Glc-5	79.1	79.0	79.1	Glu-5	/	77.8	77.7
Glc-6	61.9	62.0	61.9	Glu-6	/	172.8	170.1
Bu-1	/	/	64.7	Bu-3	/	/	19.0
Bu-2	/	/	30.5	Bu-4	/	/	13.5

注:所测溶剂均为氘代吡啶。

的碳谱数据,并把他们当成模型化合物,通过取代基位移效应,可以有效帮助鉴定未知化合物结构。

4 生源途径教学方面的体会

中药有效成分一般指的是次生代谢产物,教学实践中,学生掌握次生代谢产物的生源合成途径有重要意义。首先,生源合成途径是初级代谢物和次级代谢物联系的纽带。其次,生源合成途径可以将天然产物复杂多变的化学结构串联起来,使之成为一个有机的整体。

大家熟悉的牛膝主要是指怀牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 和川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan

的干燥根,土牛膝来源广泛而复杂,包括苋科植物粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L.、柳叶牛膝 *Achyranthes longifolia*(Makino) Makino、钝叶土牛膝 *Achyranthes aspera* var. *indica* 及牛膝野生种 *Achyranthes bidentata* Blume 等的干燥根及根茎^[9],课题组主要研究的是粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L.。怀牛膝、粗毛牛膝、柳叶牛膝、野生牛膝等来源于苋科牛膝属植物,故其中应该含有相同成分,经过课题研究及文献调研分析表明,苋科牛膝属植物主要成分为三萜皂苷类化合物及甾酮类化合物,其主要共有甾酮类化学成分见表 2^[11]。《中华人民共和国药典》还收录了另一种川牛膝,为苋科杯苋属川牛膝 *Cyathula offici-*

nalis Kuan 的干燥根,怀牛膝与川牛膝质量控制标志物分别为 β -蜕皮甾酮与杯苋甾酮^[12],两者功效大致相同,但怀牛膝偏于补肝肾、强筋骨,而川牛膝偏于活血化瘀。川牛膝中甾酮类化合物结构与牛膝存在明显差异,如表3所示。

对比表2与表3可见,怀牛膝和川牛膝甾酮类化合物结构中有相同点,如A/B环均为顺式稠合、B/C、C/D环均为反式稠合、B环上有 α,β 不饱和酮。两种

表2 苋科牛膝属植物主要甾酮类成分

名称	结构	CAS号
蜕皮甾酮		5289-74-7
红苋甾酮		19466-41-2
水龙骨甾酮 B		18069-14-2
牛膝甾酮 A		864753-99-1
旌节花甾酮 A		30655-78-8
罗汉松甾酮 B		22612-27-7
漏芦甾酮 B		698975-64-3

表3 苋科杯苋属主要甾酮类成分

名称	结构	CAS号
杯苋甾酮		17086-76-9
异杯苋甾酮		54082-42-7
前杯苋甾酮		27335-85-9
森告甾酮		22799-11-7
头花杯苋甾酮		20835-65-8
28-表-杯苋甾酮		849206-13-9

牛膝亦存在显著差异,如怀牛膝等在C-17上的取代基大多是链状结构,而川牛膝的取代基则多含内酯环状结构。由此可见,怀牛膝与川牛膝虽同为苋科植物,但其属种的不同,次生代谢路径不一致,造成了其甾酮类化合物中结构的差异。甾酮类化合物是怀牛膝和川牛膝的主要活性物质之一,因此,两者的功效差异可能与上述的结构差异有关。

5 讨论

教而不研则浅,研而不教则空。科研是促进教师专业化发展的有效途径,教学则是对教师知识的传

承与发展,因此科研与教学两者密切相关。在中药化学的教学过程中,可以将自身的科研体会融入到日常教学当中,不仅能提高学生对课程学习的兴趣,同时教师也能借教学促进自身的专业成长,在教与学的过程中不断提高学术水平。近年来,不少高校对中药化学实验课程的教学进行了改革方式的探索,以期提高中药学专业学生综合素质与中药化学教学质量^[13-16]。

结构鉴定历来是中药化学教学的重点和难点,同时也是学生能否学好中药化学的关键环节。中药分子的结构鉴定技术主要包括紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振光谱、质谱和 X-ray 晶体衍射等。核磁共振碳谱中,不论是简单的有机小分子,还是复杂的中药分子,基于化学位移比较策略是鉴定平面结构、相对构型或者结构片段的重要手段,通过与文献报道的结构或者结构片段进行化学位移比较,若核磁数据相同,未知化合物或者其中的结构片段则与比较对象具有相同的结构。以本文所讨论的土牛膝中竹节参皂苷 I、竹节参皂苷 IV_a 和竹节参皂苷 IV_a 丁酯 3 种皂苷类的化学结构和碳谱数据两两比较分析为例,与类似结构碳谱数据比较进行未知化合物的结构鉴定是十分重要的一种手段,值得今后在教学和科研工作中广泛推广。

综上,本课题组结合多年来在中药化学方面实践的内容,对中药化学中成分提取、化合物分离以及结构鉴定等知识进行了心得体会的交流,希望利用从实践中探索出来的经验加深学生对中药化学的理解,提升中药学专业学生的综合素质。

参考文献

- [1] 李医明.从“中药化学”到“化学中药”:对中药化学学科发展的一点臆想[J].上海中医药大学学报,2018,32(4):1-3.
- [2] 曾克武,姜勇,王晶,等.中药化学生物学:“中药化学”与“生物学”交叉形成的新兴学科[J].中国中药杂志,2019,44(5):849-860.
- [3] 朱利明.有关相似相溶规律的讨论[J].大学化学,2003,18(1):45-44.
- [4] 许文林,黄一波,钱俊红,等.结晶法分离精制混合植物甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇[J].过程工程学报,2003,28(1):73-79.
- [5] 袁华,尹传奇,陈云峰.谈谈有机化学实验中的重结晶[J].实验室科学,2012,15(3):65-66.
- [6] 谭龙泉,张思明,欧庆瑜.薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用[J].分析化学,1996,25(12):1448-1451.
- [7] 田毅峰,李先国,沙春洁,等. C₁₈ 反相硅胶键合相的制备与性能评价[J].化学试剂,2007,29(1):12-14.
- [8] 樊培,陆云阳,刘杨,等.巴山重楼的皂苷类化学成分研究[J].中南药学,2021,19(5):794-800.
- [9] 邢倩倩,傅青,金郁,等.亲水/反相二维色谱法制备桔梗中的三萜皂苷[J].色谱,2014,32(7):767-772.
- [10] 何显玲.牛膝与川牛膝及土牛膝鉴别应用[J].实用中医药杂志,2013,29(2):136-137.
- [11] 罗懿钊,欧阳文,唐代凤,等.牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2020,22(12):2122-2136.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2020:39,74.
- [13] 欧阳文,王玉凤,韩越,等.中药化学实验教学的薄弱环节与对策:以湖南中医药大学为例[J].中医药管理杂志,2021,29(22):20-22.
- [14] 曹瑞,冯改利,宋小妹,等.中药化学实验教学改革初探[J].陕西中医药大学学报,2016,39(1):134-136.
- [15] 孙彦君,陈辉,张艳丽,等.中药化学实验教学改革方法[J].中医药管理杂志,2021,29(21):12-14.
- [16] 魏娜,李晓亮,王宁,等.中药化学实验课程教学改革探索[J].创新创业理论研究与实践,2020,3(4):38-39.

(本文编辑 苏维)