

威灵仙的化学成分研究*

赵 阳¹, 梁丽珍², 李厚金², 文诗雅², 蓝文健^{1,3}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

3. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006)

摘要: 威灵仙是一种重要的中药材。运用快速硅胶柱层析和制备型 HPLC 技术对威灵仙的乙酸乙酯提取物进行分离, 纯化得到 7 个化合物, 它们是松脂素 (Pinoresinol, **1**), Epipinoresinol (**2**), 罗汉松脂素 (Matairesinol, **3**), Salicifoliol (**4**), 3, 4, 5-三羟基苯甲酸 (**5**), 4-羟基-3, 5-二甲氧基-苯甲酸 (**6**), 异阿魏酸 (**7**), 化合物的结构通过 NMR 和 MS 的分析得到确定。运用分析型 HPLC 和 GC-MS 色谱分析方法, 可以在威灵仙药材提取物中快速、准确地鉴定该类化合物。化合物 **1**, **2**, **3**, **4** 是木脂素类化合物, 具有多种重要的生理活性, 潜在药用明显。

关键词: 威灵仙; 木脂素; 松脂素; 化学成分; 活性

中图分类号: 0629.5 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 03-0063-05

Chemical Constituents of *Clematis chinensis* Osbeck

ZHAO Yang¹, LIANG Lizhen², LI Houjin², WEN Shiyu², LAN Wenjian^{1,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Clematis chinensis* Osbeck is a popular medicinal plant. Seven known compounds, pinoresinol (**1**), epipinoresinol (**2**), matairesinol (**3**), salicifoliol (**4**), 3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid (**5**), 4-hydroxy-3, 5-dimethoxybenzoic acid (**6**), and 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid (**7**) were isolated from the ethyl acetate extract of *Clematis chinensis* Osbeck by using the flash silica gel column chromatography and preparative high performance liquid chromatography. Their structures were elucidated mainly on the basis of NMR and MS data. These compounds could be fast and accurately detected from the extract by using HPLC and GCMS analytical methods. Lignans **1**, **2**, **3**, **4** have various bioactivities, and the lignans from *Clematis chinensis* Osbeck should have the potential application in drug development.

Key words: *Clematis chinensis* Osbeck; lignan; pinoresinol; chemical constituents; bioactivity

威灵仙 (*Clematis chinensis* Osbeck), 属毛茛科植物。在临床治疗上, 它用于治疗痛风顽痹、肢体麻木、筋脉拘挛, 减弱风湿痹痛、诸骨鲠咽, 减少水肿、降血压和治疗外伤等。

有关威灵仙的化学成分, 近年来陆续有一些报

道, 但研究主要集中于威灵仙的大极性组分, 如: 1992 年 Song Chunqing 等分离到由 D-葡萄糖和 4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲酸组成的大环糖苷 clemochinensin^[1]。此外, 从威灵仙的根部提取物中分离得到一系列三萜甙^[2-6]。威灵仙中所发现的大多

* 收稿日期: 2012-03-23

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2010B030800002, 2010B030600011); 广东省中医药强省科研基金资助项目; 中山大学高校基本科研业务费专项基金资助项目 (111gpy09); 广东省大学生创新实验基金资助项目 (1055812021)

作者简介: 赵阳 (1987 年生), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 蓝文健; E-mail: lanwj@mail.sysu.edu.cn

数皂苷的苷元均为齐墩果酸, 其总皂苷具有抗肿瘤及抗炎镇痛的作用。

我们对威灵仙根茎乙酸乙酯提取物的化学成分进行了系统的研究, 分离鉴定了 7 个化合物: 松脂素 (Pinoresinol, **1**), Epipinoresinol (**2**), 罗汉松脂素 (Matairesinol, **3**), Salicifoliol (**4**), 3, 4, 5-三羟基苯甲酸 (**5**), 4-羟基-3, 5-二甲氧基-苯甲酸 (**6**), 异阿魏酸 (**7**), 化合物结构通过 NMR 和 MS 的分析得到确定。化合物 **1**, **2**, **3**, **4** 是木脂素类化合物, 它们是首次从威灵仙中发现, 具有多种重要的生理活性, 其潜在药用前景明显。

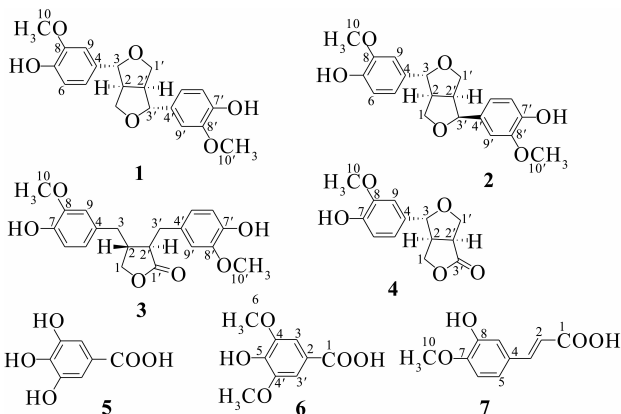


图 1 化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds

1, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**

1 实验部分

1.1 药材、试剂与仪器

威灵仙干燥根茎, 由广东罗浮山国药股份有限公司提供。

石油醚、乙酸乙酯、甲醇、乙醇, 市售分析纯; 乙腈, HPLC 级, 购于 Sigma 公司。

美国 Varian 公司 INOVA 500NB, Bruker 公司 AVANCE AV 400 MHz 核磁共振仪。Thermo DSQ EI 低分辨质谱仪, Thermo MAT95XP EI 高分辨质谱仪。美国 Finnigan 公司 TRACE DSQ 气相色谱-质谱联用仪。岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, Shim-pack PRC-ODS (250 mm × 20 mm) 制备型液相色谱柱, Inertsil® ODS-SP (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 分析型液相色谱柱。

1.2 化合物的提取与分离

取威灵仙干燥根茎 500 g, 碾碎。用 1 L $w = 50\%$ 的乙醇回流 1 h, 提取 3 次, 合并提取液。低温旋转蒸发除去乙醇, 残余水层用 500 mL 乙酸乙

酯提取 3 次, 合并乙酸乙酯提取液, 低温旋转蒸发至干得 32.2 g 样品。乙酸乙酯提取物经硅胶柱层析分离, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱, 收集石油醚-乙酸乙酯 3:1 (V/V) 至石油醚-乙酸乙酯 1:2 (V/V) 的组分, 该收集组分经反相 C18 制备型高效液相色谱分离, 以乙腈-水 70:30 (V/V) 为流动相, 分离、纯化得到化合物 **1**、**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**, 分别为 416、271、46、39、42、55、121 mg。

1.3 高效液相色谱分析实验条件

样品溶于乙腈, 进样量 5 μL。以乙腈-水为溶剂, 采用梯度洗脱方法。即: 0 ~ 10 min, $\varphi = 30\%$ 的乙腈, 然后线性梯度增加乙腈含量, 至 40 min 乙腈的体积分数达 100%, 继续恒流至 65 min。紫外检测波长为 254 nm。

1.4 气相色谱-质谱分析实验条件

DB-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。程序升温: 初始温度 80 °C, 保持 3 min, 以 2 °C/min 升至 180 °C, 保持 4 min, 再以 8 °C/min 升到 200 °C, 保持 4 min, 以 10 °C/min 升温至 270 °C, 保持 30 min。载气为氮气, 流速为 1 mL/min, 分流比为 30:1, 进样量 1.0 μL。质谱条件: 离子源为 EI 源, 70 eV, 离子源、连接口温度均为 230 °C。扫描质量范围为 50 ~ 650 amu, 全扫描方式。

1.5 化合物波谱数据

化合物 **1**, **2**, **3**, **4** 的 ¹H 和 ¹³C 的数据见表 1。

化合物 **1** 和 **2**, LR EI MS m/z 358, 343, 327, 312, 259, 234, 221, 205, 189, 180, 163, 151, 137, 131, 124, 117, 103, 91, 81, 65, 55。

化合物 **3**, LR EI MS m/z 358, 234, 221, 208, 194, 175, 164, 137, 131, 122, 94。

化合物 **4**, LR EI MS m/z 250, 235, 233, 219, 207, 198, 191, 175, 165, 151, 137, 123。

化合物 **5**, ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_c : 170.1 (C), 147.0 (2 × C), 138.5 (C), 122.7 (C), 109.6 (2 × CH)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H : 7.06 (s, 2H), 6.62 (brs, 3H)。

化合物 **6**, HREIMS: m/z 198.0522 (C₉H₁₀O₅, 理论值 198.0523)。LREIMS: m/z 198, 183, 168, 149, 137, 109, 97, 93, 81, 65。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_c : 171.1 (C), 146.6 (2 × C), 139.9 (C), 120.0 (C), 107.2 (2 × CH), 56.5 (CH₃)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H : 7.40 (s, 2H), 6.05 (brs, 1H), 3.97 (s, 6H)。

化合物 **7**, ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_c :

167.6 (C), 149.7 (C), 146.4 (C), 144.2 (CH), 126.9 (C), 121.1 (CH), 116.0 (CH), 113.8 (CH), 111.9 (CH), 55.7 (CH₃)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H: 9.27 (brs, 1H), 7.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.062 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.060 (dd, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.91 (brs, 1H), 6.23 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H)。

2 结果与讨论

威灵仙根茎的乙酸乙酯提取物经 HPLC 分析, 以 254 nm 为检测波长, 分析结果见图 2。由图可知该提取物中含有大量的分子中具有共轭体系结构的化合物。经硅胶柱层析和制备 HPLC 分离纯化得到化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, 它们在 HPLC 分析中的保留时间分别为 26.51, 28.66, 29.79, 14.62, 6.53, 7.71, 10.16 min。

化合物 **1**, EI MS 显示相对分子质量为 358。¹³C NMR 显示 10 个共振信号, 其中 3 个季碳 C, 5 个 CH, 1 个 CH₂, 1 个 CH₃, 提示分子结构对称, 分子式为 C₂₀H₂₂O₆。3 个季碳 (δ_C 132.5, 145.0, 146.5), 3 个 CH [δ_C 108.6 (δ_H 6.90, d, 1.5), 114.2 (δ_H 6.87, d, 8.1), 118.7 (δ_H 6.81, dd, 8.1, 1.5)] 构成一个 1, 3, 4-三取代苯环。CH₃O- [δ_C 55.8 (δ_H 3.85, s)] 与苯环相连。连氧的 CH [δ_C 85.7 (δ_H 4.76, d, 4.5)] 与苯环和另外 1 个 CH [δ_C 53.9 (δ_H 3.12, m)] 相连, 而后者又与另一连氧的 CH₂ [δ_C 71.5 (δ_H 4.26, dd, 9.0, 6.9; δ_H 3.89, dd, 9.0, 3.6)] 相连。δ_H 6.06 (brs) 为苯环上的羟基信号。根据 HMBC 的相关关系, 确定其结构为松脂素 (Pinoresinol, 又名 4, 4'-[(1*S*, 3*aR*, 4*S*, 6*aR*)-tetrahydro-1*H*, 3*H*-furo[3, 4-*c*]furan-1, 4-diyl] bis[2-methoxy-phenol])^[7]。

化合物 **2**, EI MS 显示相对分子质量也为 358。¹³C NMR 显示 20 个共振信号, 其中 6 个季碳 C, 10 个 CH, 2 个 CH₂, 2 个 CH₃, 分子式为 C₂₀H₂₂O₆。对¹H、¹³C、HMQC、以及 HMBC 的综合分析, 确定化合物 **2** 和 **1** 具有完全一致的官能团和结构片段的连接顺序, 它们仅仅是构型上存在差异。化合物 **2** 确定为 Epipinoresinol, 又名 4, 4'-[(1*R*, 3*aR*, 4*S*, 6*aR*)-tetrahydro-1*H*, 3*H*-furo[3, 4-*c*]furan-1, 4-diyl] bis[2-methoxy-phenol]^[8]。

化合物 **3**, EI MS 显示相对分子质量也为 358, 分子式为 C₂₀H₂₂O₆。与化合物 **1** 和 **2** 一样, 分子中含有 2 个 3-甲氧基-4-羟基取代苯结构单元。剩余 6 个碳包括 1 个羰基, 2 个 CH, 3 个 CH₂, 其中 1 个 CH 连氧。根据氢谱裂分、偶合常数、以及 HMBC 的相关关系分析, 确定 3 个 CH₂ 均和 CH 相连, 而 -OCH₂- 和羰基共同构成一个五元内酯环, 另外 2 个 CH₂ 则分别和苯环相连。由此, 确定化合物 **3** 的结构为罗汉松脂素 (Matairesinol)^[7]。

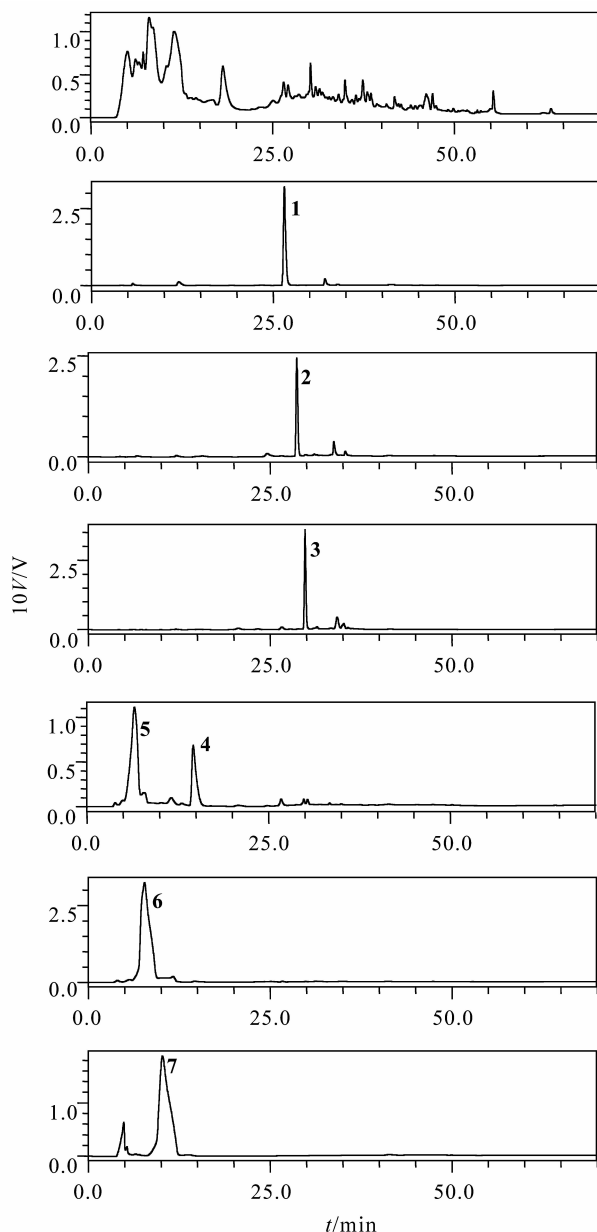


图2 威灵仙乙酸乙酯提取物和化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** 的高效液相分析图
Fig. 2 HPLC analysis of the EtOAc extract of *C. chinensis* and compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**

表 1 化合物 1, 2, 3, 4 的核磁共振数据

Table 1 NMR data of compounds 1, 2, 3, 4 (^1H , 500 MHz, and ^{13}C , 125 MHz, in CDCl_3 , J in Hz)

NO.	1		2		3		4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	71.5, CH_2	4.26(dd, 9.0, 6.9); 3.89(dd, 9.0, 3.6)	71.0, CH_2	4.12(dd, 9.5, 0.5); 3.85(dd, 9.5, 6.0)	71.3, CH_2	4.15(dd, 9.2, 7.2); 3.89(dd, 9.2, 2.0)	69.8, CH_2	4.50(dd, 9.6, 6.8); 4.33(dd, 9.6, 2.0); 3.12(ddd, 9.2, 7.2, 6.8, 2.0)
2	53.9, CH	3.12(m)	54.5, CH	2.91(qd, 7.5, 1.0)	41.0, CH	2.46(m)	48.2, CH	2, 7.2, 6.8, 2.0)
3	85.7, CH	4.76(d, 4.5)	87.7, CH	4.43(d, 7.0)	38.3, CH_2	2.61(overlap) 2.49(overlap)	86.1, CH	4.62(d, 7.2)
4	132.5, C		133.1, C		129.8, C		130.6, C	
5	118.7, CH	6.81(dd, 8.1, 1.5)	119.2, CH	6.84(dd, 8.0, 2.0)	122.1, CH	6.60(dd, 8.0, 2.0)	119.1, CH	6.81(ddd, 8.0, 2.0)
6	114.2, CH	6.87(d, 8.1)	114.2, CH	6.89(dd, 8.0)	114.1, CH	6.81(d, 8.0)	114.4, CH	6.90(d, 8.0)
7	145.0, C		145.3, C		146.6, C		145.8, C	
8	146.5, C		146.7, C		144.4, C		146.9, C	
9	108.6, CH	6.90(d, 1.5)	108.6, CH	6.91(d, 2.0)	111.0, CH	6.41(d, 2.0)	108.4, CH	6.88(d, 2.0)
10	55.8, CH_3	3.85(s)	56.0, CH_3	3.92(s)	55.7, CH_3	3.80(s)	56.0, CH_3	3.91(s)
1'	71.5, CH_2	4.26(dd, 9.0, 6.9); 3.89(dd, 9.0, 3.6)	69.7, CH_2	3.84(dd, 9.5, 6.0); 3.32(overlap)	178.7, C		67.0, CH_2	4.19(dd, 9.2, 4.0); 4.36(t, 9.2)
2'	53.9, CH	3.12(m)	50.2, CH	3.33(m)	46.6, CH	2.55(m)	46.0, CH	3.45(ddd, 9.2, 9.2, 4.0)
3'	85.7, CH	4.76(d, 4.5)	82.1, CH	4.86(d, 5.5)	34.6, CH_2	2.95(dd, 14.0, 5.2); 2.87(dd, 14.0, 6.8)	178.2, C	
4'	132.5, C		130.4, C		129.5, C			
5'	118.7, CH	6.81(dd, 8.1, 1.5)	118.5, CH	6.79(dd, 8.0, 2.0)	121.3, CH	6.51(dd, 8.0, 2.0)		
6'	114.2, CH	6.87(d, 8.1)	114.2, CH	6.89(d, 8.0)	114.4, CH	6.80(d, 8.0)		
7'	145.0, C		144.6, C		146.7, C			
8'	146.5, C		146.4, C		144.5, C			
9'	108.6, CH	6.90(d, 1.5)	108.4, CH	6.95(d, 2.0)	111.5, CH	6.62(d, 2.0)		
10'	55.8, CH_3	3.85(s)	55.9, CH_3	3.90(s)	55.8, CH_3	3.82(s)		
7-OH		6.06(brs)		5.61(s)		5.53(s)		
7'-OH		6.06(brs)		5.59(s)		5.55(s)		5.66(s)

化合物 4, EI MS 显示相对分子质量为 250, 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 其中 4 个季碳 C, 6 个 CH, 2 个 CH_2 , 1 个 CH_3 。分子中含有 1 个 3-甲氧基-4-羟基取代苯结构单元, 剩余 6 个碳包括 1 个羰基, 3 个 CH, 2 个 CH_2 。2 个 CH_2 (δ_{C} 69.8 和 67.0) 和 1 个 CH (δ_{C} 86.1) 连氧, 根据氢谱裂分、偶合常数可以确定 CH_2 均与 CH 相连, 而羰基 (δ_{C} 178.2) 根据化学位移可以确定其为内酯。由 HMQC、HMBC 的相关关系分析, 确定化合物 4 的结构为 Salicifoliol^[9]。

化合物 5, 6, 7 的结构根据其 ^1H 、 ^{13}C NMR, 以及 MS 数据分别确定为 3, 4, 5-三羟基苯甲酸, 4-羟基-3, 5-二甲氧基-苯甲酸, 异阿魏酸。

乙酸乙酯提取物样品用乙腈溶解, 进行气相色谱-质谱实验。气相色谱-质谱总离子流图 (图 3) 显示化合物 1, 2, 3, 4 的保留时间分别为 86.86, 85.64, 80.79, 62.79 min, 按峰面积归一化法计算各个化合物的百分含量分别为 2.39, 1.46, 0.56, 0.58。化合物 1, 2, 3, 4 的气质联

用质谱图 (图 4) 与其纯化化合物的 LREIMS 图基本一致。

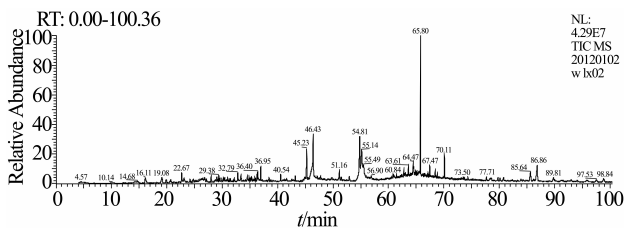
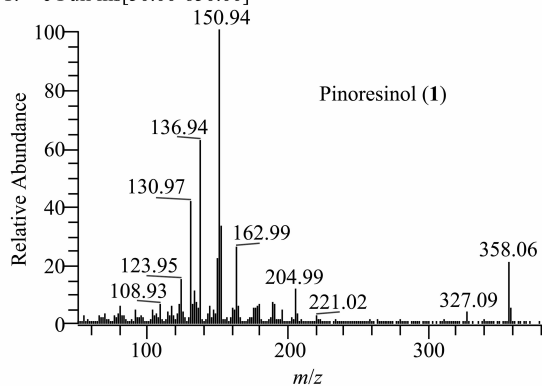


图 3 威灵仙乙酸乙酯提取物的气相色谱-质谱总离子流图
Fig. 3 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) total ion chromatogram of EtOAc extract of *Clematis chinensis* Osbeck

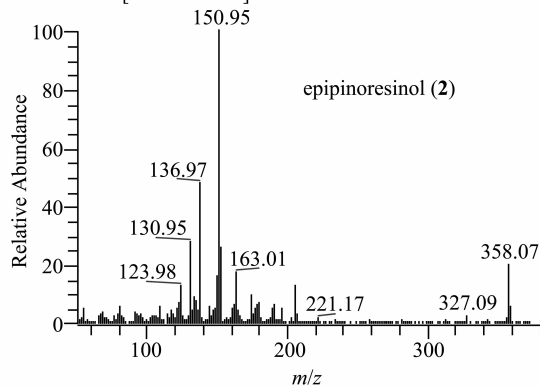
3 结论

本研究发现威灵仙中富含结构多样性的木脂素类化合物, 建立了木脂素的 HPLC 和 GC-MS 色谱分析方法, 该方法具有快速、稳定和精确的特点。木脂素是由苯丙素单元聚合而成, 它具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗虫、抗氧化、

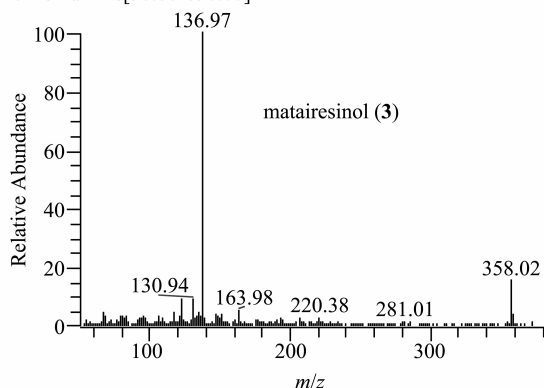
20120102w1x02 #14912 RT: 86.86 AV: 1 NL: 7.68E5
T: + c Full ms[50.00-650.00]



20120102w1x02 #14692 RT: 85.64 AV: 1 NL: 5.00E5
T: + c Full ms[50.00-650.00]



20120102w1x02 #13819 RT: 80.79 AV: 1 NL: 4.54E5
T: + c Full ms[50.00-650.00]



20120102w1x02 #10580 RT: 62.79 AV: 1 NL: 2.44E5
T: + c Full ms[50.00-650.00]

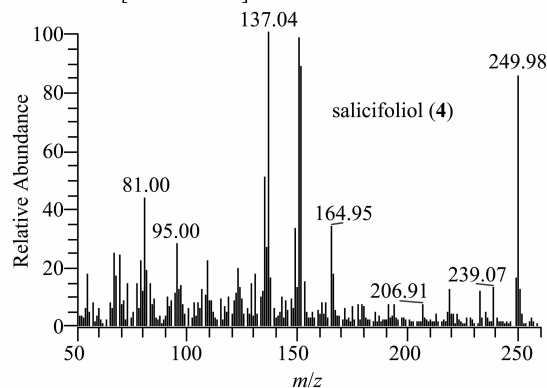


图 4 化合物 1, 2, 3, 4 的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of compounds 1, 2, 3, 4

保肝、抑制植物生长等^[10-12]。因此,以威灵仙为药用原材料,研究与开发创新药物,前景广阔。而以木脂素类化合物的组成和含量分析也将可作为威灵仙药材质量检测和所制成的中成药质量控制的方法。

参考文献:

- [1] SONG C Q, XU R S. Clemochinenoside A, a macrocyclic compound from *Clematis chinensis* [J]. Chinese Chemical Letters, 1992, 3(2): 119-120.
- [2] Fu Q, ZAN K, ZHAO M B, et al. Triterpene saponins from *Clematis chinensis* and their potential anti-inflammatory activity [J]. Journal of Natural Products, 2010, 73(7): 1234-1239.
- [3] LIU L F, MA X L, WANG Y X, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis chinensis* Osbeck [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2009, 11(5): 389-396.
- [4] MIMAKI Y, YOKOSUKA A, HAMANAKA M, et al. Triterpene saponins from the roots of *Clematis chinensis* [J]. J Natural Products, 2004, 67(9): 1511-1516.
- [5] SHAO B P, QIN G W, XU R S, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis chinensis* [J]. Phytochemistry, 1995, 38(6): 1473-1479.
- [6] KIZU H, TOMIMORI T. Studies on the constituents of *Clematis* species. I. On the saponins of the root of *Clema-*

tis chinensis Osbeck [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1979, 7(10): 2388-2293.

- [7] NISHIBE S, TSUKAMOTO H, HISADA S. Effects of O-methylation and O-glucosylation on carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts of matairesinol, (+)-pinoresinol and (+)-epipinoresinol [J]. Chem & Pharmaceutical Bulletin, 1984, 32(11): 653-657.
- [8] OKUYAMA E, SUZUMURA K, YAMAZAKI M. Pharmacologically active components of *Todopon Puok* (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1995, 43(12): 2200-2204.
- [9] GONZALEZ A G, ESTEVEZ-REYES R, MATO C. Salicifoliol, a new furoactone-type lignan from *Bupleurum salicifolium* [J]. Journal of Natural Products, 1989, 52(5): 1139-1142.
- [10] IONKOVA I. Anticancer lignans-from discovery to biotechnology [J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11(10): 843-856.
- [11] MITJANS M, VINARDELL M P. Biological activity and health benefits of lignans and lignins [J]. Trends in Comparative Biochem & Physiology, 2005, 11: 55-62.
- [12] LEE K H, XIAO Z Y. Lignans in treatment of cancer and other diseases [J]. Phytochemistry Reviews, 2004, 2003(3): 341-362.