

栽培滇龙胆的化学成分研究*

朱卫萍¹, 赵磊¹, 张国华¹, 饶高雄^{1,2,Δ}

(1. 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500; 2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南昆明 650231)

[摘要]目的: 研究栽培滇龙胆 (*Gentiana rigescens* Franch.) 的化学成分, 比较栽培品和野生品化学成分的异同, 评价栽培滇龙胆药材品质。方法: 用色谱法分离化学成分, 根据波谱分析鉴定化学结构; 用薄层色谱 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 进行化学成分的比较分析。结果: 从栽培滇龙胆药材中分离鉴定了 19 个成分; 栽培品的 TLC 及 HPLC 谱图和野生品一致, 龙胆苦苷的含量分别为 4.31% (栽培品) 和 4.71% (野生品)。结论: 首次研究了栽培滇龙胆的化学成分, 并明确其所含化学成分类型、主要有效成分和野生滇龙胆一致; 滇龙胆栽培品和野生品中龙胆苦苷含量相当且均高于法定标准; 滇龙胆人工栽培是成功的, 应大力发展规模种植。

[关键词] 滇龙胆; 栽培; 化学成分; 含量测定; 品质评价

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2010)05—0008—06

滇龙胆是云南道地药材, 来源于龙胆科植物坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. 的根及根茎, 在药材行业以品相好, 有效成分含量高著称^[1-3]。随着市场需求增加, 其价格逐步上扬而导致掠夺性的无序采挖, 野生滇龙胆资源逐渐枯竭, 供求矛盾日益突出, 在此情况下, 滇龙胆人工种植产业逐步发展, 目前的部分药材已由人工种植供给。

栽培品和野生品是否一致, 除了传统的生药性状及组织结构比较外, 用化学成分比较的方法来探讨、评价栽培药材质量也是一个重要方面。为此, 我们系统研究了栽培滇龙胆的化学成分, 并和当地野生品进行比较, 以期对栽培滇龙胆的质量评价提供化学基础, 也为逐步实行 GAP 规范种植的相关栽培技术的科学性和可行性提供科学依据。

1 仪器、试剂与材料

熔点用 Yanaco 显微熔点仪测定; IR 用岛津 IR P-21 型红外光谱仪测定, KBr 压片; EI-MS 用 Finnigan MAT-95 质谱仪测定; NMR 用 Bruker AM-400 或 DRX-500 核磁共振波谱仪测定, TMS 为内标; HPLC 分析用岛津 LC-10AvP 液相色谱仪, N2000 色谱工作站。

柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶 G 板为青岛海洋化工厂产品; 树脂 MCI Gel CHP-20P 为日本三棱化工产品; 烷基键合硅胶 RP-18 为日本富士硅化工产品; 葡聚糖凝胶 LH-20 为 Pharmacia 公司产品; 提取分离用溶剂为普通工业级或化学纯溶剂。

栽培滇龙胆药材为云南省临沧地区云县滇龙胆种植基地产品 (2008 年 11 月, 共 3 个采集点), 野生滇龙胆采于种植基地附近区域的荒坡 (2008 年 10 月, 共 3 个采集点), 经云南省农业科学院药用植物研究所金航副研究员鉴定为龙胆科植物坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. 的根及根茎, 凭证标本保存在云南省农业科学院药用植物研究所标本室。

2 提取与分离

栽培滇龙胆药材 3kg 粉碎后用乙醇回流提取 3 次, 每次 2h, 合并提取液减压回收溶剂得醇浸膏 610g。浸膏混悬于水中依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取, 萃取液分别减压回收溶剂得到乙酸乙酯部分 90g (Fr-A)、正丁醇部分 228g (Fr-B)。

乙酸乙酯部分 (Fr-A) 溶于甲醇, 上 MCI Gel CHP-20P 柱脱去叶绿素, 甲醇洗脱部分浓缩

* 基金项目: 云南省发改委产业关键技术开发专项“滇龙胆的人工驯化及规范化种植关键技术研究及示范”。

收稿日期: 2010-04-20 修回日期: 2010-07-22

作者简介: 朱卫萍 (1984~), 女, 云南镇源人, 云南中医学院硕士研究生, 主要从事中药化学成分分析研究工作。

Δ 通讯作者: 饶高雄, Tel: 0871-5919558; E-mail: rao13987124569@qq.com

后经硅胶柱色谱, 以环己烷-乙酸乙酯 (50:1 ~ 50:50) 系统梯度洗脱, 各流份经 TLC 检查后合并为 7 个主要流份段。根据各组份段具体情况, 再反复用硅胶柱色谱 (环己烷-乙酸乙酯, 环己烷-氯仿, 氯仿-丙酮洗脱)、Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇-氯仿, 或丙酮洗脱) 分离纯化, 并辅以重结晶等常规方法, 得到化合物 6 (0.14g), 8 (0.65g), 9 (0.49g), 10 (2.12g), 11 (0.56g), 12 (0.24g), 13 (9.1g), 14 (0.83g), 15 (3.34g), 16 (3.74g), 19 (4.1g)。

正丁醇部分 (Fr-B) 用硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (10:1 ~ 10:15) 系统梯度洗脱, 各流份经 TLC 检查后合并为 5 个主要流份段。各流分段再反复用硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇-水洗脱)、RP-18 柱色谱 (水-甲醇洗脱)、Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 分离纯化, 得到化合物 1 (40.8g)、2 (3.8g)、3 (0.82g)、4 (0.76g)、5 (0.21g)、7 (89mg)、17 (0.93g)、18 (97mg)。

3 结构鉴定

3.1 化学结构

分离得到的 19 个化合物, 根据理化性质和光谱分析, 部分化合物还与标准品 TLC 对照, 分别鉴定为龙胆苦苷 (Gentiopicroside, 1), 马钱酸 (Loganic acid, 2), 獐牙菜苦苷 (Swertiamarin, 3), 獐牙菜苷 (Sweroside, 4), 獐牙菜苷-2'-(2'', 3''-二羟基苯甲酸) [Sweroside-2'-(2'', 3''-dihydroxy-benzoyl), 5], 丁香脂酚 (Liriodendrin, 6), 4-O- β -D-葡萄糖基-丁香酸 (Glicosyringic acid, 7), 熊果酸 (Ursolic acid, 8), α -香树脂醇 (α -Amyrin, 9), α -香树脂醇棕榈酸酯 (α -Amyrin palmitate, 10), 齐墩果酸 (Oleanolic acid, 11), β -香树脂醇 (β -Amyrin, 12), β -香树脂醇棕榈酸酯 (β -Amyrin palmitate, 13), 羽扇豆醇 (Lupeol, 14), 羽扇豆醇棕榈酸酯 (Lupeol palmitate, 15), β -谷甾醇 (β -Sitosterol, 16), 胡萝卜苷 (Daucosterol, 17), 龙胆二糖 (β -Gentiobiose, 18), 软脂酸 (Palmitic acid, 19)。(图 1)

3.2 光谱数据

化合物 1: 白色粉末 (甲醇), mp178 ~ 180 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3560、3492、3300、1712、1612、1461、1410、1320、1267、1113、

1080、1032、1005。和龙胆苦苷 (Gentiopicroside) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为龙胆苦苷。

化合物 2: 微黄色粉末 (甲醇), mp165 ~ 166 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3426、1694、1634、1553、1515、1462、1274、1185、1078。和马钱酸对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为马钱酸 (Loganic acid)。

化合物 3: 白色粉末 (甲醇), mp103 ~ 104 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3420、2936、1701、1695、1618、1476、1247、1158。其 NMR 数据与文献^[5]报道一致, 鉴定为獐牙菜苦苷 (Swertiamarin)。

化合物 4: 白色粉末 (甲醇), mp113 ~ 115 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3418、2930、1692、1610、1400、1280、1205、1075。其 NMR 数据与文献^[6]报道一致, 鉴定为獐牙菜苷 (Sweroside)。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇), mp158 ~ 160 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2941、1720、1702、1698、1621、1480、1270、1160。其 NMR 数据与文献^[7]报道一致, 鉴定为獐牙菜苷-2'-(2'', 3''-二羟基苯甲酸) [Sweroside-2'-(2'', 3''-dihydroxy-benzoyl)]。

化合物 6: 白色粉末 (甲醇), mp173 ~ 174 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3350、1600、1510、1465、1102、1080。其 NMR 数据与文献^[8]报道一致, 鉴定为丁香脂酚 (Liriodendrin)。

化合物 7: 白色粉末 (甲醇), mp181 ~ 183 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3470、1700、1665、1478、1180。其 NMR 数据与文献^[9]报道一致, 鉴定为 4-O- β -D-葡萄糖基-丁香酸 (Glicosyringic acid)。

化合物 8: 白色针晶 (乙醇), mp286 ~ 288 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3430、1710、1552、1453、1383、1278、1035。与熊果酸 (Ursolic acid) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为熊果酸。

化合物 9: 白色粉末 (丙酮), mp170 ~ 172 $^{\circ}$ C。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2926、2851、1642、1460、1378、1180。与 α -香树脂醇 (α -Amyrin) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为 α -香树脂醇。

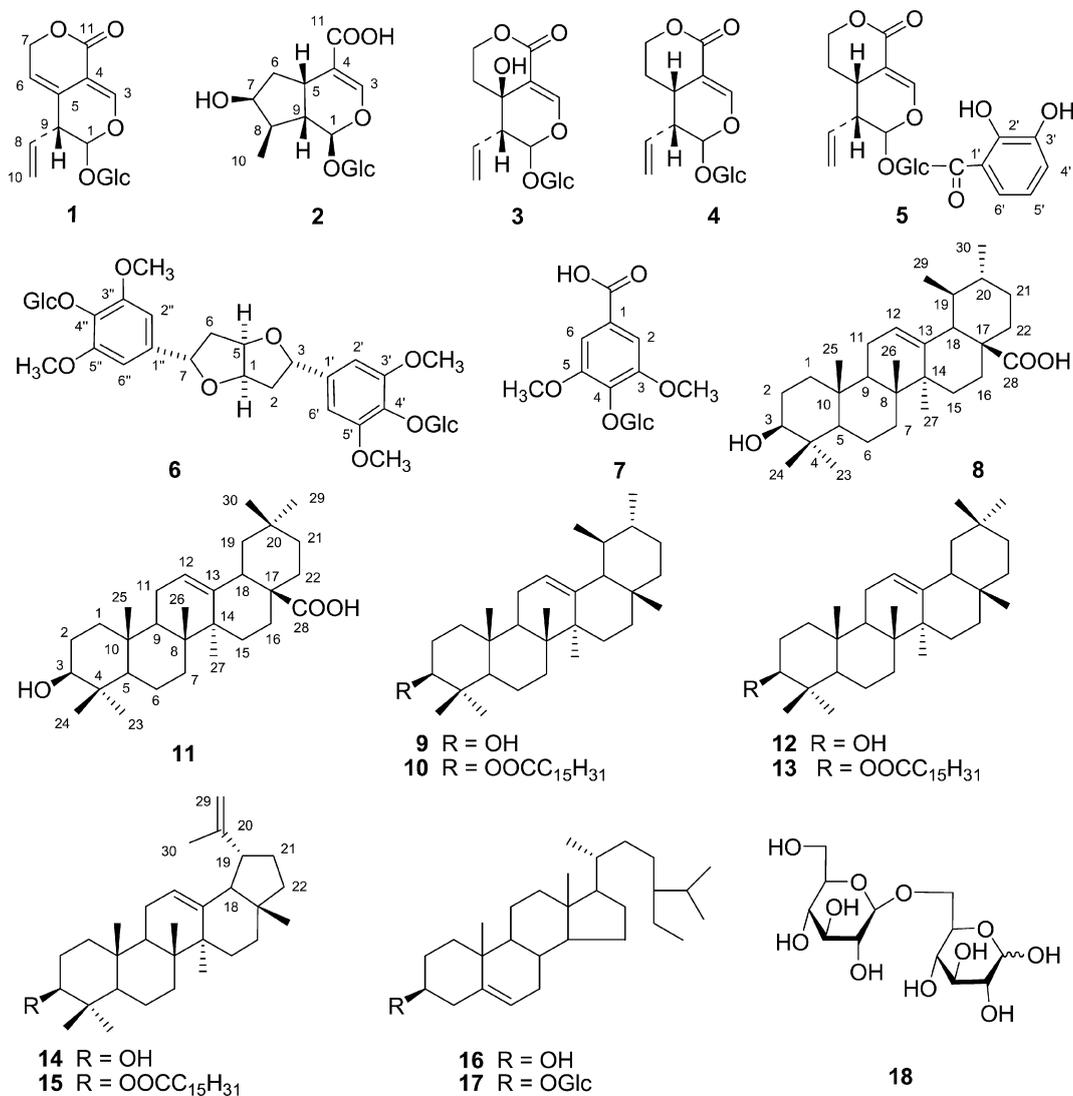


图 1 栽培滇龙胆药材主要化学成分的结构式

化合物 10: 白色脂状固体 (丙酮)。IR (KBr) V_{\max} : 2926、2856、1735、1640、1460、1382、1246、1180、965、722。ESI-MS m/z : 664 $[M]^+$ 、649、218 (100)、203、189、147、135、121、109、93、81、69。MS 和 NMR 数据与文献^[4]一致, 和 α -香树脂醇棕榈酸酯 (α -Amyrin palmitate) 对照品^[4]在不同系统中展开的 R_f 值和显色现象相同, 鉴定为 α -香树脂醇棕榈酸酯。

化合物 11: 白色针晶 (乙醇), $mp 306^\circ C$ 。IR (KBr) V_{\max} : 3430、1710、1482、1400、1380、1320、1307、1280、1250、1044、1010。与齐墩果酸 (Oleanolic acid) 对照品^[4]在不同系统中展开的 R_f 值和显色现象相同, 鉴定为齐墩果酸。

化合物 12: 白色针晶 (丙酮), $mp 142 \sim 143^\circ C$ 。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2930、2856、1640、1460、1385、1180、978。与 β -香树脂醇 (β -Amyrin) 对照品^[4]在不同系统中展开的 R_f 值和显色现象相同, 鉴定为 β -香树脂醇。

化合物 13: 白色脂状固体 (丙酮)。IR (KBr) V_{\max} : 2928、2855、1730、1644、1460、1376、1175、989、722。ESI-MS m/z : 664 $[M]^+$ 、649、218 (100)、207、203、189、175、147、135、121、107、95。MS 和 NMR 数据与文献^[4]一致, 与 β -香树脂醇棕榈酸酯 (β -Amyrin palmitate) 对照品^[4]在不同系统中展开的 R_f 值和显色现象相同, 鉴定为 β -香树脂醇棕榈酸酯。

化合物 14: 无色针晶 (丙酮), mp 204 ~ 206℃。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2936、1644、1460、1382、1040。和羽扇豆醇 (Lupeol) 对照品^[10]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为羽扇豆醇。

化合物 15: 白色脂状固体 (丙酮)。Mp 55 ~ 57℃。IR (KBr) V_{\max} : 2924、2850、1730、1340、1319、1298、1277、1235、1080。ESI - MS (m/z): 664 [M]⁺、409、392、255、218、207、190、189、135、121。其 NMR 数据与文献^[11]报道一致, 鉴定为羽扇豆醇棕榈酸酯 (Lupeol palmitate)。

化合物 16: 白色片状晶体 (甲醇), mp 137 ~ 138℃。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2935、2865、1646、1460、1375、1058。与 β -谷甾醇 (β -Sitosterol) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为 β -谷甾醇。

化合物 17: 白色粉末 (甲醇), mp 252 ~ 255℃。IR (KBr) V_{\max} : 3530 - 3260、2940、2866、1644、1463、1378、1106 - 1050。与胡萝卜苷 (Daucosterol) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为胡萝卜苷。

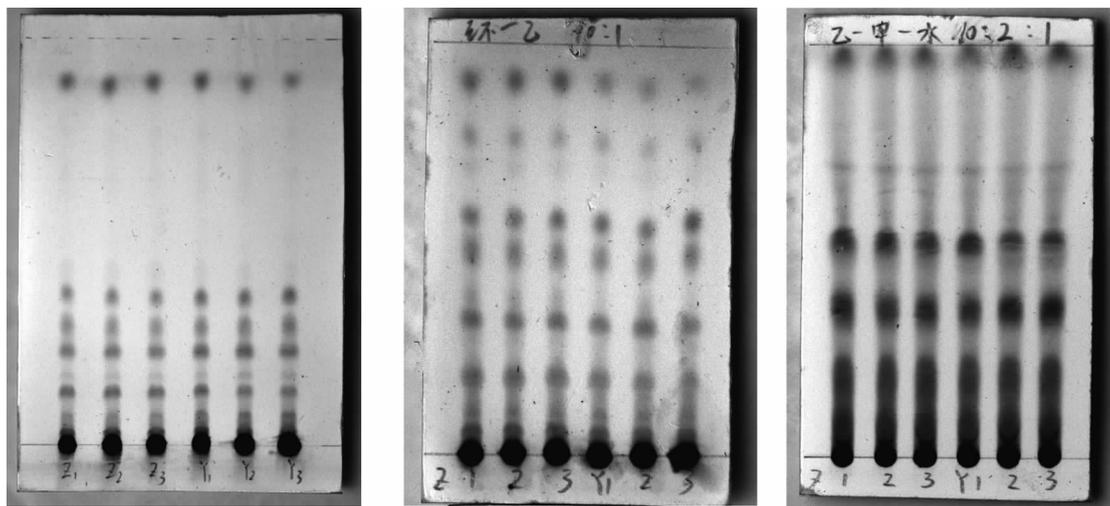
化合物 18: 白色颗粒晶体 (甲醇), mp 182 ~ 183℃。IR (KBr) V_{\max} : 3460 - 3270、2940、1644、1462、1380、1110 - 1052。其 NMR 数据和文献^[12]报道一致, 鉴定为龙胆二糖 (β -Gentiobiose)。

化合物 19: 白色粉末 (丙酮), mp 55 ~ 57℃。IR (KBr) V_{\max} : 3440、2929、2846、1709、1645、1463、1108、722。ESI - MS m/z : 256 [M]⁺、215、185、129、73、43 (100)。与软脂酸 (Palmitic acid) 对照品^[4]在不同系统中展开的 Rf 值和显色现象相同, 鉴定为软脂酸。

4 栽培滇龙胆和野生品的成分比较

4.1 薄层色谱 (TLC) 分析

参照《中国药典》龙胆^[1]的分析方法, 分别取野生 (3 个采集点) 和栽培的滇龙胆 (3 个采集点) 药材粉末各 1g, 加甲醇 10mL, 浸渍 4 ~ 5h, 滤过, 滤液浓缩至 2mL 作为供试品溶液。照薄层色谱法试验方法, 以不同展开系统进行对比 (图 2)。结果表明滇龙胆野生品、栽培品在不同条件下的薄层色谱均呈现基本一致的斑点。



[左图以环己烷-乙酸乙酯 (10:1) 展开, 中图以环己烷-乙酸乙酯 (4:1) 展开, 右图以乙酸乙酯-甲醇-水 (10:2:1) 展开; 各图中前 3 个斑点为栽培品, 后 3 个斑点为野生品]

图 2 野生和栽培滇龙胆药材的不同展开剂薄层色谱对比

4.2 主要成分龙胆苦苷的高效液相色谱 (HPLC) 分析

按照《中国药典》龙胆^[1]项下的 HPLC 分析方法比较滇龙胆野生品、栽培品在化学成分上的区

别, 并测定有效成分龙胆苦苷的含量 (图 3)。结果表明滇龙胆栽培品、野生品的 HPLC 图谱基本一致, 野生品、栽培品中龙胆苦苷含量分别为 4.71% 和 4.31% (表 1)。

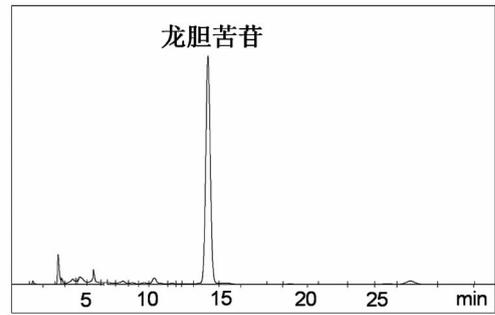
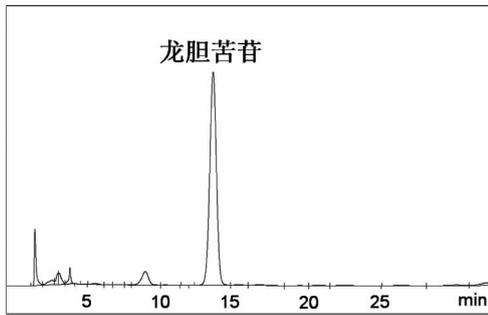


图3 野生滇龙胆(左图)栽培滇龙胆(右图)的HPLC图谱

表1 野生滇龙胆和人工种植滇龙胆中龙胆苦苷的含量测定(%)

样品类别	采集点 A	采集点 B	采集点 C	平均值
野生滇龙胆	4.54	4.88	4.72	4.71
栽培滇龙胆	4.15	4.44	4.33	4.31

5 结果讨论

首次对栽培滇龙胆进行化学成分研究,共分离鉴定了19个化合物,主要成分属于环烯醚萜苷和三萜类,与文献报道^[13-17]的野生滇龙胆比较,栽培品所含化学成分类型以及主要有效成分等均和野生品一致,栽培滇龙胆在化学成分方面与野生品没有本质区别。

滇龙胆药材栽培品和野生品在不同条件下的薄层色谱(TLC)呈现一致的斑点,HPLC图谱基本一致,有效成分龙胆苦苷的含量接近,化学成分比较的结果表明栽培品和野生品的化学成分基本一致,具有相似的药效物质基础。

《中国药典》规定龙胆^[1]药材含龙胆苦苷不得低于1%,测定结果表明滇龙胆野生品中龙胆苦苷含量为4.71%,栽培品为4.31%,栽培品含量稍低于野生品,但无论是野生还是栽培的滇龙胆药材,有效成分含量均大大高于《中国药典》规定。滇龙胆在我省分布广,适宜种植区域多,发展规模种植大有可为。

(致谢:研究样品的采集和鉴定得到金航副研究员的大力支持,特此致谢。)

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:64-65.

[2] 云南省药物研究所. 云南重要天然药物[M]. 昆明:云南科技出版社,2006:343-353.

[3] 李智敏,赵磊,白艳婷,等. 不同产地滇龙胆中龙胆苦苷的含量测定[J]. 云南中医学院学报,2008,31(6):10-12.

[4] 赵磊,李智敏,白艳婷,等. 滇龙胆地上部分的化学成分研究[J]. 云南中医学院学报,2009,32(2):27-31.

[5] 王世盛,徐青,肖红斌,等. 抱茎獐牙菜中的苷类成分[J]. 中草药,2004,38(5):847-849.

[6] 罗跃华,聂瑞麟. 狭叶獐牙菜中的两个环烯醚单萜苷[J]. 药学学报,1992,27(2):125-129.

[7] Tan Rong-Xiang, Wolfender J L, Ma Wei-Guang. Secoiridoides and antifungal aromatic acids from *Gentiana algida* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1):111-116.

[8] 王明安,王明奎,彭树林,等. 青檀树皮中的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(6):5-8.

[9] 秦文杰,王钢力,林瑞超. 短柱肖菝蕨化学成分的研究(II) [J]. 中草药,2007,38(10):1466-1468.

[10] 叶婕颖,张庆芝,饶高雄. 傣药芽鲁咪卖的化学成分研究[J]. 中草药,2009,40(6):850-852.

[11] 薛慧清,杨红澎,汪汉卿,等. 黄毛橐吾三萜类成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(3):272-275.

[12] 田军,吴凤镔,邱明华,等. 匙叶翼首花的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(1):35-37.

[13] 孙南君,夏春芳. 坚龙胆中化学成分的研究[J]. 中药通报,1984,9(1):33-34.

[14] 张建生,田子新,楼之岑,等. 九种龙胆中五种裂环环烯醚萜甙类苦味成分的高效液相色谱定量分析[J]. 药学学报,1991,26(11):864-870.

(下转第16页)

Study on Pharmacognosy for *Uncaria Yunnanensis*, a Endemic Medicinal Plant in Yunnan

QIU Bin¹, LI Yun², LI Xue - fang¹, ZHANG Xiao - nan¹, YOU Yan¹

(1. Yunnan Institute of Material Medica, Kunming Yunnan 650111;

2. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan, 650500, China)

[**ABSTRACT**] Objective: To constitute the research method about Yunnan endemic medica plant—*Uncaria yunnanensis* K. C. Hsia, which provides a document basis for exploitation. Methods: Combined traditional identification and modern scientific means to study phamacognosy character of *Uncaria yunanensis* K. C. Hsia for its origin, micro - character and physicochemical properties. Result: The study gives determination of identification methods and key points about *Uncaria yunnanensis*. Conclusion: The study can be taken as the reference for identifying the species and laying down quality standard of the crude drug.

[**KEY WORDS**] endemic medicinal plant; *Uncaria yunnanensis*; study on the pharmacognosy

(上接第 12 页)

[15] 许敏, 王东, 张颖君, 等. 坚龙胆中的一个新裂环烯醚萜苷 [J]. 云南植物研究, 2006, 28 (6): 669 - 672.

[16] Xu M, Wang D, Zhang YJ, et aL. Dammarane Triterpenoids from the Roots of *Gentiana rigescens* [J]. J Nat

Prod. 2007, 70 (5): 880 - 883.

[17] 李文龙, 陈军辉, 殷月芬, 等. 龙胆药材中龙胆苦苷和马钱子苷含量的测定及其指纹图谱研究 [J]. 药学学报, 2007, 42 (5): 566 - 570.

(编辑: 岳胜难)

Chemical Constituents of Cultivated *Gentiana Rigescens* Franch. Based on Latent Endogenous Toxicity Theory

ZHU Wei - Ping¹, ZHAO Lei¹, ZHANG Guo - hua¹, RAO Gao - Xiong^{1, 2*}

(1. College of Pharmacy, Yunnan university of TCM, Kunming Yunnan 650500, China;

2. Institute of Medicinal Plant, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming Yunnan 650231, China)

[**ABSTRACT**] Objective: To study chemical constituents of cultivated *Gentiana rigescens* and to appraise the qualities of cultivated species by means of comparison on chemical substance with that of the wild species. Method: The chemical constituents were isolated by chromatography and their structures were identified by spectroscopic analysis. The comparison on chemical substance of cultivated and wild *Gentiana rigescens* was carried out with TLC and HPLC analysis. Results: Nineteen compounds, including main component gentiopicroside, were isolated and identified from the cultivated *Gentiana rigescens*. The chromatogram of TLC and HLPC analysis of cultivated *Gentiana rigescens* showed almost same spots or peaks as those of wild species. Their contents of gentiopicroside were 4.71% (wild species) and 4.32% (cultivated species), respectively. Conclusion: The chemical constituents of cultivated *Gentiana rigescens* was reported for the first time. The cultivated *Gentiana rigescens* was identical in chemical character with the wild species, and the contents of principal bioactive compound gentiopicroside in both of cultivated and wild species were more than the legal standard in China Pharmacopoeia. Planting of *Gentiana rigescens* was successful and this agricultural technology should be extended.

[**KEY WORDS**] *Gentiana rigescens* Franch. ; Planting; Chemical constituents; Qualities appraisalment