农药学学报 2010,12(4):503 -506
Chinese Journal of Pesticide Science http://www.nyxxb.com.cn

·研究简报·

贵州乌头杀虫生物碱的研究

杨 宇, 刘吉平, 王明安*

(中国农业大学 应用化学系,北京 100193)

摘 要: 采用药典方法对贵州乌头 *Aconitum carmichaeli* 块根的粗总碱和纯化总碱进行了分析,粗总碱的质量分数为 0.928%,纯化总碱的质量分数为 0.683%,高于其他地区产乌头。通过萃取、硅胶柱层析、薄层制备和重结晶等方法从贵州乌头中分离得到 3 个主要生物碱,经熔点、电喷雾串联质谱(ESI-MS)及核磁共振等鉴定其分别为新乌头碱、次乌头碱和乌头碱。反相高压液相色谱分析显示,在贵州乌头中,新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的质量分数分别为 0.20%、0.10% 和 0.016%。

关键词: 贵州乌头; 生物碱; 结构鉴定; 定量分析

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.04.22

中图分类号: S482.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 1008-7303(2010)04-0503-04

Insecticidal alkaloids from *Aconitum carmichaeli* produced in Guizhou

YANG Yu, LIU Ji-ping, WANG Ming-an*

(*Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*)

Abstract: The crude and purified total alkaloid quantities of the *Aconitum carmichaeli* root collected in Guizhou Province were analyzed by the standard protocol in Chinese Pharmacopiea, which showed that the crude total alkaloid 0.928%, and the purified total alkaloid 0.683% are higher in quantity than *A. carmichaeli* produced in the other places. Three main alkaloids were isolated by solvent extract, silica gel chromatography, thin layer chromatography preparation, recrystallization, and they were identified as hypaconitine, mesaconitine and aconitine by m.p., ESI-MS, ^{1}H and ^{13}C NMR spectral data. The reverse HPLC analysis indicated that the quantities of mesaconitine, hypaconitine, and aconitine in Guizhou *Aconitum carmichaeli* are 0.20%, 0.10% and 0.016%, respectively.

Key words: *Aconitum carmichaeli*; alkaloid; structure elucidation; quantitative analysis

乌头属植物 *Aconitum* L. 是被子植物毛茛科 *Ranunculaceae* 中的一类重要植物,全球约有 350 种,分布于北半球温带地区,主要分布于亚洲,其次为欧洲和北美洲。我国已记录的乌头属植物约有 200 种,分布广泛,除海南外,台湾和大陆各省区都有分布[1]。乌头属植物既是一类重要的中药材,具有良好的抗炎、镇痛、抗心律失常等活性[2],也是一类重要的植物源杀虫剂,对桃蚜、菜青虫、甜菜夜蛾等田间害虫有良好的杀虫作用[3-7]。贵州省毕节地区自然条件得天独厚,气候适宜,富产乌头属植物贵州乌头 *Aconitum carmichaeli*。当地农民发现,将贵州乌头的粗粉施与田间,具有良好的杀蚊、驱蝇和杀虫作用。尽管国内外文献记载乌头属植物具有良好的农用杀虫、驱避、拒食活性,并对其活性成分进行了研

收稿日期: 2010-09-19; 修回日期: 2010-10-29.

作者简介: 杨宇(1984-),女,辽宁沈阳人,硕士研究生; * 通讯作者(Author for correspondence): 王明安(1965-),男,四川中江人,博士,教授,博士生导师,主要从事大环化合物及天然产物化学等的研究,电话: 010-62734093, E-mail: wangma@cau.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA10A209).

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究,取得了一定的成果[3-7],但有关贵州乌头杀蚊、驱蝇和杀虫作用的活性成分尚未见文献报道。为了充分开发利用贵州乌头资源,笔者对其化学成分总碱含量及其主要生物碱进行了分析,希望阐明贵州乌头杀蚊、驱蝇和杀虫作用的活性成分的化学结构、各成分在贵州乌头中的含量以及其他非生物碱化学成分的化学结构。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Yanagimoto 显微熔点仪(温度计未校正); Bruker DPX 300 MHz 核磁共振仪(以 $CDCl_3$ 为溶剂,TMS 为内标); Agilent 6890GC 5973I MSD GC-MS 联用仪; Agilent 1100 LC-MSD-Trap 液相色谱-质谱联用仪; 岛津 LC-20A 液相色谱仪。次乌头碱和乌头碱标样购于北京生物药品制品研究所,纯度大于 99%; 新乌头碱为本文提取并经质谱和核磁鉴定,纯度大于 98%。乙腈、甲醇为色谱纯,95% 乙醇、三乙胺(AR,二次重蒸)、乙醚(AR)购自北京化学试剂公司。

1.2 植物材料

贵州乌头块根产于贵州省大方县,由贵州毕节地区科技局提供,经中国农业大学农学院郭玉海教授鉴定为贵州乌头 *Aconitum carmichaeli*。

1.3 乌头总碱含量的测定

采用文献[8]的方法,分别测定两组数据。第一组按照药典用乙醚提取。精确称取粉末 10 g,加 50 mL 乙醚和 4 mL 氨试液(7%~8% 的氨水溶液),放置 24 h,过滤,滤渣加入 50 mL 乙醚,放置 24 h,过滤,药渣再用乙醚洗 4 次(每次 15 mL),过滤,合并滤液和洗液,减压浓缩。残余物用 5 mL 乙醚溶解并蒸干,加 5 mL 乙醇溶解,精确加入硫酸(0.011 2 mol/L) 15 mL、蒸馏水 15 mL、3 滴甲基红,用氢氧化钠(0.020 7 mol/L)滴定至黄色。每 1 mL 硫酸相当于 12.9 mg 乌头碱($C_{34}H_{47}NO_{11}$),生物碱以乌头碱计,所得结果记为粗总碱。第二组精确称取粉末 20 g,加 4 倍质量的 95% 乙醇(80 mL)浸泡 3 次(每次 7 d),合并滤液,减压浓缩,得粗浸膏。将粗浸膏分成两份(每份相当于 10 g 药材),用水稀释后,以硫酸调节 pH = 2; 过滤,滤液用石油醚洗一次,以稀氨水调节 pH = 9,再用等体积氯仿萃取 3 次,回收氯仿得残余物。残余物用 6 mL 乙醇溶解,再用上述滴定方法得到纯化后的生物总碱含量,记为纯化总碱。

1.4 乌头块根化学成分的分离及鉴定

取粉碎至约 60 目(筛孔径 200~300 μm)的块根粉末 560 g,用 95% 的乙醇 10 L 浸泡提取 3 次(每次浸泡 7 d),回收乙醇,将浓缩后的粗浸膏分散在1 000 mL 水中,依次用 400、400、300 mL 石油醚萃取,合并萃取液回收溶剂后得到石油醚相(**P1**)。水相以 5% 的硫酸调节 pH = 2,过滤,滤液放置 12 h。用氨试液调节滤液 pH = 9,以二氯甲烷萃取 5 次,每次500 mL。合并二氯甲烷相,减压脱溶,干燥得生物碱膏 4.26 g(**P2**)。

取 **P2** 浸膏 2 g,以 100~200 目(筛孔径 75~150 μm)中性氧化铝拌样,石油醚-氯仿 = 1∶1(体积比)湿法装柱[200~300 目(75~48 μm)中性氧化铝柱],以石油醚-氯仿-甲醇梯度洗脱,每 30 mL 收集一瓶,共收集到120 瓶,经薄层层析(TLC)(石油醚-氯仿 = 9∶1~1∶1,体积比)检测合并得到 7 个组份。组份 2 经 TLC 检测并用碘化铋钾显色为单点,从中析出无色透明晶体化合物 **1**(60 mg)。组份 4 约 40 mg 经硅胶薄层层析制备,以石油醚-乙酸乙酯-三乙胺 = 10 mL∶10 mL∶1 mL 作展开剂,分出 4 条色带,其中第三色带经 TLC 检测为单点,溶剂挥发后得到无色晶体化合物 **2**(8 mg)。组份 5 约 60 mg,以石油醚洗涤得固体约 40 mg,再分别用二氯甲烷-石油醚(2∶1,体积比)和甲醇重结晶,得到无色针状晶体化合物 **3**(10 mg)。组份 3 中析出无色晶体约60 mg,经硅胶 TLC 检测为 **1**、**2** 和 **3** 的混合物,未再进一步分离。

化合物 **1** 为无色晶体,m. p. 186~187℃(文献值 184~187℃[9])。ESI-MS: *m/z* 616 $[M+H]^+$,说明其相对分子质量为 615。^{1}H NMR($CDCl_3$, 300 MHz), δ: 1.38(s,3H), 2.34(s,3H), 3.12(d, J = 8.4 Hz,1H), 3.16(s,3H), 3.32(s,3H), 3.34(s,3H), 3.63(d, J = 8.4 Hz,1H), 3.73(s,3H), 3.90(s,1H), 3.98(d, J = 6.0 Hz,1H), 4.36(d, J = 3.0 Hz,1H), 4.47(dd, J = 5.4,3.0 Hz,1H), 4.88(d, J = 5.0 Hz,1H), 7.43~8.05(m,5H); ^{13}C NMR($CDCl_3$, 75 MHz), δ: 172.39, 166.12, 133.20, 129.94, 129.63, 128.61(C_6H_5CO), 92.01, 90.21, 85.14, 83.23, 80.22, 78.99, 78.88, 74.17, 62.21, 60.97, 59.06, 57.96, 56.54, 56.04, 49.99, 48.31, 44.61, 43.94, 42.59(NCH_3), 41.15, 39.33, 36.35, 34.93, 26.41, 21.41(CH_3CO)。与标准谱比较[9-11],确定其为次乌头碱(hypaconitine)。

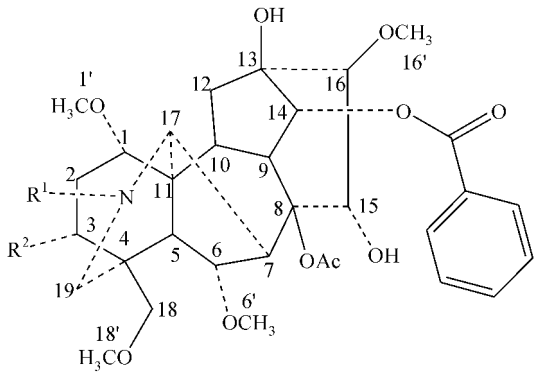
化合物 **2** 为无色晶体,m. p. 193~194 ℃(文献

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

值 188 ~ 190 ℃[10])。ESI-MS: *m/z* 632 [M + H]$^+$, 说明其相对分子质量为 631。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ: 1.47 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.62 (ABq, J = 9.0 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.76 (3.80 (m, 1H), 3.93 (s, 1H), 4.04 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 5.4, 3.0 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.44 ~ 8.05 (m, 5H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), δ: 172.43, 166.09, 133.31, 129.82, 129.63, 128.67 (C_6H_5CO), 91.81, 90.06, 83.21, 82.35, 78.98, 78.87, 76.37, 74.06, 71.17, 63.00, 61.09, 59.13, 57.99, 56.29, 50.03, 49.60, 45.81, 44.26, 43.81, 43.53, 42.40 (NCH_3), 40.85, 35.81, 33.92, 21.43 (CH_3CO)。与标准谱比较[9,11-12], 确定其为新乌头碱 (mesaconitine)。

化合物 3 为无色晶体, m. p. 202 ~ 203 ℃ (文献值 200 ~ 202 ℃[13])。ESI-MS: *m/z* 646 [M + H]$^+$, 说明其相对分子质量为 645。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ: 1.10 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.39 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.56 (ABq, J = 9.0 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.76 (3.80 (m, 1H), 3.94 (s, 1H), 4.04 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.38 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 5.4, 3.0 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.43 ~ 8.04 (m, 5H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), δ: 172.41, 166.09, 133.27, 129.84, 129.62, 128.64 (C_6H_5CO), 92.08, 90.02, 83.43, 82.39, 78.99, 78.94, 76.58, 74.07, 71.52, 61.12, 60.97, 59.11, 57.99, 55.89, 50.03, 48.91, 47.03, 46.90, 44.77, 44.25, 43.17, 40.93, 35.87, 33.67, 21.43 (CH_3CO), 13.32 (NCH_2CH_3)。与标准谱比较[9,11,13], 确定其为乌头碱 (aconitine)。

化合物 1 ~ 3 的结构式如 Scheme 1 所示。



1 hypaconitine　R^1=Me　R^2=H
2 mesaconitine　R^1=Me　R^2=OH
3 aconitine　R^1=Et　R^2=OH

Scheme 1

1.5　双酯型乌头生物碱的定量分析

高效液相色谱 (HPLC) 分析条件: Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.05% 三乙胺水溶液 (70∶30, 体积比) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 240 nm, 柱温 40 ℃。

样品溶液的制备: 精确称取乌头块根粉末 2.003 g, 置于磨口三角瓶中, 加入 4 mL 浓氨水润湿, 密闭 1 h, 加入乙醚 50 mL, 放置 24 h; 超声 8 min, 补加 10 mL 乙醚, 放置过夜; 过滤, 残渣用乙醚洗 3 次, 每次 15 mL, 合并滤液和洗涤溶液, 于 45 ℃水浴挥干乙醚。加入 80 mL 乙腈, 过 0.45 μm 滤膜, 冷藏备用。每个样品重复 3 次, 结果取平均值。

1.6　石油醚相 (P1) 和二氯甲烷相 (P2) 低极性组份 1 的 GC-MS 定性分析

GC-MS 分析条件: HP-5MS (0.25 mm × 30 m × 0.25 μm) 色谱柱, 前柱压 0.056 MPa; 进样口温度 270 ℃; 程序升温: 60 ℃保持 1 min, 以 10 ℃/min 升至 180 ℃, 保持 1 min, 再以 20 ℃/min 升至 280 ℃, 保持 25 min; 载气为氦气, 分流比 1∶50, 流量 1.0 mL/min; 进样量 1 μL (正己烷)。EI 电离源; 离子源温度 230 ℃; 四极杆温度 150 ℃; 电子能量 70 eV; 溶剂延迟 4.00 min; 质量扫描范围 30.0 ~ 550.0 amu; 全扫描方式。各组份峰用 NIST Library (2002 版) 质谱库进行检索定性。

2　结果与讨论

采用药典方法, 对贵州乌头生物总碱平行测定 3 次, 得粗总碱的质量分数为 0.928%, 纯化总碱的质量分数为 0.683%, 在各地区对比中属总碱含量较高者。从二氯甲烷相 (P2) 中分离得到 3 个主要化合物, 通过熔点、质谱以及与标准品对照的 TLC 和 HPLC 分析, 初步推断其分别为次乌头碱、新乌头碱和乌头碱。最后经 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 谱图与标准谱比较证实了这个推断。以甲醇-0.03% 三乙胺水溶液 (70∶30, 体积比) 为流动相进行 HPLC 分析发现, 3 种生物碱均能达到基线分离, 分离度 ≥ 1.5, 分离效果很好, 且无其他成分干扰。

采用上述测定方法绘制标准曲线, 得到回归方程, 发现新乌头碱、乌头碱、次乌头碱分别在 3.0 ~ 30.0、1.8 ~ 18.0、2.4 ~ 24.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数在 0.998 6 ~ 0.999 3 之间。在此

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基础上考察了分析方法的精密度等指标，3 种生物碱的 *RSD* 均在 0.36%～1.47% 之间，重现性 *RSD* 均在 0.36%～2.21% 之间，稳定性 *RSD* 均在 0.32%～3.92% 之间，添加回收率均在 93.1%～113.3% 之间，符合定量分析要求。在此基础上，用外标法分析测得贵州乌头中 3 种乌头生物碱的质量分数分别为：新乌头碱 0.20%、乌头碱 0.016%、次乌头碱 0.10%，其中新乌头碱和次乌头碱的含量较乌头碱高约 6～12 倍。

文献报道乌头属植物中的二萜生物碱是主要的杀虫、驱避、拒食活性成分，并深入讨论了其结构-活性关系[3-6]。许勇华等通过测试发现，乌头碱、次乌头碱和新乌头碱对甜菜夜蛾毒杀作用的 LC_{50} 值分别为 121.5、146.3 和 495.1 mg/L，且彼此间具有一定的增效作用，以胃毒、拒食、抑制生长作用为其主要作用方式[14]。由此可见，贵州乌头之所以具有良好的杀蚊、驱蝇和杀虫作用，主要是由于其所含多种二萜生物碱作用的结果。贵州乌头中总生物碱含量较高，且以对昆虫具有毒杀作用的双酯型乌头生物碱为主，3 种常见的生物碱中新乌头碱的相对含量最高，乌头碱最少，这可能与贵州西部高原地区的自然条件有关。最近李军等[15]研制了一种 7% 狼毒乌头碱白僵菌素悬浮剂，可以有效防治棉铃虫、小造桥虫、菜青虫以及各种蚜虫等，说明乌头类二萜生物碱具有较高的农业开发利用价值。

GC-MS 分析结果显示，本研究中的石油醚相(P1)主要化学成分为高级烷烃和烯烃，包括：十五烷、2,4-叔丁基苯酚、1-十六烯、十六烷、2,6,10-三甲基十五烷、2,6,7-三甲基癸烷、十七烷、2,6,10,14-四甲基十五烷、1-十八烯、十八烷、十九烷、1-二十烯、二十烷、二十一烷、1-二十二烯、二十二烷、二十三烷、二十四烷、二十五烷、二十六烷、1-二十六烯、2,6,10,14-四甲基十六烷、二十七烷、二十八烷等；二氯甲烷相(P2)低极性组份 1 中主要包括棕榈酸乙酯、亚油酸乙酯和硬脂酸乙酯。

谨以此文敬贺李正名院士八十华诞！

参考文献：

[1] FU Li-guo(傅立国). The Higher Plants in China: Vol. 3(中国高等植物：3 卷) [M]. Qingdao(青岛): Qingdao Press(青岛出版社), 2000: 404.

[2] ANGELA A. The effects of *Aconitum* alkaloids on the central nervous system [J]. *Progress in Neurobiology*, 1998, 56(2): 211-235.

[3] JENNINGS K R, BROWN D G, WRIGHT D P J. Methyllycaconitine, a naturally occurring insecticide with a high affinity for the insect cholinergic receptor [J]. *Experientia*, 1986, 42(6): 611-613.

[4] GONZALEZ-COLOMA A, VALENCIA F, MARTIN N, *et al*. Antifeedant delphinium diterpene alkaloids, structure-activity relationship [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(1): 286-290.

[5] ULUBELIN A, MERICLI A, KILINGER N, *et al*. Insect repellent activity of diterpenoid alkaloids [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(2): 170-171.

[6] AZUCENA G, MATIAS R, ALBERTO M, *et al*. Structural diversity and defensive properties of norditerpenoid alkaloids [J]. *J Chem Ecol*, 2004, 30(7): 1393-1408.

[7] LIU Chang-zhong(刘长仲), WANG Guo-li(王国利), KANG Tian-fang(康天芳). 苦豆子和乌头生物碱对桃蚜的毒力测定和防效试验 [J]. *Plant Protection*(植物保护), 2000, 26(6): 20-22.

[8] National Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Chinese Pharmacopoeia: Vol. 1(中华人民共和国药典：一部) [M]. Beijing(北京): Chemical Industrious Press(化学工业出版社), 2000: 29.

[9] REN Yu-lin(任玉琳), HUANG Zhao-hong(黄兆宏), JIA Shi-shan(贾世山). 蒙药草乌花中的三酯型二萜生物碱的分离与鉴定 [J]. *Acta Pharma Sinica*(药学学报), 1999, 34(11): 873-876.

[10] CHEN Hong-chao(陈洪超), WANG Xian-kai(王宪楷), ZHAO Tong-fang(赵同芳). 中坝鹅掌叶附子中的生物碱成分 [J]. *Nat Prod R & D*(天然产物研究与开发), 2003, 15(4): 324-340.

[11] PELLETIER S W, DJARMATI Z. Carbon-13 nuclear magnetic resonance: aconitine-type diterpenoid alkaloids from *Aconitum* and *Delphinium* species [J]. *J Am Chem Soc*, 1976, 98(9): 2626-2636.

[12] LI Cong-jun(李从军), CHEN Di-hua(陈迪华). 敦化乌头的二萜生物碱成分 [J]. *Nat Prod R & D*(天然产物研究与开发), 1992, 4(3): 36-38.

[13] CHEN Ying(陈瑛), DING Li-sheng(丁立生), WANG Ming-kui(王明奎). 拟玉龙乌头的二萜生物碱研究 [J]. *Zhongcaoyao*(中草药), 1996, 27(1): 5-8.

[14] XU Yong-hua(许勇华). Study on the extraction and insecticidal activities of alkaloids from Radix Aconiti(川乌中生物碱的提取及其杀虫活性研究) [D]. Huazhong Agricultural University(华中农业大学), 2007.

[15] LI Jun(李军), SUN Zhi-ying(孙志英), YUAN Su-qin(袁素琴), *et al*. Preparation of 7% septentrionaline-beauvericin pesticidal suspension(7%狼毒乌头碱白僵菌素悬浮剂及其生产方法): CN 1264541A [P]. 2000-08-30.

(责任编辑：金淑惠)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net