

五倍子中酚性化学成分及其抗病毒活性

杨寒冰^{1,2}, 杨文强^{1,2}, 宋敏^{1,2}, 张健^{1,2}, 张晓琦^{1,2*}, 叶文才^{1,2}¹暨南大学药学院中药及天然药物研究所, 广州 510632;²暨南大学广东省中药药效物质基础与创新药物研究重点实验室, 广州 510632)

摘要 采用硅胶、ODS、Toyopearl HW-40(s)、制备型 HPLC 等多种色谱技术和波谱学方法, 结合物理化学性质, 从五倍子的 95% 乙醇提取物中分离并鉴定了 7 个化合物, 分别为 benzoic acid, 3, 4-dihydroxy-5-[(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl) oxy]-, 5-ethoxycarbonyl-2, 3-dihydroxyphenyl ester(**1**)、trigallic acid(**2**)、1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose(**3**)、莽草酸(**4**)、没食子酸(**5**)、没食子酸甲酯(**6**)、没食子酸乙酯(**7**)。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 为首次从该属植物中分离得到。对五倍子中分离得到的单体化合物进行了体外抗 HSV-1、RSV A strain、RSV Long strain 病毒活性测试, 化合物 **3** 表现出显著的抗病毒活性, 其 IC₅₀ 分别为 13.3, 3.3 和 3.3 mmol/L。

关键词 五倍子; 化学成分; 分离鉴定; 水解鞣质; 抗病毒活性

中图分类号 R284 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)05-0566-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160510

引用本文 杨寒冰, 杨文强, 宋敏, 等. 五倍子中酚性化学成分及其抗病毒活性[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(5): 566-569.

Cite this article as: YANG Hanbing, YANG Wenqiang, SONG Min, *et al.* Phenolic constituents of Galla Chinensis and their antiviral activities[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(5): 566-569.

Phenolic constituents of Galla Chinensis and their antiviral activities

YANG Hanbing^{1,2}, YANG Wenqiang^{1,2}, SONG Min^{1,2}, ZHANG Jian^{1,2}, ZHANG Xiaoqi^{1,2*}, YE Wencai^{1,2}¹Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632;²Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China

Abstract Seven compounds in the 95% ethanol extract of Galla Chinensis were isolated by silica gel, ODS, Toyopearl HW-40(s) and RP-HPLC. Their structures were identified on the basis of spectral data and physico-chemical properties as benzoic acid, 3, 4-dihydroxy-5-[(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl) oxy]-, 5-ethoxycarbonyl-2, 3-dihydroxyphenyl ester(**1**), trigallic acid(**2**), 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose(**3**), shikimic acid(**4**), gallic acid(**5**), methyl gallate(**6**) and ethyl gallate(**7**). Among them, compound **1** was a novel compound, and compound **2** was firstly isolated from the Galla Chinensis. The inhibition tests of the constituents showed that compound **3** exhibited *in vitro* antiviral activity against HSV-1 and RSV A strain, RSV Long strain with IC₅₀ values of 13.3, 3.3, 3.3 mmol/L, respectively.

Key words Galla Chinensis; chemical constituents; isolation and identification; hydrolysable tannins; antiviral activity

This work was supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2013A022100028, No. 2016B030301004)

五倍子(Galla Chinensis)系瘿绵蚜科(Pemphigidae)的蚜虫在其寄主漆树科(Anacardiaceae)

盐肤木属植物的盐肤木(*Rhus chinensis* Mill.)等树上的不同部位形成的虫瘿, 主要分布于四川、云南、

贵州、陕西等地^[1],主治肺虚久咳、盗汗、久泻久痢、脱肛等。现代药理研究表明,五倍子有收敛、抗菌、抗病毒、抑制突变等作用^[2]。为进一步探讨五倍子的抗病毒活性成分,本课题对五倍子化学成分进行了系统地研究,从中分离得到 7 个化合物,分别鉴定为 ethyl trigallate(**1**)、trigallic acid(**2**)、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose(**3**)、莽草酸(**4**)、没食子酸(**5**)、没食子酸甲酯(**6**)、没食子酸乙酯(**7**)。其中,化合物 **1** 为新化合物,化合物 **2** 为首次从该属植物中分离得到。此外,对化合物 **1**~**7** 进行了抗病毒活性筛选,发现化合物 **3** 对 HSV-1, RSV A strain 和 RSV Long strain 3 种病毒均有较强的抑制作用,其 IC₅₀ 分别为 13.3, 3.3 和 3.3 mmol/L,提示其可能具有广谱抗病毒作用。

1 材料

1.1 药材与试剂

实验药材于 2011 年 3 月购自广州市清平药材市场,由暨南大学药学院张英博士鉴定为五倍子(*Galla Chinensis*),标本(2011032103)保存于暨南大学中药及天然药物研究所。柱色谱用硅胶(硅胶 H, 200~300 目, 100~200 目, 青岛海洋化工厂);Toyopearl HW-40(S)(日本东曹株式会社);ODS 柱色谱材料(C₁₈, 10~40 μ m, Merck 公司);Sephadex LH-20(美国 Amersham Biosciences Swede 公司);甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

AV-400 型超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国 Finnigan 质谱公司);6210 LC/MSD TOF 型质谱仪、1200 液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);V-550 型紫外/可见光谱仪, FT/IR-480 Plus Fourier Transform 型红外光谱仪(KBr 压片)(日本 Jasco 公司);X-5 型显微熔点测定仪(未校正)(北京泰克仪器有限公司);Varian prostar 制备型高效液相色谱(美国瓦里安技术中国有限公司);分析色谱柱 Waters 5C₁₈-MS-II(4.6 mm \times 250 mm),制备色谱柱 Waters 5C₁₈-MS-II(20 mm \times 250 mm)(美国 Waters 公司)。

1.3 细胞株

单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)、呼吸道合胞体病毒(RSV) Long 株及 A 株、柯萨奇 B3(Cox B3) 于由

武汉大学医学病毒学研究所提供;非洲绿猴肾细胞(Vero)、人喉鳞癌细胞(HEp-2)、人宫颈癌细胞(HeLa)购于美国 ATCC 细胞库。

2 提取与分离

取药材 5 kg 粉碎,用 95% 乙醇(8L)超声提取 5 次,每次 1 h,过滤后合并滤液,减压浓缩至无醇味,得总浸膏 3.8 kg。总浸膏加水混悬后,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取。回收溶剂后得到石油醚萃取物 128 g,乙酸乙酯萃取物 3.2 kg,正丁醇萃取物 152 g。取乙酸乙酯浸膏 250 g 进行硅胶柱色谱,用氯仿-甲醇(9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 3:7)梯度洗脱,分别得到 5 个馏分(Fr. 1~Fr. 5)。Fr. 1 经硅胶柱色谱以环己烷-丙酮梯度洗脱后,重结晶得化合物 **7**(4.7 g);Fr. 2 运用制备型高效液相色谱(甲醇-水, 70:30)得化合物 **5**(27 mg), **6**(43 mg);Fr. 3 利用 ODS 柱色谱后经高效液相色谱(甲醇-水, 65:35)制备得化合物 **1**(5 mg), **2**(19 mg);Fr. 4 利用硅胶柱色谱(氯仿-甲醇梯度洗脱), Toyopearl HW-40(S)(甲醇-水梯度洗脱), 后经制备型高效液相色谱(甲醇-水, 47:53)分离纯化得化合物 **3**(62 mg), **4**(92 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末(甲醇), mp: 224~230 $^{\circ}$ C, 三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。UV 光谱在 217 和 278 nm 有最大吸收峰;IR 光谱中提示化合物有羟基(3 353 cm⁻¹)、羰基(1 735 cm⁻¹)和苯环(1 607, 1 531 cm⁻¹)等官能团;HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 503.082 5 [M+H]⁺(Calcd. for C₂₃H₁₉O₁₃, 503.082 5), 可确定该化合物的分子式为 C₂₃H₁₈O₁₃, 不饱和度为 15。在 ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) 中, 高场区显示有 1 组连氧乙基质子信号 [δ_{H} 1.35(3H, t, J =7.1 Hz), 4.30(2H, q, J =7.1 Hz)];低场区显示有 6 个芳香质子信号 [δ_{H} 7.40(1H, d, J =2.0 Hz), 7.26(1H, d, J =2.0 Hz), 7.24(1H, s), 7.23(2H, s), 7.11(1H, s)]。¹³C NMR 和 DEPT-135(100 MHz CD₃OD) 谱给出 23 个碳信号, 分别为 3 个羰基碳信号 [δ_{C} 168.0, 167.9, 166.7], 18 个芳香碳信号(表 1), 一个连氧亚甲基碳信号 [δ_{C} 62.1] 和一个甲基碳信号 [δ_{C} 14.7]。结合以上信息可推测该化合物为 3 个没食子酸形成的酯。通过分析 HSQC 和 HMBC 谱提供的信息, 对化合物 **1** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据进行了全归属。发现化合物 **1** 的碳谱数据与化合物 **2** 相似, 不同之处在于其相比化合物 **2** 多了一组与氧相连的乙基碳信号 [δ_{C} 62.1(C-8), δ_{C} 14.7(C-9)]。在 HMBC 中, δ_{H} 4.30(H-

8)与 δ_c 168.0(C-7)有远程相关,提示其为化合物**2**的C-7位酯基取代衍生物。因此鉴定化合物**1**为一个新化合物,

命名为 benzoic acid, 3, 4-dihydroxy-5-[(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl) oxy]-,5-ethoxycarbonyl-2,3-dihydroxyphenyl ester。

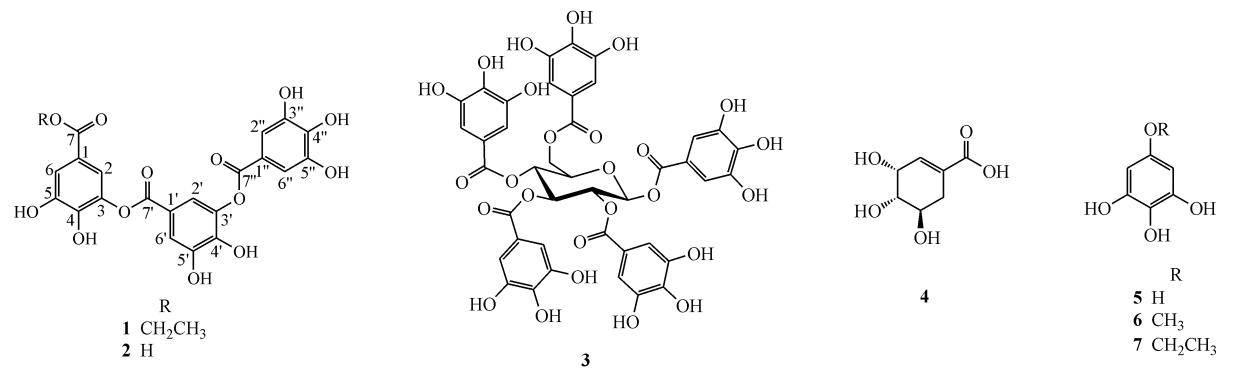


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-7

Table 1 NMR data of compound 1(CD₃OD)

Position	H ^{a)}	C ^{b)}	HMBC
1	—	129.4	
2	7.24(1H,s)	109.9	4,6,7
3	—	147.7	
4	—	133.0	
5	—	151.8	
6	7.11(1H,s)	111.1	2,4
7	—	168.0	
8	4.30(2H,q, <i>J</i> =7.1 Hz)	62.1	7,9
9	1.35(3H,t, <i>J</i> =7.1 Hz)	14.7	8
1'	—	122.0	
2'	7.40(1H,d, <i>J</i> =2.0 Hz)	114.9	4',6',7'
3'	—	140.3	
4'	—	144.4	
5'	—	146.6	
6'	7.26(1H,d, <i>J</i> =2.0 Hz)	117.4	4',7'
7'	—	167.9	
1''	—	120.7	
2''	7.23(1H,s)	110.0	4'',6'',7''
3''	—	146.7	
4''	—	140.6	
5''	—	146.7	
6''	7.23(1H,s)	110.0	2'',7''
7''	—	166.7	

^{a)} Measured at 400 MHz;^{b)} Measured at 100 MHz

化合物**2** 白色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。¹H NMR(400 MHz,CD₃OD) δ :7.41(1H,d,*J*=2.0 Hz,H-2'),7.26(1H,d,*J*=2.0 Hz,H-6'),7.24(1H,s,H-2),7.23(1H,s,H-2''),7.23(1H,s,H-6''),7.11(1H,s,H-6)。¹³C NMR(100 MHz CD₃OD) δ :169.6(C-7),166.7(C-7',7''),151.8(C-5),147.7(C-3),146.8(C-3'',C-5''),146.7(C-5'),144.3(C-4'),140.6(C-4''),140.3(C-3'),132.1(C-4),122.3(C-1'),120.7(C-1''),117.6(C-6'),116.6(C-1),115.2(C-2'),111.1(C-6),110.2(C-2),111.0(C-2'',C-

6'')。以上数据与文献[3]报道一致,故鉴定化合物**2**为 trigallic acid。

化合物**3** 白色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。正离子 ESI-MS 给出 *m/z* 963.1 [M+Na]⁺。¹H NMR(400 MHz,CD₃OD) δ :7.11,7.05,6.98,6.95,6.90(each 2H,s,galloyl H),6.23(1H,d,*J*=8.6 Hz,glc H-1),5.90(1H,t,*J*=9.6 Hz,glc H-3),5.60(2H,q,*J*=9.6 Hz,glc H-2,H-4),4.52(1H,d,*J*=10.4 Hz,glc H-6b),4.36(2H,m,glc H-6a,H-5)。¹³C NMR(100 MHz,CD₃OD) δ :167.9,167.3,167.0,166.9,166.2(-COO-),146.5,146.4,146.4,146.3,146.3(galloyl C-3,C-5),140.7,140.4,140.3,140.1,139.9(galloyl C-4),121.1,120.4,120.3,120.2,119.7(galloyl C-1),110.7,110.5,110.4,110.4,110.4(galloyl C-2,C-6);93.8(glc C-1),74.4(glc C-5),74.1(glc C-3),72.2(glc C-2),69.8(glc C-4),63.1(glc C-6)。以上数据与文献[4]报道的一致,故鉴定化合物**3**为 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose。

化合物**4** 淡黄色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。¹H NMR(400 MHz,CD₃OD) δ :6.79(1H,m,H-2),4.37(1H,m,H-3),3.98(1H,m,H-4),3.67(1H,m,H-5),2.71(1H,dd,*J*=18.2,4.9 Hz,H-6a),2.20(1H,dd,*J*=18.2,5.8 Hz,H-6b)。¹³C NMR(100 MHz,CD₃OD) δ :170.7(C-7),138.6(C-2),131.3(C-1),73.0(C-3),68.6(C-4),67.5(C-5),32.0(C-6)。以上数据与文献[5]报道的一致,故鉴定化合物**4**为莽草酸(shikimic acid)。

化合物**5** 白色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。负离子 ESI-MS 给出 *m/z* 169.1 [M-H]⁻。¹H NMR(400 MHz,CD₃OD) δ :7.05(2H,s,H-2,H-6)。¹³C NMR(100 MHz,CD₃OD) δ :170.6(-COOH),146.4(C-3,C-5),139.6(C-4),122.0(C-1),110.4(C-2,C-6)。以上数据与文献[6]报道一致,故鉴定化合物**5**为没食子酸(galic acid)。

化合物 **6** 白色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。负离子 ESI-MS 给出 m/z 183.2 $[M-H]^-$ 。 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ : 7.05(2H, s, H-2, H-6), 3.80(3H, s, $-OCH_3$)。 ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 169.0(C-7), 146.4(C-3, 5), 139.7(C-4), 121.4(C-1), 110.0(C-2, C-6), 52.3($-OCH_3$)。以上数据与文献[7]报道一致,故鉴定化合物 **6** 为没食子酸甲酯(methyl gallate)。

化合物 **7** 白色粉末(甲醇),三氯化铁反应呈深蓝色(TLC)。 1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ : 7.05(2H, s, H-2, H-6), 4.26(2H, q, $-OCH_2-$), 1.33(3H, t, $-CH_3$)。 ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ : 168.5($-COO-$), 146.4(C-3, C-5), 139.6(C-4), 121.8(C-2), 110.0(C-2, 6), 61.6($-OCH_2-$), 14.5($-CH_3$)。以上数据与文献[6]报道一致,故鉴定化合物 **7** 为没食子酸乙酯(ethyl gallate)。

4 五倍子的抗病毒活性筛选试验

近年来,有文献报道五倍子具有抗 HIV-1^[8]、TMV^[9]、乙型肝炎^[10]和 HCV 病毒^[11]的活性。为了确定五倍子中抗病毒活性物质基础,本课题组采用 MTT 法对五倍子中分离得到的部分单体化合物进行了体外抗 HSV、RSV 和 Cox B3 病毒的活性筛选。用维持液对溶解于 DMSO 中的样品进行对倍稀释,使样品的最高浓度为 100 $\mu g/mL$ (单体)。将已长有单层细胞的 96 孔板内的原细胞生长液弃去,每孔加入 100 TCID₅₀ 的病毒混悬液 50 μL 和不同浓度的样品溶液 50 μL ,每个浓度样品平行 3 孔。正常细胞对照组每孔加入维持液 100 μL ;病毒对照组每孔加入 100 TCID₅₀ 的病毒混悬液 50 μL 和维持液 50 μL 。置于 37 $^{\circ}C$, 5% CO₂ 培养箱中培养,每天在显微镜下观察病毒所致细胞病变效应(CPE)。当病毒对照组出现 + + + (感染细胞病变程度评价方法:1% ~ 25% 为“+”,26% ~ 50% 为“++”,51% ~ 75% 为“+++”,76% ~ 100% 为“++++”)。正常细胞对照组为正常时,记录各孔的 CPE,求出样品对细胞病变的半数抑制浓度(IC₅₀)。结果发现,从五倍子中分离得到的水解鞣质型化合物 **3** 具有显著的抗 HSV-1、呼吸道合胞病毒 A 株(RSV A strain)和呼吸道合胞病

毒 Long 株(RSV Long strain)活性,其 IC₅₀ 分别为 13.3, 3.3 和 3.3 mmol/L,提示其可能具有广谱抗病毒作用。

参考文献

- [1] Editorial Board of the Flora of China. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1980, **45** (1): 105.
- [2] Li CY, Ding WJ, Qu GR, *et al.* Chemical constituents of *Galla Chinensis* [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2008, **39** (8): 1129–1130.
- [3] Zheng GM, Xu LX, Wu P, *et al.* Chemical constituents from pericarp of *longan* fruits [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, **42** (8): 1485–1489.
- [4] Cho JY, Sohn MJ, Lee J, *et al.* Isolation and identification of pentagalloylglucose with broad-spectrum antibacterial activity from *Rhus trichocarpa* Miquel [J]. *Food Chem*, 2010, **123** (2): 501–506.
- [5] Chang B, Xiao LJ, Zhang J, *et al.* Chemical constituents from *Abies ernestii* var. *Salouenensis* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, **45** (1): 43–47.
- [6] Tan JJ, Yang L, Du ZQ, *et al.* Chemical constituents in roots of *Paeonia lactiflora* [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, **41** (8): 1245–1248.
- [7] Ding G, Liu YZ, Song MP, *et al.* Ployphenols from *Terminalia chebula* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, **32** (3): 193–196.
- [8] Wang RR, Gu Q, Wang HY, *et al.* Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, **117** (1): 249–256.
- [9] Li HX. Study on inhibition efficiency and relative mechanism of several antiviral agents to control tobacco mosaic virus (几种抗病毒药剂对烟草花叶病毒的抑制作用及相关机理研究) [D]. Agricultural University of Hebei, 2010.
- [10] Xie ZC, Chen ZP, Wu ZB, *et al.* Experimental study on screening of Chinese herbal medicine for anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) [J]. *Chin J Integr Med* (中国中西医结合杂志), 2002, **22** (6): 139–141.
- [11] Duan D, Li ZQ, Luo HP, *et al.* Antiviral compounds from traditional Chinese medicines *Galla Chinese* as inhibitors of HCV NS3 protease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, **14** (24): 6041–6044.