

彝族虫类药日本琵琶甲的化学成分研究

晏永明^{1,2}, 吕青¹, 董小萍², 李艳¹, 程永现^{1*}¹ 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204; ² 成都中医药大学药学院, 成都 610075

摘要: 采用多种分离材料包括硅胶、Sephadex LH-20 和 RP-18 从日本琵琶甲的 50% 乙醇提取物的正丁醇部位分离得到 10 个化合物, 经过波谱学方法分别鉴定为 Bracteanolide A (1)、3- β -Dihydroxyphenylacetic acid methyl ester (2)、Hydroxytyrosol (3)、3- β -Dihydroxy- β -methoxyphenethyl alcohol (4)、(S)-2-(3- β -Dihydroxyphenyl)-2-ethoxy-ethanol (5)、3-Hydroxy-4-methoxy-phenylmethylcarbinol (6)、4-Hydroxybenzoic acid (7)、原儿茶醛 (8)、Ethyl β -D-xylobioside (9) 和 Butyl β -D-xylobioside (10)。所有化合物均系从该种中首次分离。其中化合物 1 具有抑制脂多糖诱导的巨噬细胞一氧化氮产生的作用, 可能为该昆虫消炎、消包块的物质基础之一。

关键词: 日本琵琶甲; Bracteanolide A; 一氧化氮

中图分类号: R93

文献标识码: A

Chemical Constituents from the Insect *Blaps japonensis*YAN Yong-ming^{1,2}, LV Qing¹, DONG Xiao-ping², LI Yan¹, CHENG Yong-xian^{1*}

¹ State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; ² College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Ten compounds were isolated from the ethanol extract of *Blaps japonensis* Marseul. by the combined separation of silica gel, Sephadex LH-20 and RP-18 column chromatography. They were identified as Bracteanolide A (1), 3- β -Dihydroxyphenylacetic acid methyl ester (2), Hydroxytyrosol (3), 3- β -Dihydroxy- β -methoxyphenethyl alcohol (4), (S)-2-(3- β -Dihydroxyphenyl)-2-ethoxy-ethanol (5), 3-Hydroxy-4-methoxy-phenylmethylcarbinol (6), 4-Hydroxybenzoic acid (7), Protocatechualdehyde (8), Ethyl β -D-xylobioside (9) and Butyl β -D-xylobioside (10), respectively, on the basis of NMR data and comparison with literatures. All the compounds were isolated from this species for the first time and compound 1 could inhibit the production of nitric oxide of LPS-induced macrophage cells.

Key words: *Blaps japonensis*; bracteanolide A; nitric oxide

日本琵琶甲 (*Blaps japonensis* Marseul.) 属鞘翅目 (Coleoptera) 拟步甲科 (Tenebrionidae) 琵琶甲族 (*Blaptini*) 琵琶甲属 (*Blaps*) 昆虫。日本琵琶甲又称臭壳子、臭屁虫、打屁虫等, 在云南民间应用广泛, 尤其是彝族治疗疑难杂症处方中常用的药用昆虫, 具有抗菌、消炎、解毒、消包块、抗惊厥等作用^[1]。目前国内外对其化学成分及生物活性研究较少, 已有的研究表明同属昆虫中含有一些对苯二酚类和脂溶性成分等^[2-5]。我们采用各种柱色谱从其 50% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位分离得到 10 个化合物, 所有化合物均系首次从该药用昆虫中分离得到。活性

测试表明化合物 1 具有抑制脂多糖诱导的巨噬细胞一氧化氮产生作用。

1 仪器与材料

JASCO-20C 型数字式旋光仪 (日本); VG AUTO Spec-3000 (英国 VG 公司) 及 Finnigan MAT 90 质谱仪 (德国 Finnigan 公司); Bruker AM-400 及 DRX-500 MHz 核磁共振仪 (TMS 作为内标 δ 为 ppm, J 为 Hz); 200 ~ 300 目柱色谱用硅胶、硅胶 H 和 GF₂₅₄ 薄层色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); 45 ~ 75 μ m MCI gel CHP 20P (日本三菱公司产品); 25 ~ 100 μ m Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 40 ~ 63 μ m RP-18 (日本 Daiso)。石油醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、甲醇等有机溶剂均为工业纯经重蒸后使用。

日本琵琶甲样品购自云南花鸟市场 (采集自云

收稿日期: 2012-04-01 接受日期: 2012-05-31

基金项目: 云南省科技强省中德国际合作项目 (2009AC011); 国家自然科学基金项目 (21172223)

* 通讯作者 Tel: 86-871-5223048; E-mail: yxcheng@mail.kib.ac.cn

南元江), 由中国科学院昆明动物研究所董大志研究员鉴定。标本(CHYX-0469)存于中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。

2 提取与分离

日本琵琶甲 5 kg, 粉碎, 50% 乙醇冷浸动态提取 3 次, 每次 2 d, 过滤, 减压回收乙醇得浸膏 450 g, 加水悬浮后依次用石油醚和正丁醇进行萃取, 合并正丁醇萃取液, 浓缩得到正丁醇部位 140 g。正丁醇部位经硅胶柱色谱(200~300 目, 1.5 kg)以氯仿-甲醇梯度洗脱得到 5 个组份(Fr. 1~Fr. 5)。各组份经硅胶、MCI gel CHP 20P、Sephadex LH-20(甲醇)、RP-18 反复柱层析, 结合制备薄层色谱从 Fr. 1 获得 **9** (20 mg)、**7** (10 mg) 和 **8** (7 mg); Fr. 2 获得 **2** (20 mg)、**4** (10 mg) 和 **6** (12 mg); Fr. 3 获得 **1** (5 mg); Fr. 4 获得 **3** (40 mg) 和 **10** (5 mg); Fr. 5 获得 **5** (12 mg)。

3 结构鉴定

Bracteanolide A (1) 白色固体。[α]_D^{22.5}: -49.1 (c 0.09, MeOH); FAB-MS (negative): m/z = 207 [M-H]⁻; 从¹³C NMR 谱可以看出, 信号基本在烯区, 有 5 个次甲基和 5 个季碳, 其中包含 C-2 (δ 172.4) 的酯基。¹H NMR 谱可以看出, H-2' (δ 7.20, d, J = 2.6 Hz)、H-5' (δ 6.82, d, J = 7.8 Hz) 和 H-6' (δ 7.20, dd, J = 7.8, 2.6 Hz) 的裂峰及偶合常数可以推测存在 ABX 系统苯环结构, 确定了分子式为 C₁₀H₈O₅, 其结构和已知化合物 Bracteanolide A 相似^[6], HMBC 观察到 H-5'/C-2 (δ 172.4)、H-3'/C-5 (δ 99.2) 相关, 确定了不饱和五元内酯环的存在, H-2'/C-4 (δ 164.9) 和 H-3'/C-1' (δ 122.5) 相关, 确定了苯环和内酯环的连接, 综合以上信息确定了化合物 **1** 的平面结构和 Bracteanolide A 相同。化合物 **1** 具有单手性中心和半缩醛结构, 该类化合物通常呈现部分消旋化, 1 与文献^[6]相比, 其旋光符号相反, 绝对数值基本一致, 故化合物 **1** 可能为右旋异构体占优势的混合物。¹H NMR [400 MHz, CD₃OD + CD₃COCD₃ (1:1)] δ : 6.23 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, s, H-5), 7.20 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5'), 7.19 (1H, d, J = 7.8, 2.6 Hz, H-6'); ¹³C NMR [100 MHz, CD₃OD + CD₃COCD₃ (1:1)] δ : 172.4 (C-2), 111.9 (C-3), 164.9 (C-

4), 99.2 (C-5), 122.5 (C-1'), 115.8 (C-2'), 146.4 (C-3'), 149.8 (C-4), 116.2 (C-5'), 121.9 (C-6')。

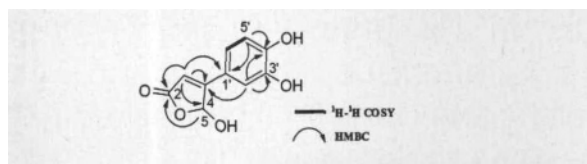


图 1 化合物 **1** 的主要 HMBC 和 COSY 相关

Fig. 1 Key HMBC and ROESY correlations of compound **1**

3.4-Dihydroxyphenylacetic acid methyl ester (**2**)

白色胶状物。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.72-6.59 (3H, m, Ar-H), 3.49 (2H, s, H-1'), 3.63 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 125.9 (C-1), 115.5 (C-2), 143.1 (C-3), 143.8 (C-4), 116.3 (C-5), 121.6 (C-6), 40.4 (C-1'), 173.8 (C-2'), 52.4 (OCH₃)。以上数据与文献数值相符^[7]。

Hydroxytyrosol (3) 白色胶状物。¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 6.70 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.69 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.52 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6), 2.63 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-1'), 3.65 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-2'), 7.81 (2H, brs, Ar-OH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 131.7 (C-1), 116.8 (C-2), 144.1 (C-3), 145.6 (C-4), 115.9 (C-5), 120.9 (C-6), 39.6 (C-1'), 64.2 (C-2')。以上数据与文献数值基本相符^[8]。

3,4-Dihydroxy- β -methoxyphenethyl alcohol (**4**)

白色胶状物。¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 6.80 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 6.78 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 6.63 (1H, dd, J = 7.8, 2.1 Hz, H-6), 4.08 (1H, dd, J = 7.9, 4.0 Hz, H-1'), 3.55 (1H, dd, J = 11.3, 8.2 Hz, H-2'a), 3.43 (1H, brd, J = 10.7 Hz, H-2'b), 3.58 (1H, brs, 2'-OH), 3.18 (3H, s, OCH₃), 7.88 (1H, brs, Ar-OH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) δ : 132.1 (C-1), 115.8 (C-2), 145.5 (C-3), 145.9 (C-4), 114.7 (C-5), 119.5 (C-6), 86.7 (C-1'), 67.8 (C-2'), 56.6 (OCH₃)。以上数据鉴定化合物 **4** 结构为 3,4-Dihydroxy- β -methoxyphenethyl alcohol, 并对其核磁共振数据首次进行了归属。

(S)-(+)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-ethoxyethanol (**5**) 白色胶状物。¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 6.81 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.78

(1H δ J = 8.0 Hz ,H-5) δ 6.65 (1H ,dd J = 8.0 , 1.9 Hz ,H-6) δ 4.20 (1H δ J = 8.0 δ 4.1 Hz ,H-2') , 3.37 (4H μ ,H-1 ,H-1') δ 1.11 (3H t J = 7.0 Hz , H-2') δ 3.66 (1H ,brs ,2'-OH) δ 7.88 (2H ,brs ,Ar-OH) ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3COCD_3) δ : 132.6 (C-1) ,114.6 (C-2) ,145.8 (C-3) ,145.4 (C-4) ,115.8 (C-5) ,119.3 (C-6) ,67.9 (C-1') ,83.7 (C-2') ,64.5 (C-1') ,15.6 (C-2')。以上数据与文献数值相符^[9]。

3-Hydroxy-4-methoxy-phenylmethylcarbinol (6)

白色固体。 ^1H NMR (500 MHz , CD_3COCD_3) δ : 6.67 (1H δ J = 3.0 Hz ,H-2) δ 6.60 (1H δ J = 8.6 Hz ,H-5) δ 6.52 (1H ,dd J = 8.6 ,3.0 Hz ,H-6) δ 4.65 (1H μ J = 6.5 Hz ,H-1') δ 1.33 (3H δ J = 6.5 Hz ,H-2') δ 3.23 (3H ,s , OCH_3) ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3COCD_3) δ : 131.1 (C-1) ,115.6 (C-2) ,148.8 (C-3) ,151.4 (C-4) ,113.6 (C-5) ,117.1 (C-6) ,75.8 (C-1') ,22.6 (C-2') ,56.7 (OCH_3)。以上数据与文献数值相符^[10]。

4-Hydroxybenzoic acid (7) 白色粉末。 ^1H NMR (400 MHz , CD_3OD) δ : 6.71 (1H δ J = 8.5 Hz ,H-3 δ) δ 7.79 (1H δ J = 8.5 Hz ,H-2 δ) ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3OD) δ : 127.7 (C-1) ,132.5 (C-2 , 6) ,115.5 (C-3 δ) ,161.6 (C-4) ,174.1 (COOH)。以上数据与文献数值相符^[11]。

原儿茶醛(8) 白色粉末。 ^1H NMR (400 MHz , CD_3OD) δ : 7.30 (2H ,brs ,H-2 δ) δ 6.91 (1H ,brd J = 5.1 Hz ,H-5) δ 9.67 (1H s ,CHO) ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3OD) δ : 130.7 (C-1) ,116.2 (C-2) ,147.1 (C-3) ,153.7 (C-4) ,119.4 (C-5) ,126.5 (C-6) , 193.1 (CHO)。以上数据与文献数值相符^[12]。

Ethyl β -D-xylobioside (9) 白色固体。 ^1H NMR (400 MHz , CD_3OD) δ : 4.21 (1H δ J = 7.0 Hz ,H-1) δ 3.14 (1H μ ,H-2) δ 3.33 (1H t J = 8.1 Hz ,H-3) δ 3.50 (1H ,overlap ,H-4) δ 3.50 (1H ,overlap ,H-5a) δ 3.21 (1H ,dd J = 11.0 δ 9.8 Hz ,H-5b) δ 3.80 (2H μ ,C-1') δ 1.14 (3H t J = 7.2 Hz ,C-2') ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3OD) δ : 104.3 (C-1) ,74.2 (C-2) ,77.3 (C-3) ,70.8 (C-4) ,66.0 (C-5) ,65.0 (C-1') ,15.4 (C-2')。以上数据与文献数值相符^[13]。

Butyl β -D-xylobioside (10) 白色固体。 ^1H NMR (500 MHz , CD_3OD) δ : 4.21 (1H δ J = 7.0 Hz ,H-1) δ 3.15 (1H μ ,H-2) δ 3.33 (1H t J = 8.2 Hz ,H-3) δ 3.45 (1H ,overlap ,H-4) δ 3.50 (1H ,over-

lap ,H-5a) δ 3.17 (1H μ ,H-5b) δ 3.79 (2H μ ,C-1') δ 1.52 (2H μ ,H-2') δ 1.35 (2H μ J = 7.6 Hz , H-3') δ 0.88 (3H t , J = 7.4 Hz ,H-4') ; ^{13}C NMR (100 MHz , CD_3OD) δ : 104.5 (C-1) ,74.1 (C-2) , 77.1 (C-3) ,70.7 (C-4) ,66.0 (C-5) ,69.4 (C-1') , 32.5 (C-2') ,19.8 (C-3') ,14.1 (C-4') ,以上数据与文献数值相符^[13]。

4 活性测试

化合物1为具有五元不饱和内酯环的结构,为此我们对其进行了生物活性测试。应用脂多糖(LPS)和IFN- γ 刺激RAW264.7细胞,然后应用Griess试剂测定细胞培养上清液中 NO_2^- 水平以反映诱导型一氧化氮合成酶的总体酶活。采用MTT^[14]法测定细胞存活量,应用Reed and Muench^[15]法计算化合物的 IC_{50} 值。结果表明化合物1可显著抑制LPS诱导的RAW264.7产生一氧化氮,其 IC_{50} 值为14.8 $\mu\text{g/mL}$,提示化合物1可能具有抗炎或抗肿瘤作用,与该昆虫的传统功效有密切关联。

致谢:中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室分析中心测试所有图谱;云南省科技强省中德国际合作项目(2009AC011);国家自然科学基金项目(21172223)。

参考文献

- 1 Zhang LS (张兰胜) ,Xia CL (夏从龙) ,Yang YS (杨永寿) ,et al. Progress on studies of *Blaps rynchopetara* Fairmaire of the Yi Nationality. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药) 2009 20: 3113-3114.
- 2 Li WL (李维莉) ,Xie JL (谢金伦) ,et al. The study of the chemical constituents of *Blaps japonensis yunnanensis*. *J Kunming Tech Coll* (昆明师范高等专科学校) 2000 22(4): 18-19.
- 3 Luo CY (罗炘芸) ,Liu GM (刘勇) ,Li L (李蕾) . Studies on the liposoluble antibacterial constituents of Yunnan *Balaps*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) . 1999 30: 566-567.
- 4 Lin NY (林南英) ,Liu WZ (刘为忠) ,Li WL (李维莉) ,et al. Study on the chemical components of *Blaps japonensis yunnanensis* Mars. *Zhongguo Minzu Minjian Yiyao Zazhi* (中国民族民间医药杂志) . 2000 44: 162-164.
- 5 Luo JR (罗建蓉) ,Zhang Z (张楨) ,Yang YS (杨永寿) . Analysis of the fat-soluble components in *Blaps rynchopetara* Fairmaire by GC-MS. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药) 2010 21: 12-13.

(下转第1742页)

- 112.
- 9 Cao JQ ,Wang YN ,Zhou YZ *et al.* Isolation and identification of the chemical constituents from *Blumea riparia* DC. (II) . *Chin J Med Chem* 2008 ,18: 449-451.
- 10 Wang LN ,Xu BX ,Lin HR *et al.* Study on the chemical constituents of *Geum japonicum* var. chinense. *Lishizhen med materia medica res* 2009 20 :798-799.
- 11 Jin PF ,Deng ZW ,Pei YH *et al.* Two phaeophytin type analogues from marine sponge *Dysidea* sp. . *Chin Chem Lett* , 2005 ,16 :209-211.
- 12 Wang JY ,Chen D ,Liang LJ *et al.* Chemical constituents from flowers of *Chrysanthemum indicum*. *China J Chin Mat Med* , 2010 35: 718-721.
- 13 Hoang TL ,Do TH ,Chau TAM *et al.* Constituents from the stem barks of *Canarium bengalense* with cytoprotective activity against hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity. *Arch Pharm Res* 2012 35(1) : 87-92.
- 14 Qian TX ,Yang SL ,Xu LZ. Study on chemical constituents of *Phaeanthus saccopetaloides* (I) . *Nat prod Res Dev* ,1997 ,9 (2) : 32-34.
- 15 Li Y ,Qiu C ,Zhang DM *et al.* Studies on chemical constituents from branch of *Trema angustifolia*. *China J Chin Mat Med* 2004 29: 235-237.
- 16 Su K ,Gong M ,Zhou J *et al.* Chemical constituents from *Nau-clea Officinalis* leaves. *J Shehezi Univ* 2010 28: 257-259.
- 17 Wang R ,Chou GX ,Zhu EY *et al.* Studies on chemical constituents of *Paeonia veitchii* L. . *Chin Pharm J* ,2007 ,42: 661-663.
- 18 Lami N ,Kadota S ,Kikuchi T *et al.* Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. III. Identification of Ca^{2+} channel antagonistic compound from the methanol extract. *Chem Pharm Bull* ,1991 39 ,1551-1555.
- 19 Song YB ,Cheng WM ,Qu GX *et al.* Chemical constituents of *Sinomenium acutum*. *J Shenyang Pharm Univ* ,2007 24 ,79-81.

~~~~~

( 上接第 1714 页)

- 6 Wang GJ ,Chen SM ,Chen WC *et al.* Selective inducible nitric oxide synthase suppression by new bracteanolides from *Murdannia bracteata*. *J Ethnopharmacol* ,2007 ,112: 221-227.
- 7 Narayanan J ,Hayakawa Y ,Fan JF *et al.* Convenient syntheses of biogenic aldehydes 3 4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3 4-dihydroxyphenylglycolaldehyde. *Bioorg Chem* 2003 , 31: 191-197.
- 8 Renato C ,Antonio E ,Salvatore A *et al.* A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J Agric Food Chem* ,1999 47: 1745-1748.
- 9 Xu QM ,Liu YL ,Li XR *et al.* Two new phenylglycol derivatives isolated from *Syringa reticulata* var. *mandshurica* and their antifungal activities. *Chem Pharm Bull* ,2009 57: 863-866.
- 10 Torregiani E ,Seu G ,Minassi A *et al.* Cerium ( III) chloride-promoted chemoselective esterification of phenolic alcohols. *Tetrahedron Lett* 2005 46: 2193-2196.
- 11 Katherine NS. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J Am Chem Soc* ,1972 94: 8564-8568.
- 12 Feng W ( 冯薇) ,Yang JS ( 杨峻山) . Studies on chemical constituents of *Fomes fomentarius* ( L. Ex. Fr. ) . *Chin Pharm J* ( 中国药学杂志) 2010 45: 1528-1530.
- 13 Jiang ZQ ,Zhu YP ,Li LT *et al.* Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl beta-D-xylobiosides and xylosides. *J Biotechnol* 2004 114: 125-134.
- 14 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* ,1983 65( 1-2) : 55-63.
- 15 Reed LJ ,Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* ,1938 27: 493-497.