白喉乌头中二萜生物碱及其拒食活性研究

陈琳^{a,b,c} 王倩^a 黄帅^a 单连海^a 高峰^a 周先礼^{*,a,b}^(a) 西南交通大学生命科学与工程学院 成都 610031^(b) 西南交通大学材料科学与工程学院 成都 610031^(c) 西华师范大学化学化工学院 南充 637002

摘要 从白喉乌头(*Aconitum leucostomum* Vorosch.)中分离得到 13 个二萜生物碱, 采用 HR-ESI-MS, 1D NMR 和 2D NMR 等波谱技术确定了它们的结构. 其中一个为新的 C₁₈ 二萜生物碱: 刺乌宁, 其余为已知化合物. 同时考察了其中 12 个化合物对甜菜夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性, 结果表明化合物氢茴香基牛扁碱和东乌头定的活性较好(EC₅₀ < 1 mg/cm²), 其次是 *N*-acetylsepaconitine, 赖乌碱和 *N*-去乙酰高乌甲素(EC₅₀ < 2 mg/cm²).

关键词 乌头属; 白喉乌头; 二萜生物碱; leucostonine; 拒食活性

Diterpenoid Alkaloids from *Aconitum leucostomum* and Their Antifeedant ActivityChen, Lin^{a,b,c} Wang, Qian^a Huang, Shuai^a Shan, Lianhai^a
Gao, Feng^a Zhou, Xianli^{*,a,b}^(a) School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031^(b) School of Material Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031^(c) School of Chemistry and Chemical Engineering, China West Normal University, Nanchong 637002

Abstract A new C₁₈ diterpenoid alkaloid, leucostonine (**1**), was isolated from the whole plant of *Aconitum leucostomum* Vorosch., together with twelve known diterpenoid alkaloids. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis, including HR-ESI-MS, 1D NMR and 2D NMR spectra. 12 compounds were tested for their antifeedant activity against larvae of *Spodoptera exigua* Hiibner. Anthranoyllycoctonine and avadharidine showed considerable potent antifeedant activity (EC₅₀ < 1 mg/cm²), followed by *N*-acetylsepaconitine, finaconitine and *N*-deacetylappaconitine (EC₅₀ < 2 mg/cm²).

Keywords aconitum; *Aconitum leucostomum*; diterpenoid alkaloid; leucostonine; antifeedant activity

二萜生物碱由于其结构的复杂多样性, 同时又具有消炎、镇痛、抗心律失常、抗真菌、抗癌以及杀虫和拒食等多种生物活性而越来越受到人们的关注, 其主要分布在乌头属、翠雀属和飞燕草属中^[1]. 白喉乌头(*Aconitum leucostomum* Vorosch.)为毛茛科乌头属植物, 主要分布于中国新疆、甘肃西北部(山丹), 哈萨克斯坦也有分布^[2]. 据《哈萨克药志》记载, 白喉乌头在哈萨克民族作为草乌的代用品使用, 其味辛、热、苦、大毒, 有

祛风除湿、温经止痛的功能, 常用于风寒湿痹等疾病, 为西北少数民族常用民间草药之一. 对白喉乌头中的化学成分研究已有报道^[3], 本课题组对白喉乌头中的药用成分进一步研究, 分离得到 13 个二萜生物碱, 用 HR-ESI-MS、IR、1D NMR 和 2D NMR 等波谱技术以及文献对比等方法确定了它们的结构(图 1), 其中一个为新的二萜生物碱 leucostonine (**1**), 另外 12 个已知化合物包括 7 个 C₁₈ 型二萜生物碱: acosepticine (**2**), 喉乌碱

* Corresponding author. E-mail: zhoulx@swjtu.edu.cn

Received February 16, 2017; revised March 9, 2017; published online April 1, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81402803), the Small Molecule Natural Medicine Innovation Team (No. 15TD0048), the Research Foundation for Educational Commission of Sichuan Province (No. 15ZB0140) and the Fundamental Research Funds for Central Universities (No. 2682017QY04).

国家自然科学基金(No. 81402803)、四川省小分子天然药物创新团队(No. 15TD0048)、四川省教育厅项目(No. 15ZB0140)、中央高校基本科研业务费专项(No. 2682017QY04)资助项目.

(leucostine, **3**), 刺乌定 (lappaconidine, **4**), 刺乌宁 (lappaconine, **5**), *N*-acetylsepaconitine (**6**), 赣乌碱 (finaconitine, **7**) 和 *N*-去乙酰高乌甲素 (*N*-deacetylappaconitine, **8**), 4 个 C_{19} 型二萜生物碱: acosanine (**9**), delphatine (**10**), 氨基酰基牛扁碱 (anthranoyllycoctonine, **11**) 和东乌头定 (avadharidine, **12**), 以及一个 C_{20} 型二萜生物碱裸翠雀亭 (denudatine, **13**). 同时考察了其中 12 个化合物对甜菜夜蛾幼虫的拒食活性.

1 结果与讨论

化合物 **1** 为白色固体, 碘化铋钾显阳性; 通过 HR-ESI-MS 图谱可知该化合物分子式为 $C_{22}H_{35}NO_5$ (m/z : 394.2584 $[M+H]^+$, calcd for 394.2593). IR 图谱显示化合物 **1** 中存在羟基 (3392 cm^{-1}). 结合化合物 **1** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱和 DEPT 谱, 表明其含有一个氮乙基 [δ_{H} 1.09 (t, $J=7.2\text{ Hz}$, 3H); δ_{C} 50.6 t, 13.9 q], 两个甲氧基 [δ_{H} 3.40 (s, 3H), δ_{C} 57.8 q; δ_{H} 3.35 (s, 3H), δ_{C} (56.4 q)]. 进一步分析 ^{13}C NMR 与 DEPT 图谱可知化合物 **1** 中还有 18 个碳原子, 分别是 6 个亚甲基 (δ_{C} 24.0, 29.4, 29.9, 36.4, 37.3 和 53.6), 9 个次甲基 (δ_{C} 33.7, 37.1, 40.4, 43.3, 47.0, 65.0, 72.6, 82.8 和 85.0) 和 3 个季碳 (δ_{C} 49.2, 77.4 和 86.2), 推测该化合物应为 C_{18} 型二萜生物碱^[4]. ^{13}C NMR 数据可知化合物 **1** 中含有五个含氧取代的碳信号, 除两个甲氧基以外, 推测化合物 **1** 中还含有 3 个羟基. HMBC 图谱 (图 2) 中, 两个甲氧基信号 [δ_{H} 3.40, 3.35 (each s, 3H)] 分别与 C-14 (δ_{C} 85.0) 和 C-16 (δ_{C} 82.8) 有远程相关, 可知 2

个甲氧基分别位于 C-14 和 C-16 位. 分析 HMBC 图谱, H-2 (δ_{H} 1.55) 和 H-5 (δ_{H} 1.85) 与 C-1 (δ_{C} 72.6) 有相关, 同时, 在 ^1H NMR 中 H-1 (δ_{H} 3.64) 为一个宽单峰且 C-1 的核磁数据为 δ_{C} 72.6, 可知 C-1 连有一个 α 构型的羟基^[5]. 进一步分析 HMBC 图谱, H-6 α (δ_{H} 1.43) 和 H-15 α (δ_{H} 2.92) 与 C-7 (δ_{C} 86.2) 有相关, H-6 (δ_{H} 1.43; δ_{H} 2.43), H-10 (δ_{H} 1.79) 和 H-14 (δ_{H} 3.72) 与 C-8 (δ_{C} 77.4) 有远程相关, 可以确定余下的两个羟基位于 C-7 和 C-8 位. NOESY 图谱中 H-1 和 H-10, H-10 和 H-14, H-16 和 H-17 有相关, 可以进一步确定 C-1 的羟基应该为 α 构型, C-14 位甲氧基为 α 构型, 而 C-16 位甲氧基为 β 构型. 综上所述, 化合物 **1** 的结构鉴定为 leucostonine (**1**) (图 1).

化合物 **2**~**13** 为已知化合物, 经波谱分析与文献数据对照, 将它们鉴定为 acosepticine (**2**)^[6], 喉乌碱(**3**)^[7], 刺乌定(**4**)^[8], 刺乌宁(**5**)^[9], *N*-acetylsepaconitine (**6**)^[10], 赣乌碱(**7**)^[11], *N*-去乙酰高乌甲素 (**8**)^[12], acosanine (**9**)^[12], delphatine (**10**)^[13], 氨基酰基牛扁碱(**11**)^[14], 东乌头定 (**12**)^[15] 和裸翠雀亭(**13**)^[16]. 其中, 化合物 **2**, **4**~**7**, **9**, **12** 和 **13** 为首次从该植物中分离得到.

采用选择性叶碟法考察了白喉乌头中 7 个 C_{18} , 4 个 C_{19} 和 1 个 C_{20} 二萜生物碱对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hiibner) 3 龄幼虫的拒食活性, 以乌头碱为对照, 结果见表 2. 从表中可以看出, C_{18} 二萜生物碱中, 活性最好的化合物分别是 **6**, **7** 和 **8** ($\text{EC}_{50} < 2\text{ mg/cm}^2$), 其次是 **2**, **4** 和 **1** ($\text{EC}_{50} = 8\sim 21\text{ mg/cm}^2$), 化合物 **3** 基本没有活性 ($\text{EC}_{50} > 30\text{ mg/cm}^2$); 这也是首次对 C_{18} 型二萜生物碱的

图 1 从白喉乌头中分离得到的二萜生物碱
Figure 1 Diterpenoid alkaloids isolated from *Aconitum leucostomum*

表 1 化合物 1 的核磁共振图谱数据(400 MHz for ^1H NMR, 100 MHz for ^{13}C NMR, CDCl_3)Table 1 NMR spectroscopic data of compound 1 (400 MHz for ^1H NMR, 100 MHz for ^{13}C NMR, CDCl_3)

No.	^1H NMR	^{13}C NMR	No.	^1H NMR	^{13}C NMR
1	3.64 br.s	72.6 d	13	2.43 ^a	37.1 d
2	1.55 ^a (α , β)	29.4 t	14	3.72 t (4.8)	85.0 d
3	1.61 ^a (β)	24.0 t	15	1.61 ^a (β)	36.4 t
	1.98 ^a (α)			2.92 ^a (α)	
4	1.98 ^a	33.7 d	16	3.26 t (8.4)	82.8 d
5	1.85 m	40.4 d	17	2.63 br.s	65.0 d
6	1.43 d (14.4) (α)	37.3 t	19	2.53 d (11.2) (α)	53.6 t
	2.43 ^a (β)			3.16 dd (4, 11.2) (β)	
7	—	86.2 s	21	2.92 ^a	50.6 t
8	—	77.4 s	22	1.09 t (7.2)	13.9 q
9	2.20 dd (4.8, 7.2)	47.0 d	14-OCH ₃	3.40 s	57.8 q
10	1.79 m	43.3 d	16-OCH ₃	3.35 s	56.4 q
11	—	49.2 s			
12	1.63 m (α)	29.9 t			
	1.98 ^a (β)				

^a Overlapped signals. 图 2 化合物 1 的关键 HMBC 与 ^1H - ^1H COSY 相关Figure 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound 1

图 3 化合物 1 的关键 NOESY 相关

Figure 3 Key NOESY correlations of compound 1

拒食活性进行研究报道。另外,在 C_{19} 二萜生物碱中,化合物 11 和 12 对甜菜夜蛾拒食作用较强($\text{EC}_{50} < 1 \text{ mg/cm}^2$),而 9 和 10 的作用相对较差($\text{EC}_{50} \approx 7 \text{ mg/cm}^2$),这说明 C-18 位是否有邻氨基苯甲酰衍生物的取代对其活性可能有较大影响。 C_{20} 二萜生物碱 13 对甜菜夜蛾基本没有活性($\text{EC}_{50} > 60 \text{ mg/cm}^2$)。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

核磁共振仪(Bruker AVANCE DRX-400 和 600), 超高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC I-Class)与四级杆飞

表 2 白喉乌头中二萜生物碱对甜菜夜蛾的拒食活性

Table 2 Antifeedant activities of the diterpenoid alkaloids isolated from *A. leucostomum* against *Spodoptera exigua* Hiibner ($n=3$)

Compd.	$\text{EC}_{50}/(\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2})$ (95% confidence limit)	Compd.	$\text{EC}_{50}/(\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2})$ (95% confidence limit)
1	20.75 (14.09, 30.54)	8	1.88 (1.12, 3.18)
2	8.59 (5.98, 12.36)	9	6.34 (2.66, 15.09)
3	>30	10	6.75 (3.01, 15.12)
4	17.65 (11.10, 28.07)	11	0.73 (0.33, 1.62)
5	nt ^a	12	0.84 (0.49, 1.45)
6	(0.85, 1.73)	13	>60
7	1.45 (0.75, 2.81)	Aconitine	0.02 (0.01, 0.11)

^a nt: not test (insufficient compound available).

行时间质谱仪(Xevo G2-S QTof) (waters 公司), 差示扫描量热仪(Netzsch Jupiter STA 449C), 傅立叶红外光谱仪(Thermo Fisher Nicolet 6700), 自动精密旋光仪(Perkin-Elmer 341). 层析用 YMC 反相硅胶填料, 层析用氧化铝(上海陆都化学试剂厂), 层析用硅胶 G 和 H(青岛海洋化工厂), 其余试剂为分析纯。

2.2 实验样品

白喉乌头于 2015 年 8 月采自于新疆伊犁尼勒克县, 由中国科学院华南植物园杨亲二研究员鉴定为白喉乌头(*Aconitum leucostomum* Worosch.), 样品(No. C. Ren & L. Wang 735)保存于中国科学院华南植物园。

2.3 提取与分离

干燥白喉乌头及地上部分(10 kg)粉碎后, 0.1 mol/L 盐酸冷浸 6 次, 每次 3 d, 滤去残渣, 用饱和碳酸钠水溶液调至中性, 再用氨水碱化至 pH 9~10, 用 CH_2Cl_2 萃取, 每次 5 L, 共 4 次, 合并萃取液, 减压浓缩, 得总生物碱(40 g)。

总生物碱 A (40 g) 经过硅胶柱层析[100~200 目硅胶 400 g, 二氯甲烷-甲醇(1%二乙胺), $V:V=100:1 \rightarrow 0:1$]梯度洗脱, 洗脱液经 TLC 检查合并为 $A_1 \sim A_4$ 四个部分。

A_1 部分经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=60:1 \rightarrow 4:1$]洗脱得到组分 A_{1-1} 和组分 A_{1-2} ; 组分 A_{1-1} 经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=40:1 \rightarrow 8:1$]洗脱得到化合物 **3** (22 mg) 和 **4** (14 mg); 组分 A_{1-2} 经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=20:1 \rightarrow 1:1$]梯度洗脱得到 A_{1-2-1} 和 A_{1-2-2} 两个组分, A_{1-2-1} 组分用[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=15:1$]洗脱得化合物 **1** (27 mg) 和 **2** (15 mg); 反相硅胶柱层析(甲醇-水, $V:V=1:9$) 分离组分 A_{1-2-2} 得化合物 **5** (4 mg). A_2 部分经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=40:1 \rightarrow 1:1$]洗脱得 A_{2-1} 和 A_{2-2} 两个组分, A_{2-1} 组分经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=15:1 \rightarrow 1:1$]洗脱得化合物 **6** (13 mg); 反相硅胶柱层析(甲醇-水, $V:V=6:4$) 分离组分 A_{2-2} 得化合物 **7** (19 mg). A_3 部分经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=20:1 \rightarrow 1:1$]洗脱得到 $A_{3-1} \sim A_{3-3}$ 三个组分, 用石油醚丙酮重结晶 A_{3-1} 得到化合物 **8** (14 mg); A_{3-2} 部分经硅胶柱层析[石油醚/丙酮(1%二乙胺), $V:V=20:1 \rightarrow 1:1$]得化合物 **9** (12 mg) 和 **10** (26 mg); 组分 A_{3-3} 经硅胶柱层析[石油醚-丙酮(1%二乙胺), $V:V=20:1$]分离, 再用碱性氧化铝柱层析(氯仿-甲醇, $V:V=15:1$) 纯化得化合物 **11** (23 mg); A_4 部分经硅胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, $V:V=45:0 \rightarrow 0:1$) 梯度洗脱得到 A_{4-1} 和 A_{4-2} 两个组分, A_{4-1} 用反相柱层析(甲醇-水, $V:V=4:1$) 得化合物 **12** (22 mg), 用碱性氧化铝柱层析(氯仿-甲醇, $V:V=20:1$) 分离组分 A_{4-2} 得化合物 **13** (16 mg)。

leucostonine (**1**): 白色固体. m.p. 258.6~259.1 °C; $[\alpha]_D^{20} - 24$ (c 0.30, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 及 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1; IR (KBr) ν_{max} : 3392, 2934, 2819, 2671, 1631, 1602, 1492, 1463, 1384, 1347, 1329, 1299, 1214, 1118, 1098, 1062, 1033, 1010, 997, 978, 961 cm^{-1} . HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 394.2593, found 394.2584.

2.4 拒食活性

甜菜夜蛾, 在温度为 (27 ± 1) °C, 湿度为 70%~80%, 光周期为 14:10 h (L:D) 的条件下饲养, 挑选虫体均匀一致、健壮并饥饿 6 h 的 3 龄幼虫进行试验。

采用 González-Coloma 等^[17]推荐的选择性叶碟法进行活性测定: 用打孔器将新鲜甘蓝叶片裁成直径 2 cm 的叶碟, 在表面均匀涂上 15 μL 药液(处理组)或空白液(对照组)。分别将两片对照组和处理组叶片放置于直径

为 15 cm 的培养皿中, 待液体风干后, 每皿放入 6 头饥饿 6 h 的幼虫。每个处理重复三次。24 h 后用方格纸片法测定取食面积, 并用以下公式计算拒食率: $\text{FR}\% = (\text{CK} - T) / \text{CK} \times 100\%$ 。其中 CK 为对照组叶片取食面积, T 为药剂处理组叶片取食面积。

对于 $\text{FR} > 50\%$ 的化合物测试其 EC_{50} 值(引起 50% 个体有效的剂量)。 EC_{50} 值测定方法: 依据初筛的浓度, 采用梯度稀释法配制一系列浓度的药液, 按照前述方法进行试验, 测定取食面积, 计算拒食率, 并通过线性回归曲线计算相应的 EC_{50} 值。

辅助材料(Supporting Information) IR, HR-ESI-MS, 1D NMR 和 2D NMR 图谱, 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Xiao, P.-G.; Wang, F.-P.; Gao, F.; Yan, L.-P.; Chen, D.-L.; Liu, Y. *Acta Phytotaxon. Sin.* **2006**, *44*, 1 (in Chinese). (肖培根, 王锋鹏, 高峰, 闫路平, 陈东林, 刘勇, 植物分类学报, **2006**, *44*, 1.)
- [2] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, *Flora Reipublicae Populae Sinica*, Vol. 27, Science Press, Beijing, **1979**, p. 171 (in Chinese). (中国科学院植物所, 中国医学科学院药物所, 中国植物志, 科学出版社, 北京, **1979**, Vol. 27, p. 171.)
- [3] (a) Xu, W.-L.; Chen, C.; Shan, L.-H.; Gao, F.; Huang, S.; Zhou, X.-L. *Heterocycles* **2016**, *92*, 2059.
(b) Yue, J.-M.; Xu, J.; Zhao, Q.-S.; Sun, H.-D.; Chen, Y.-Z. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 277.
(c) Telnov, V. A.; Yunusov, M. S.; Abdullaev, N. D.; Zhamierashvili, M. G. *Khim. Prir. Soedin* **1988**, *4*, 556.
(d) Wei, X.-Y.; Wei, B.-Y.; Zhang, J. *Acta Bot. Sinica* **1996**, *38*, 995.
- [4] Shan, L.-H.; Zhang, J.-F.; Chen, L.; Wang, J.-X.; Huang, S.; Zhou, X.-L. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 2067.
- [5] Chen, L.; Shan, L.-H.; Xu, W.-L.; Zhang, J.-F.; Huang, S.; Zhou, X.-L. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 523.
- [6] Sayed, H. M.; Desai, H. K.; Ross, S. A.; Pelletier, S. W.; Aasen, A. J. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1595.
- [7] Wei, X.-Y.; Wei, B.-Y.; Zhang, J. *Acta Bot. Sin.* **1996**, *38*, 995 (in Chinese). (魏孝义, 韦璧瑜, 张继, 植物学报, **1996**, *38*, 995.)
- [8] Peng, C.-S.; Wang, J.-Z.; Jian, X.-X.; Wang, F.-P. *Nat. Prod. Res. Dev.* **2000**, *12*, 45 (in Chinese). (彭崇胜, 王建忠, 简锡贤, 王锋鹏, 天然产物研究与开发, **2000**, *12*, 45.)
- [9] Ross, S. A.; Pelletier, S. W.; Aasen, A. J. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1183.
- [10] Jiang, S.-H.; Zhu, Y.-L.; Zhu, R.-H. *Acta Pharm. Sin.* **1982**, *17*, 288 (in Chinese). (蒋山好, 朱元龙, 朱任宏, 药学报, **1982**, *17*, 288.)
- [11] De la Fuente, G.; Reina, M.; Valencia, E.; Rodriguez-Ojeda, A. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1109.
- [12] Vaisov, Z. M.; Bessonova, I. A. *Chem. Nat. Compd.* **1992**, *28*, 463.
- [13] Yunusov, M. S.; Yunusov, S. Y. *Chem. Nat. Compd.* **1970**, *6*, 334.
- [14] Wei, X.-Y.; Wei, B.-Y.; Zhang, J. *Chin. Tradit. Herbal Drugs* **1995**, *26*, 344 (in Chinese). (魏孝义, 韦璧瑜, 张继, 中草药, **1995**, *26*, 344.)
- [15] Hao, Z.-G.; Liu, J.-H.; Zhao, S.-X.; Miao, Z.-C. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3494.

- [16] Feng, F.; Liu, W.-Y.; Chen, Y.-S.; Ye, W.-C.; Liu, J.-H.; Zhao, S.-X. *J. Chin. Pharm. Univ.* **2003**, *34*, 17 (in Chinese).
(冯锋, 柳文媛, 陈优生, 叶文才, 刘静涵, 赵守训, 中国药科大学学报, **2003**, *34*, 17.)
- [17] (a) Gonzalez-Coloma, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; Castañera, P.; Gutierrez, C. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 1255.
(b) González-Coloma, A.; Terrero, D.; Perales, A.; Castañera, P.; Fraga, B. M. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 296.

(Lu, Y.)