

## 彝药日本琵琶甲虫的化学成分及其细胞毒活性

晏永明<sup>1,2</sup>, 董小萍<sup>2</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 程永现<sup>1\*</sup>

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, 云南 昆明 650204

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

**摘要:** 目的 研究日本琵琶甲虫 *Blaps japonensis* 的化学成分及其生物活性。方法 采用多种柱色谱法对日本琵琶甲虫的50%乙醇提取物的正丁醇萃取部位化学成分进行分离和纯化, 并根据其理化性质及波谱数据鉴定结构; 采用 MTT 法进行抗肿瘤活性筛选。结果 共分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为 *N*-乙酰基多巴胺 (1)、(-)-*N*-acetylnoradrenaline (2)、1, 4-diacetamidobutane (3)、*N, N'*-pentane-1, 5-diyl diacetamide (4)、(1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide (5)、吲哚酸 (6)、吲哚醛 (7)、deoxyuridine (8) 和胸苷 (9)。细胞毒活性筛选表明, 化合物 6 对 HL-60、SMMC-7721、A-549、MCF-7 和 SW480 细胞株有显著抑制作用。结论 所有化合物均为首次从该昆虫中分离得到, 并首次对化合物 2 的核磁共振波谱数据进行了归属。

**关键词:** 日本琵琶甲虫; *N*-乙酰基多巴胺; 吲哚酸; 胸苷; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0269-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.006

## Chemical constituents in Yi Medicine *Blaps japonensis* and their cytotoxic activities

YAN Yong-ming<sup>1,2</sup>, DONG Xiao-ping<sup>2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, CHENG Yong-xian<sup>1</sup>

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

**Key words:** *Blaps japonensis* Marseul.; *N*-acetyldopamine; indolic acid; thymidine; cytotoxic activity

虫类中药是中医临床用药的一大特色, 古有“虫类通络”, “虫蚁具有搜剔之能”之说, 但关于虫类中药的药效物质基础研究长期以来却相对薄弱。日本琵琶甲虫 *Blaps japonensis* Marseul. 属鞘翅目 (Coleoptera) 拟步甲科 (Tenebrionidae) 琵琶甲族 (Blaptini) 琵琶甲属 *Blaps* Fabricius 昆虫, 在云南民间尤其是彝族作为药用应用频繁, 具有消炎、消包块、解毒、调节机体免疫力等作用<sup>[1]</sup>, 彝族用于治疗疑难疾病的处方中常用之。据“消炎、消包块”的功效推测该昆虫可能含有抗肿瘤活性物质, 深入研究其化学成分及其生物活性过程中, 采用各种柱色谱从日本琵琶甲 50%乙醇提取物的正丁醇部位分离得到 9 个含氮化合物, 分别鉴定为 *N*-乙酰基多巴胺 (*N*-acetyldopamine, 1)、(-)-*N*-acetylnoradrenaline (2)、1, 4-diacetamidobutane (3)、*N, N'*-pentane-1, 5-diyl diacetamide (4)、(1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide

(5)、吲哚酸 (indole acid, 6)、吲哚醛 (1*H*-indole-3-carboxaldehyde, 7)、deoxyuridine (8) 和胸苷 (thymidine, 9)。所有化合物均为首次从该昆虫中分离得到。采用 MTT 法对化合物 1、2、5~7 进行了抗肿瘤活性筛选, 化合物 6 表现出显著的体外肿瘤细胞抑制活性。

### 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; 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  $\mu$ m MCI gel CHP 20P (日本三菱公司产品); 25~100  $\mu$ m Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 40~63  $\mu$ m RP<sub>18</sub> (日本 Daiso)。石油醚、氯仿、丙酮、醋酸乙酯、甲醇等有机溶剂均为工业纯

收稿日期: 2012-06-10

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

作者简介: 晏永明 (1985—), 男, 甘肃临洮人, 研究实习员, 研究方向为中药化学与生物学。

\*通信作者 程永现 Tel: (0871)5223048 E-mail: yxcheng@mail.kib.ac.cn

经重蒸后使用。

日本琵琶甲虫样品购自云南花鸟市场(采自云南元江),由中国科学院昆明动物研究所董大志研究员鉴定为日本琵琶甲虫 *Blaps japonensis* Marseul, 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

日本琵琶甲虫 5 kg, 粉碎, 50%乙醇冷浸提取 3 次, 每次 2 d, 不断搅拌, 滤过, 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。正丁醇部位行硅胶柱色谱(200~300 目), 以氯仿-甲醇梯度洗脱得到 5 个组分(Fr. 1~5), 经过硅胶柱色谱, MCI gel CHP 20P、Sephadex LH-20(甲醇)柱色谱、RP<sub>18</sub>(30%、50%、70%、90%甲醇)柱色谱以及制备薄层色谱从 Fr. 1 得到化合物 5(6 mg)、6(12 mg)和 7(3 mg); 从 Fr. 2 得到化合物 1(85 mg)和 2(14 mg); 从 Fr. 3 得到化合物 3(80 mg)和 4(20 mg); 从 Fr. 4 得到化合物 8(35 mg)和 9(112 mg)。

## 3 结构鉴定

化合物 1: 黄色油状物。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 7.25 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 7.21 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5), 6.81 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, H-6), 2.93 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 3.73 (2H, dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, H-2'), 2.05 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 8.54 (1H, brs, -NH), 11.09 (2H, brs, Ar-OH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 131.8 (C-1), 117.6 (C-2), 145.9 (C-3), 147.5 (C-4), 116.9 (C-5), 120.6 (C-6), 36.1 (C-1'), 42.2 (C-2'), 170.4 (C=O), 23.4 (-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道一致<sup>[2]</sup>, 故鉴定化合物 1 为 *N*-乙酰基多巴胺。

化合物 2: 黄色油状物, [α]<sub>D</sub><sup>17.6</sup> -17.5 (*c* 0.11, MeOH)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 7.70 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-2), 7.29 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.20 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, H-6), 5.31 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.3 Hz, H-1'), 4.08 (1H, m, H-2'a), 3.84 (1H, m, H-2'b), 2.07 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 8.82 (1H, brs, -NH), 11.2 (2H, brs, Ar-OH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 136.5 (C-1), 115.0 (C-2), 146.7 (C-3), 147.4 (C-4), 116.6 (C-5), 118.2 (C-6), 73.2 (C-1'), 49.0 (C-2'), 171.1 (C=O), 23.3 (-CH<sub>3</sub>)。首次对其核磁数据进行归属。对照比旋光数据<sup>[3]</sup>, 确定化合物 2 为(-)-*N*-acetyl noradrenaline。

化合物 3: 白色固体, ESI-MS *m/z*: 171 [M-H]<sup>-</sup>。

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.14 (4H, brt, *J* = 6.3 Hz, H-1, 4), 1.48 (4H, m, H-2, 3), 1.90 (6H, s, 2×-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 173.2 (2×C=O), 40.1 (C-1, 4), 27.7 (C-2, 3), 22.5 (2×-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道一致<sup>[4]</sup>, 故鉴定化合物 3 为 1, 4-diacetamidobutane。

化合物 4: 白色固体, ESI-MS *m/z*: 185 [M-H]<sup>-</sup>。

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.13 (4H, t, *J* = 7.0 Hz, H-1, 5), 1.48 (4H, m, H-2, 4), 1.33 (2H, m, H-3) 1.90 (6H, s, 2×-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 173.2 (2×C=O), 40.3 (C-1, 5), 29.9 (C-2, 4), 25.2 (C-3), 22.5 (2×-CH<sub>3</sub>)。以上氢谱数据与文献报道一致<sup>[5]</sup>, 故鉴定化合物 4 为 *N, N'*-pentane-1, 5-diyldiacetamide, 并首次归属了其碳谱数据。

化合物 5: 白色固体, FAB-MS *m/z*: 187 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 9.53 (1H, s, H-2), 8.97 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-4), 7.44 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H-5), 7.37 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-6), 7.63 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 9.08, 8.94 (2H, brs, -NH<sub>2</sub>), 13.55 (1H, brs, -NH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 139.9 (C-2), 114.2 (C-3), 128.2 (C-3a), 123.1 (C-4), 123.4 (C-5), 124.3 (C-6), 113.2 (C-7), 137.8 (C-7a), 183.5 (C-8), 166.9 (C-9)。以上数据与文献报道一致<sup>[6]</sup>, 故鉴定化合物 5 为 (1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide。

化合物 6: 白色固体。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.94 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, dd, *J* = 6.8, 1.5 Hz, H-4), 7.17 (2H, m, H-5, 6), 7.42 (1H, dd, *J* = 6.8, 1.5 Hz, H-7); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ: 133.4 (C-2), 108.7 (C-3), 122.0 (C-4), 122.4 (C-5), 123.6 (C-6), 112.9 (C-7), 127.5 (C-8), 138.2 (C-9), 169.3 (-COOH)。以上数据与文献报道一致<sup>[7]</sup>, 故鉴定化合物 6 为吲哚酸。

化合物 7: 白色固体。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.06 (1H, s, H-2), 8.13 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-4), 7.25 (2H, m, H-5, 6), 7.46 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-7), 9.85 (1H, s, -CHO); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ: 139.7 (C-2), 120.1 (C-3), 122.4 (C-4), 123.6 (C-5), 125.0 (C-6), 113.1 (C-7), 138.9 (C-8), 125.7 (C-9), 187.4 (-CHO)。以上数据与文献报道一致<sup>[7]</sup>, 故鉴定化合物 7 为吲哚酸。

化合物 8: 白色固体。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 5.68 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 7.98 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6), 6.26 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, Rib-H-1),

2.27 (2H, m, Rib-H-2), 3.92 (1H, dd,  $J = 3.5, 3.3$  Hz, Rib-H-3), 4.42 (1H, td,  $J = 5.9, 3.3$  Hz, Rib-H-4), 3.83 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.3$  Hz, Rib-H-5a), 3.74 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.3$  Hz, Rib-H-5b);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 152.4 (C-2), 166.5 (C-4), 142.5 (C-5), 102.7 (C-6), 89.0 (Rib-1), 41.4 (Rib-2), 72.3 (Rib-3), 86.7 (Rib-4), 62.9 (Rib-5)。以上数据与文献报道一致<sup>[8]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为 deoxyuridine。

化合物 **9**: 白色固体。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 7.84 (1H, s, H-6), 6.30 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, Rib-H-1), 2.26 (2H, m, Rib-H-2), 3.92 (1H, dd,  $J = 3.5, 3.3$  Hz, Rib-H-3), 4.42 (1H, td,  $J = 5.9, 3.3$  Hz, Rib-H-4), 3.83 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.3$  Hz, Rib-H-5a), 3.74 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.3$  Hz, Rib-H-5b), 1.90 (3H, s,

5-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 152.4 (C-2), 166.5 (C-4), 111.5 (C-5), 138.2 (C-6), 88.8 (Rib-1), 41.4 (Rib-2), 72.3 (Rib-3), 86.2 (Rib-4), 62.9 (Rib-5), 12.5 (5-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道一致<sup>[8]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为胸苷。

#### 4 活性测试

采用 MTT 法<sup>[9]</sup>测试了化合物 **1**、**2**、**5**~**7** 对 5 种人体肿瘤细胞株 (白血病 HL-60、肝癌 SMMC-7721、肺癌 A-549、结肠癌 MCF-7 和乳腺癌 SW-480) 的细胞毒活性。结果表明 (表 1), 化合物 **6** 具有显著的细胞毒活性, 其他化合物未显示细胞毒活性 ( $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{mol/L}$ )。化合物 **6** 和 **7** 的差别虽然仅仅在于羧基和醛基, 但化合物 **7** 却未显示活性, 表明羧基对于肿瘤细胞毒活性的重要性。

表 1 化合物 **6** 细胞毒活性  
Table 1 Cytotoxic activity of compound **6**

化合物	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW-480
吲哚酸	1.97	6.91	6.38	2.31	1.57
顺铂	0.75	15.45	13.65	25.54	18.62
紫杉醇	<0.008	0.80	<0.008	0.02	0.12

#### 参考文献

- [1] 张兰胜, 夏从龙, 杨永寿, 等. 彝药喙尾琵琶甲的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3113-3114.
- [2] Naoki N, Shinichi K, Yoko M, *et al.* Optically active *N*-acetyldopamine dimer of the crude drug "Zentai" the cast-off shell of the Cicada, *Cryptotympana* sp. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(11): 1749-1752.
- [3] Steven J S, Manickam S. 4-Alkyl-*O*-quinone/2-hydroxy-*p*-quinone methide isomerase from the larval Hemolymph of *Sarcophaga bullata* [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(28): 16992-16999.
- [4] Houen G, Struve C, Søndergaard R, *et al.* Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and *in situ* characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(11): 3783-3796.
- [5] Smitha V, Jeannie J, William R L, *et al.* Synthesis of amide libraries with immobilized HOBt [J]. *Tetrahedron Lett*, 2011, 52(21): 2722-2724.
- [6] Bao B Q, Zhang P, Lee Y M, *et al.* Monoindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp. [J]. *Mar Drugs*, 2007, 5(2): 31-39.
- [7] 刘 泉, 林文瀚. 中国南海红树植物老鼠簕的化学成分研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2008, 24(6): 648-651.
- [8] 龚运淮, 丁立生. 天然产物核磁共振  $^{13}\text{C-NMR}$  碳谱分析 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2005.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.