

Bisznorditerpén és norditerpén alkaloidok izolálása és lipoalkaloidok kimutatása az *Aconitum toxicumból*

CSUPOR Dezső,^a FORGÓ Péter,^a Eva Maria WENZIG,^b Rudolf BAUER,^b
CSEDŐ Károly^c és HOHMANN Judit^{a,1}

^aSzegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognózi Intézet, Eötvös u. 6., 6720 Szeged,

^bInstitute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, Karl-Franzens University Graz, Universitätsplatz 4, 8010 Graz, Ausztria

^cMarosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Farmakognózia Tanszék, Gh. Marinescu u. 38., 540139 Marosvásárhely, Románia

1. Bevezetés

Az *Aconitum* fajok (Ranunculaceae) jellegzetes szekunder anyagcseretermékei a C₂₀, C₁₉ és C₁₈ diterpénalkaloidok. A C₂₀ diterpénalkaloidok általában nem észterezettek, ritkán benzooesav vagy ecetsav monoészterként fordulnak elő a növényekben.¹ A C₁₉ alkaloidok az észterezettség foka és az észterező sav minősége szerint öt fő csoportra oszthatók: észterezetlen, monoészter-, diészter-, triészter-típusú és lipoalkaloidok. A C₁₉ alkaloidok általában aromás savakkal vagy ecetsavval észterezettek, a lipoalkaloidok C-8 helyzetben zsírsavésztercsoportot tartalmaznak.²⁻⁴ A C₁₈ bisznorditerpénalkaloidok C-4 helyzetben nem tartalmaznak észtercsoportot vagy monoészterek.⁵

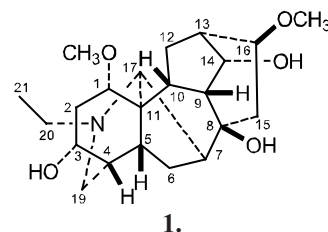
Az *Aconitum* fajokból azonosított alkaloidok többsége a C₂₀ és C₁₉ monoészter és diészter diterpénalkaloidok közé tartozik. A vegyületsorozat tagjai közül a diészter norditerpénalkaloidok rendelkeznek a legmarkánsabb élettani hatásokkal, mivel a feszültségfüggő Na⁺-csatorna aktiválása révén jelentősen befolyásolják a kardiovaszkuláris rendszer és a központi idegrendszer működését. A monoészter alkaloidok közül számos vegyület esetén feszültségfüggő Na⁺-csatornablokkoló hatást és antiaritmiás aktivitást írtak le.⁶ A legjelentősebb antiaritmiás hatással a C-4 helyzetben N-acetil-antranilsavval vagy antranilsavval észterezett C₁₈ bisznorditerpénalkaloidok bírnak (pl. lappakonitin).⁷ A monoészter norditerpénalkaloidok közé tartozó metil-lipakonitin az agyi α₇-típusú nikotinos acetilkolinreceptorok (nAChR) egyik legszelektívebb gátlója.⁸

Ázsiában számos *Aconitum* faj gyökerét és gumóját alkalmazzák a népi és tradicionális gyógyászat részeként. A növényi drogot általában speciális módon feldolgozva használják fel, amelynek célja a toxicitás csökkentése.⁹ Bár a mono- és diészter-típusú vegyületek farmakológiai jellemzői részletesen feltártak, a lipoalkaloidok gyógyhatásban, toxicitásában betöltött szerepét nem tanulmányozták behatóan. Ezek a vegyületek kémiaiilag stabilabbak, mint a diészter alkaloidok, amelyek nagy része elbomlik a gyökerek feldolgozása során. A lipoalkaloidok ezzel szemben nyers és feldolgozott *Aconitum* drogokból egyaránt kimutathatók.¹⁰ Az is ismert, hogy az akonitin-típusú diészter alkaloidokat a humán bélflóra részben lipoalkaloidokká alakítja át.¹¹

Korábbi közleményünkben norditerpénalkaloidok (akotoxinin, neolin és akonitin), valamint C₂₀ diterpénalkaloidok (szongorin és szongoramin) izolálásáról számoltunk be az *Aconitum toxicum* Rchb. gyökeréből.¹² Jelen közleményben a bisznorditerpénalkaloidok közé tartozó akotoxicin (**1**), delavakonitin, delavakonin, dolakonin és akonozin, valamint az észterezetlen norditerpénalkaloid, neolin izolálását és szerkezetük meghatározását mutatjuk be. Az **1** szerkezetét, beleértve relatív konfigurációját is, ¹H NMR, ¹³C JMOD, ¹H-¹H COSY, NOESY, HMQC és HMBC NMR módszerek, valamint HRESIMS mérések segítségével azonosítottuk. A növény gyökeréből ezen kívül 8 lipoalkaloidot (**2-9**) mutattunk ki LC-APCI-MSⁿ módszer alkalmazásával.

2. Eredmények

Az *A. toxicum* gyökeréből nyert kivonatot több lépéses kromatográfiás tisztításnak alávetve az **1** új vegyületet, valamint öt ismert alkaloidot nyertünk ki.

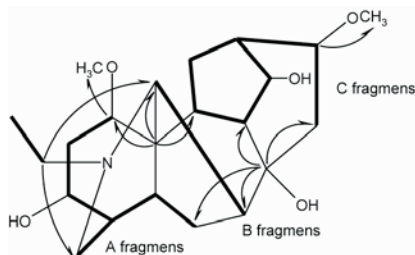


2.1. Az izolált alkaloidok szerkezet-meghatározása

Az **1** vegyület amorf, szilárd anyag, amelynek összegképletét nagy felbontású tömegspektrometriás méréssel határoztuk meg (C₂₂H₃₅NO₅, [M+H]⁺ m/z 393,2512 (számított m/z 393,2515)). A vegyület ¹H NMR spektrumában (**1. táblázat**) egy N-etil (δ_H 1,08 t (3H), 2,48 brm (2H)) és két metoxicsoport szignáljait (δ_H 3,27 s, 3,34 s) lehetett azonosítani. A ¹³C NMR spektrum elemzése megerősítette a fent említett szubsztituensek jelenlétét, és arra utalt, hogy a vegyület C₁₈ bisznorditerpén-alapvázú. A HSQC spektrum segítségével elkészítettük a protonált szénatomok jelhozzárendelését, ami azt igazolta, hogy a bisznorditerpénváz öt metilén- (δ_C 27,3,

*Levelező szerző. Tel.: 62-546453; fax: 62-545704; e-mail: hohmann@pharm.u-szeged.hu

28,5, 35,2, 39,3, 43,8), négy *O*-szubsztituált (δ_C 70,7, 75,5, 82,1, 84,3) és hét alkilszubsztituált metincsoportot (δ_C 38,1, 43,0, 44,2, 45,2, 45,8, 47,0, 62,9) tartalmaz. A ^{13}C JMOD spektrum alapján két kvaterner szénatomot (δ_C 47,9, 73,1) is azonosítottunk, amelyek a HSQC spektrumban nem adtak korrelációt. Az $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY spektrumban detektálható proton-proton kölcsönhatások segítségével (**1. táblázat**) három molekula-részszerkezetet: [-CH(OR)-CH₂-CH(OR)-C(CH₃)₂-CH-CH₂- (A fragmens), -CH-CH- (B fragmens) és -CH(OR)-CH-CH-CH₂-CH-CH(OR)-CH₂- (C fragmens) (R = H vagy CH₃) és egy etilcsoportot azonosítottunk (**1. ábra**).



1. Ábra. Az akotoxin (**1**) fontosabb $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (—) és HMBC (C→H) kölcsönhatásai.

Ezek molekulán belüli helyzetét, kapcsolódását és a szubsztituensek helyét a norditerpén-alapvázon heteronukleáris távolható korrelációk (HMBC) alapján határoztuk meg. A fragmensek és a C-8 és C-11 kvaterner szénatomok kölcsönhatásai segítségével azonosítható volt a bisznorditerpén-alapváz, a C-11 és H-1, H-10 és H-17, valamint a C-8 és H-6a, H-6b, H-7, H-9 és H-15 közötti HMBC kölcsönhatások fontos információkkal szolgáltak a szerkezet-felderítés során (**1. ábra**).

Szintén a HMBC spektrum elemzésével vált lehetővé a metoxycsoportok helyének meghatározása. Az alapvázban található δ_C 84,3 (C-1) és 82,1 (C-16) szénatomok δ_H 3,27 és 3,34 (mindkettő 3H) protonokkal adott távolható kölcsönhatásai a két metoxycsoport kapcsolódását a C-1 és C-16 szénatomokon jelölték ki. Az **1** összegképletét és a C-3, C-8, valamint a C-14 ^{13}C NMR kémiai eltolódásait figyelembe véve (δ_C 70,7, 73,1, illetve 75,5) két szekunder és egy terciér hidroxycsoport vált azonosíthatóvá, amelyek a C-3, C-8 és C-14 szénatomokon kapcsolódnak az alapvázhoz. A δ_C 49,6 metilén-szénatom (C-20) δ_H 3,08 (H-17) és 2,30 (H-19b) protonokkal adott kölcsönhatásai igazolták az *N*-etilcsoport alapvázhoz való kapcsolódásának helyét.

1. Táblázat. Az akotoxin (**1**) NMR spektroszkópiai adatai [500 MHz (^1H), 125 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm) ($J = \text{Hz}$)]

Helyzet	^1H	^{13}C	HMBC (C→H)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	NOESY
1	3,15 dt (9,9, 6,9)	84,3	OCH ₃ -1, 2, 10	2	2, 3, 5, 10
2	2,22 m (2H)	35,2	1	1, 3	1, 3, 1-OCH ₃
3	3,70 brd (10,7)	70,7	2, 19a, 19b	2, 4	1, 2, 4, 5
4	1,74 brs	44,2	2, 6 α , 6 β , 19a, 19b	3, 5, 19b	3, 6 β , 19a, 19b
5	1,79 m	43,0	6 α , 6 β , 17, 19a	4, 17 ^a , 6	1, 3
6 α	2,21 m	28,5	17	6 β , 5	17, 15 α
6 β	1,41 dd (14,3, 7,6)			6 α	4
7	2,20 m	45,8	5, 6 β , 15 α	17	
8	–	73,1	6 α , 6 β , 7, 9, 10, 14, 15 α , 15 β	–	–
9	2,28 m	47,0	7, 10, 12, 14, 15 α	10, 14	14
10	1,67 dd (13,8, 8,3)	45,2	1, 5, 9, 17	9, 12	1, 14
11	–	47,9	1, 2, 6 β , 6 α , 7, 10, 12, 17	–	–
12	1,83 m (2H)	27,3	9, 10	13	16, 1-OCH ₃ , 17
13	2,34 brs	38,1	9, 12, 15 α	12, 14, 16	14, 16-OCH ₃
14	4,15 t (4,0)	75,5	9, 12	9, 13, 16 ^a	9, 10, 13
15 α	2,43 dd (17,1, 8,6)	39,3	7, 9	15 β , 16	16, 17
15 β	2,07 d (17,1)			15 α , 16	16-OCH ₃
16	3,40 d (8,6)	82,1	12, 14, 15 α , 15 β , OCH ₃ -16	13, 14 ^a , 15 α , 15 β	12, 15 α
17	3,08 s	62,9	1, 5, 6 α , 7, 10, 19a, 20	5 ^a , 7	6 α , 12, 16, 15 α , 20, 21
19a	2,99 d (12,0)	43,8	3, 17	19b	4, 21
19b	2,30 m			19a, 4	4
20	2,48 brm (2H)	49,6	17, 19b, 21	21	17, 21
21	1,08 t (6,9)	13,5	20	20	17, 20, 19a
OCH ₃ -1	3,27 s	56,4	1	–	2, 12
OCH ₃ -16	3,34 s	56,4	16	–	13, 16, 15 β

^a J_{HH} csatolás.

A sztereogén központok relatív konfigurációját a NOESY spektrum segítségével vizsgáltuk meg. Kiindulási pontnak a C₁₉ and C₁₈ diterpénalkaloidok sztereokémiai jellemzői alapján a H-5 térállását β -nak tekintettük.³ A NOESY

spektrumban a H-5 és H-3; H-3 és H-1; H-3 és H-4; H-4 és H-6 β ; H-1 és H-10; H-10 és H-14; H-14 és H-9; H-14 és H-13 között volt megfigyelhető kölcsönhatás, ami ezen protonok β térállását igazolta. A H-6 α és H-15 α ; H-15 α és H-16; H-

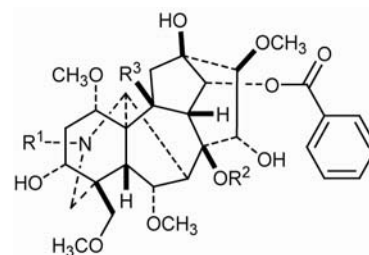
16 és H-17 között detektálható NOESY keresztcsúcsok az említett protonok α orientációjára utaltak. A fenti módszerek alkalmazásával meghatároztuk az elsőként általunk leírt **1** vegyület szerkezetét, amelynek az akotoxin triviális nevet adtuk. A mért és az irodalomban található spektroszkópiás adatok segítségével további öt, a növényből izolált, korábban már ismert alkaloidot (delavakonitin,¹³ delavakonin,¹³ dolakonin,¹³ akonozin¹³ és neolinin¹⁴) azonosítottunk. Utóbbi négy alkaloid esetén elsőként közöltük a vegyületek teljes ¹H és ¹³C jelhozárrendelését, ezzel a korábban közölt ¹H NMR adatokat^{13,14} kiegészítettük (**3. táblázat**). 2D NMR vizsgálatok segítségével továbbá megállapítottuk, hogy a neolinin C-10 és C-13 szénatomjainak ¹³C NMR asszignációját korábban tévesen, felcserélve közölték.

2.2. Lipoalkaloidok azonosítása

Az *A. toxicum* kivonatának lipofil frakcióiban további, alkaloid-típusú vegyületeket mutattunk ki HPLC-MS-sel, amelyeket azonban nagyon kis mennyiségük miatt nem lehetett preparatív módszerekkel tiszta formában kinyerni. Korábbi vizsgálatok során ESIMS módszerrel, protonált molekulaionjaik $[M+H]^+$ és fragmentációjuk tanulmányozásával azonosítottak lipoalkaloidokat.^{10,15-17} Az *A. toxicum* gyökerének metanolos kivonatát APCI-MSⁿ módszerrel, pozitív kémiai ionizációval vizsgáltuk. Az m/z 800-900 tartományban detektált ionok protonált lipoalkaloid molekuláknak feleltethetők meg, ezek retenciós ideje 35-40 perc volt.

A vegyületek MSⁿ analízise további, a szerkezetfelderítés szempontjából diagnosztikus értékű információkkal szolgált. Az *Aconitum* fajokból ez idáig azonosított összes lipoalkaloid a C-8 helyzetben zsírsavésztercsoportot tartalmaz. A zsírsavak könnyen eliminálhatók electrospray vagy kémiai ionizációval. A C-8 a molekula aktív centruma, ezért az alkaloidok MS² spektrumában a fő fragmension az $[M+H-RCOOH]^+$.¹⁶ A semleges tömegvesztés alapján azonosítható az észterező zsírsav, a fő fragmension segítségével pedig

meghatározható a molekula alapszerkezete (**2. táblázat**). A m/z 572, 586 és 588 leányionok MS³ spektrumát az irodalmi adatokkal összevetve 14-benzoil-mezakonin, 14-benzoil-akonin és 10-hidroxi-14-benzoil-mezakonin szerkezetet azonosítottunk.^{10,16} Az MS³ spektrumban megjelenő m/z 512, 526 és 528 fő fragmensionok CO és CH₃OH fragmensek lehasadásának eredményeként figyelhetők meg.¹⁷ Vizsgálataink során az *A. toxicum* gyökeréből nyolc lipoalkaloidot, a 14-benzoil-mezakonin-8-linolenátot (**2**), a 14-benzoil-mezakonin-8-linoleátot (**3**), a 14-benzoil-mezakonin-8-palmitátot (**4**), a 14-benzoil-mezakonin-8-pentadecenoátot (**5**), a 14-benzoil-mezakonin-8-mirisztátot (**6**), a 14-benzoil-akonin-8-nonadecenoátot (**7**), a 14-benzoil-akonin-8-linoleátot (**8**) és a 10-hidroxi-14-benzoil-mezakonin-8-linoleátot (**9**) azonosítottuk



	R ¹	R ²	R ³
2	CH ₃	linn	H
3	CH ₃	lin	H
4	CH ₃	pal	H
5	CH ₃	pen	H
6	CH ₃	mir	H
7	C ₂ H ₅	non	H
8	C ₂ H ₅	lin	H
9	CH ₃	lin	OH

pen: pentadecenoát; mir: mirisztát; non: nonadecenoát; linn: linolenát; lin: linoleát; pal: palmitát.

2. Táblázat. Az *A. toxicum* gyökeréből azonosított lipoalkaloidok.

Vegyület	molekulaion $[M+H]^+$ (m/z)	semleges tömegvesztés (Da)	leányion $[M+H]^+$ (m/z)
14-benzoil-mezakonin-8-linolenát (2)	850	278	572
14-benzoil-mezakonin-8-linoleát (3)	852	280	572
14-benzoil-mezakonin-8-palmitát (4)	828	256	572
14-benzoil-mezakonin-8-pentadecenoát(5)	812	240	572
14-benzoil-mezakonin-8-mirisztát (6)	800	228	572
14-benzoil-akonin-8-nonadecenoát (7)	882	296	586
14-benzoil-akonin-8-linoleát (8)	866	280	586
10-hidroxi-14-benzoil-mezakonin-8-linoleát (9)	868	280	588

3. Kísérletes rész

Az optikai forgatóképességet Perkin-Elmer 341 polariméterrel mértük. Az NMR spektrumokat CDCl₃-ban, Bruker Avance DRX 500 spektrométerrel, 500 MHz (¹H) és 125 MHz (¹³C) térerőn vettük fel, az oldószer jelét véve referenciaként. A 2D adatok feldolgozását standard Bruker

szoftverrel végeztük. Az ¹H-¹H COSY, NOESY, HSQC és HMBC mérésekhez gradiens technikákat alkalmaztunk. A HRMS méréseket egy Cs SIMS ionforrással felszerelt VG ZAB SEQ hibrid tömegspektrométeren végeztük, 10000-es felbontás mellett. A metanolban oldott mintákat glicerinnel mátrixban mértük. Az oszlopkromatográfiás elválasztáshoz poliamid (ICN Polyamide for Column Chromatography)

és Al_2O_3 (Aluminiumoxid neutral, Brockmann II, Reanal) állófázist alkalmaztunk. A preparatív rétegekromatográfiás elválasztást 20×20 cm-es szilikagél lemezeken (Kieselgel 60 F_{254} , Merck) végeztük, elúcióhoz CHCl_3 -MeOH 9:1 elegyét alkalmaztuk. A centrifugális rétegekromatográfiás elválasztást (centrifugal planar chromatography, CPC) Chromatron készüléken (Model 8924, Harrison

Research), 2 mm rétegvastagságú szilikagél (Kieselgel 60 GF_{254} , Merck) és Al_2O_3 (Aluminiumoxid G (Typ E), Merck) lemezeken végeztük. Az egyes kromatográfiás lépéseket rétegekromatográfiával, szilikagél lemezen (Merck 5715) ellenőriztük, előhívásra Dragendorff-reagenst vagy conc. H_2SO_4 -t, majd hevítést alkalmazva.

3. Táblázat. Az A. toxicumból izolált vegyületek ^1H NMR spektrumának adatai [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), (J = Hz)].

Helyzet	delavakonin	dolakonin	akonozin	neolinin
1	3,09 dd (10,9, 6,6)	3,13 dd (10,3, 6,6)	3,10 dd (9,4, 7,7)	3,69 s
2a	1,94 m	1,93 m	1,93 m	1,60 m
2b	2,16 m	2,20 m	2,15 m	1,50 m
3a	1,42 m	1,46 brt (13,0)	1,40 brt (13,0)	1,68 m
3b	1,75 m	1,80 m	1,75 m	1,68 m
4	1,69 m	1,66 brs	1,68 m	–
5	1,75 m	1,75 m	1,73 m	2,17 d (6,3)
6a	2,04 dd (13,2, 6,6)	2,10 m	2,14 m	4,23 m (1H)
6b	1,35 m	1,34 dd (14,5, 7,9)	1,32 dd (14,5, 7,8)	
7	2,22 m	2,20 m	2,18 m	2,02 s
9	2,42 m	2,33 t (5,6)	2,29 t (5,4)	2,21 t (6,0)
10	1,86 m	1,83 m	1,70 m	1,89 m
12a	2,20 m	2,07 m	1,83 m	2,05 m
12b	1,93 d (11,5)	1,94 m	1,75 m	1,74 dd (14,6, 5,0)
13	–	2,60 m	2,34 m	2,30 t (5,9, 6,8)
14	4,02 m	4,83 t (4,8)	4,15 t (5,0)	4,23 m
15a	2,51 dd (17,3, 9,0)	2,40 dd (16,1, 9,5)	2,43 dd (17,5, 8,6)	2,39 dd (15,9, 9,2)
15b	2,27 d (17,3)	1,90 m	2,07 d (17,5)	2,05 m
16	3,44 d (7,2)	3,20 dd (9,4, 4,8)	3,40 brd (8,6)	3,39 m
17	3,12 s	2,93 s (1H)	3,10 s	2,71 s (1H)
18a	–	–	–	3,72 d (10,7)
18b	–	–	–	3,52 d (10,7)
19a	2,61 d (11,5)	2,70 brd (10,5)	2,60 brd (11,4)	2,72 d (10,6)
19b	2,47 m	2,52 m	2,49 m	2,33 d (10,6)
20a	2,49 m	2,53 m (2H)	2,49 m (2H)	2,58 dq (12,4, 7,2)
20b	2,40 m			2,51 dq (12,4, 7,2)
21	1,07 t (7,2) (3H)	1,07 t (7,1) (3H)	1,06 t (7,1) (3H)	1,14 t (7,1) (3H)
1-OCH ₃	3,26 s	3,23 s	3,34 s*	–
6-OCH ₃	–	–	–	3,39 s
16-OCH ₃	3,43 s	3,27 s	3,27 s*	3,35 s
14-OAc	–	2,05 s	–	–
13-OH	4,02 m			

*felcserélhető szignálok

Az *Aconitum toxicum* gyökerét Maroshévíz mellett, Romániában, 2002 augusztusában gyűjtöttük be. A növényi mintát Prof. Csedő Károly (Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Farmakognózia Tanszék) azonosította. A növény mintapéldánya a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziái Intézetének herbáriumában található meg 655. nyilvántartási számmal.

3.2. Diterpénalkaloidok izolálása

Az *Aconitum toxicum* szárított, majd ledarált gyökerét (950 g) CHCl_3 -MeOH 9:1 arányú elegyével vontuk ki. A kivonat kromatográfiás tisztítására a diterpén-alkaloidok esetén új, pH-változtatás nélküli, az esetleges bomlás, műtermékképződés esélyét csökkentő elválasztási módszert

dolgoztunk ki. A kivonatot oszlopkromatográfiával, poliamid szorbens alkalmazásával tisztítottuk (CC I.) a klorofill és a fenolos vegyületek eltávolítása céljából, 20%-os és 40%-os MeOH-lal végezve az eluálást. A 20%-os MeOH-lal eluált, alkaloidokban gazdag frakciót Al_2O_3 állófázison újabb oszlopkromatográfiás elválasztásnak vetettük alá (CC II), ciklohexán- CHCl_3 -MeOH növekvő poleritású elegyét alkalmazva eluensként.

A CC II elválasztás során ciklohexán- CHCl_3 5:2 elegyével nyert frakciót több lépésben frakcionáltuk CPC alkalmazásával Al_2O_3 és szilikagél szorbenseken ciklohexán-EtOAc-EtOH grádiens elúció alkalmazásával, ami az akonozin tiszta formában történő kinyeréséhez vezetett (15,0 mg). A CPC elválasztásból származó frakciók preparatív rétegekromatográfiás tisztításával (szilikagél TLC; mozgófázis: toluol-aceton-EtOH-cc. NH_3 80:20:7:3) izoláltuk a delavakonint (25,3 mg) és a dolakonint (30,0 mg). A CC II elválasztás során ciklohexán- CHCl_3 5:3 elegyével nyert frakciót CPC-vel (szilikagél; ciklohexán-EtOAc-EtOH grádiens), majd preparatív rétegekromatográfia alkalmazásával (szilikagél; toluol-aceton-EtOH-cc. NH_3 , 70:50:16:4,5), tisztítottuk, amelynek eredményeként az akotoxincint nyertük ki (8,2 mg). A CC II elválasztás során ciklohexán- CHCl_3 -MeOH 50:30:1 elegyével eluált frakciót CPC-vel (szilikagél; ciklohexán-EtOAc-EtOH grádiens), majd preparatív rétegekromatográfiával (szilikagél; toluol-aceton-EtOH-cc. NH_3 , 70:50:16:4,5) tisztítva izoláltuk a delavakonint (2,0 mg) és a neolinint (15,1 mg).

Akotoxicin (1): amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{26.5} +7$ (c 0,05, CHCl_3); ^1H és ^{13}C NMR adatok: lásd **1. táblázat**; HRESIMS: m/z 393.2512 ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_5$ számított $[\text{M}+\text{H}]^+$ 393,2515).

Delavakonitin: amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{27} -25$ (c 0,1, CHCl_3); ^1H NMR és ^{13}C NMR (CDCl_3) adatok megegyeznek a Niitsu és mtsai.¹³ által közltekkel.

Delavakonin: amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{27} +5$ (c 0,1, CHCl_3); ^1H NMR adatok: lásd **3. táblázat**; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) adatok megegyeznek a Niitsu és mtsai.¹³ által közltekkel.

Dolakonin: amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{27} +2$ (c 0,01, CHCl_3); ^1H NMR adatok: lásd **3. táblázat**; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) adatok megegyeznek a Niitsu és mtsai.¹³ által közltekkel.

Akonozin: amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{27} -12$ (c 0,2, CHCl_3); ^1H NMR adatok: lásd **3. táblázat**; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) adatok megegyeznek a Niitsu és mtsai.¹³ által közltekkel.

Neolinin: amorf, szilárd anyag; $[\alpha]_D^{27} +17$ (c 0,1, CHCl_3); ^1H NMR adatok: lásd **3. táblázat**; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 12,3 (C-21), 29,3 (C-12), 29,7 (C-2), 29,8 (C-3), 39,0 (C-4), 40,2 (C-13), 42,8 (C-15), 44,2 (C-10), 47,1 (C-5), 48,3 (C-9), 48,5 (C-20), 49,7 (C-11), 51,6 (C-7), 56,3 (OMe-16), 56,7 (C-19), 57,9 (OMe-6), 63,9 (C-17), 71,2 (C-18), 72,1 (C-1), 74,0 (C-8), 75,9 (C-14), 81,7 (C-16), 82,5 (C-6).

3.2. A lipoalkaloidok LC-APCI-MSⁿ vizsgálata

1 g darált *A. toxicum* gyökeret szobahőmérsékleten 3×15 percig 3×20 mL MeOH-val vontunk ki ultrahangos fürdőben. A szűrt, bepárolt kivonatot 2 ml MeOH-ban oldottuk, majd ebből 20 μl -t vizsgáltunk LC-MS módszerrel. A kromatográfiás elválasztást Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6×150 mm, 5 μm) oszlopon, 10 mM NH_4OAc puffer (pH 8,9) és MeOH grádiensével (0 perc: puffer-MeOH 60:40; 35 perc: puffer-MeOH 5:95; 36 perc: puffer-MeOH 5:95; 42 perc: puffer-MeOH 60:40; 45 perc: puffer-MeOH 60:40) végeztük, 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva. A tömegspektrometriás analízist Thermo Finnigan Surveyor LC-hez csatolt LCQTM Deca XP^{PLUS} detektorral végeztük APCI pozitív ionizációval.

4. Összefoglalás

A lipoalkaloidokat, az **1** diterpénalkaloidot és az öt ismert vegyületet elsőként mutattuk ki az *A. toxicum*-ból. Az akotoxicin (**1**), a delavakonin, az akonozin és a neolinin észtercsoportot nem tartalmazó alkaloidok, és feltehetőleg a biogenezis első lépéseinek termékei. A dolakonin és az akonozin csak négy oxigénfunkciót tartalmaz, ami nagyon ritka a C_{18} diterpénalkaloidok körében. A biogenetikailag rokon vegyületsorozatra tartozó bisznorditerpénalkaloidok kemotaxonomiai jelentőséggel bírnak, mivel meglehetősen ritkán fordulnak elő a növényvilágban. Lipoalkaloidok azonosítására első alkalommal alkalmaztunk APCI-MSⁿ módszert. A növényből izolált alkaloidokkal ellentétben a **2-6** és **9** lipoalkaloidok *N*-etil- helyett *N*-metilcsoportot tartalmaznak. Ez a tény, valamint a C-10 szénatomhoz kapcsolódó hidroxicsoport jelenléte a **9** vegyületben rámutat a lipoalkaloidok nagyfokú szerkezeti változatosságára.

Köszönetnyilvánítás.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA T038390), a Richter Gedeon Centenáriumi Alapítvány és a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj támogatta. Köszönettel tartozunk Dr. Szabó Pálnak (MTA Kémiai Kutatóközpont, Budapest) a HRMS mérések elvégzéséért.

Hivatkozások

1. Wang, F. P.; Liang, X. T. In *The Alkaloidok*; Cordell, G. A., szerk.; Academic Press: New York, **2002**; Vol. 59, Chapter 1, pp 1-280.
2. Kitagawa, I.; Yoshikawa, M.; Chen, Z. L.; Kobayashi, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 758-761.
3. Pelletier, S. W.; Mody, N. V.; Joshi, B. S.; Schramm, L. C. In *Alkaloidok: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier, S. W., szerk.; John Wiley & Sons: New York, **1984**; Vol. 2, pp 205-462.
4. Teuscher, E.; Lindequist, U. *Biogene Gifte – Biologie, Chemie, Pharmakologie*; Gustav Fischer Verlag: Stuttgart - Jena - New York, **1994**; pp 517-523.
5. Sultankhodzhaev, M. N.; Nishanov, A. A. *Chem. Nat. Compd.* **1995**, *31*, 283-298.

6. Ameri, A. *Prog. Neurobiol.* **1998**, *56*, 211-235.
7. Wright, S. N. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 183-192.
8. Alkondon, M.; Pereira, E. F. R.; Wonnacott, S.; Albuquerque, E. X. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 802-808.
9. Bisset, N. G. *J. Ethnopharmacol.* **1981**, *4*, 247-336.
10. Wang, Y.; Shi, L.; Song, F. R.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 279-284.
11. Kawata, Y.; Ma, C. M.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Wang, H.; Hattori, M.; Namba, T.; Satoh, K.; Kurashiki, Y. *Wakan Iyakugaku Zasshi* **1999**, *16*, 15-23.
12. Csupor, D.; Forgo, P.; Csedő, K.; Hohmann, J. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2981-2986.
13. Niitsu, K.; Ikeya, Y.; Mitsuhashi, H.; Siying, C.; Huiling, L. *Heterocycles* **1990**, *31*, 1517-1524.
14. Ross, S. A.; Desai, H. K.; Pelletier, S. W. *Heterocycles* **1987**, *26*, 2895-2904.
15. Sun, W. X.; Song, F. R.; Cui, M.; Liu, S. Y. *Planta Med.* **1999**, *65*, 432-436.
16. Wang, Y.; Liu, Z. Q.; Song, F. R.; Liu, S. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 2075-2082.
17. Wang, Y.; Song, F. R.; Xu, Q. X.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 962-970.

Isolation of bisnorditerpene and diterpene and identification of lipoalkaloids from *Aconitum toxicum*

From the roots of *Aconitum toxicum*, acotoxicine (**1**), a new bisnorditerpene alkaloid, was isolated together with the structurally related delavaconitine, delavaconine, dolaconine, aconosine, and the norditerpene alkaloid, neolinine. The structure of compound **1**

was elucidated by spectroscopic data interpretation. Further, eight lipo-alkaloids (**2-9**) were detected in the plant material by LC-APCI-MSⁿ analysis. This is the first report of a C₁₈ bisnorditerpene alkaloid, and lipo-alkaloids from *A. toxicum*.