

湖北中医学院

硕士学位论文

缬草抗心律失常活性成分及血清药物化学研究

姓名：龚占峰

申请学位级别：硕士

专业：中药学

指导教师：刘焱文

20090530

中文摘要

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 系败酱科 (Valerianace) 缬草属 (Valerian) 植物, 为传统中药, 收载于 2005 年版《中华人民共和国药典》, 具有镇静安神、解痉止痛之功效。现代药理研究表明, 缬草提取物具有抗心律失常的活性作用。本论文通过多学科交叉的研究方法, 对缬草抗心律失常的活性成分及血清药物化学进行了研究。

采用超临界 CO₂ 萃取法和溶剂法, 将缬草提取分离为缬草油部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水溶液部位; 以抗心律失常和降低室颤发生率为药理筛选指标, 对缬草提取分离各部位进行了活性筛选研究。研究表明, 其水溶液部位和缬草油部位能显著对抗氯仿诱发的小鼠心律失常, 并降低室颤发生率; 水溶液部位和正丁醇萃取部位具有显著对抗乌头碱诱发的大鼠室性心律失常作用。进一步通过大孔吸附树脂纯化技术分离正丁醇萃取物与水溶液合并后的水溶性部位, 收集不同浓度的乙醇洗脱液, 经药理实验筛选, 90%乙醇洗脱组分能显著对抗氯仿诱发的小鼠心律失常和降低室颤发生率, 从而确定其为活性成分较集中的最终有效部位。

采用硅胶柱色谱、凝胶渗透色谱及制备高效液相色谱等分离技术, 从有效部位分离得到了 11 个单体成分, 通过 IR、NMR、MS 等波谱技术鉴定了其中的 8 个化合物, 分别为: 绿原酸 (Chlorogenic acid) (I)、咖啡酸 (caffeic acid) (II)、青刺尖木脂醇苷 (prinsepiol-4-0-β-D-glucoside) (III)、(+)-8-羟基-松脂素-4'-0-β-D-葡萄糖吡喃糖苷 [(+)-8-Hydroxypinoresinol-4'-0-β-D-glucopyranoside] (IV)、(+)-8-羟基-松脂素-4-0-β-D-葡萄糖吡喃糖苷 [(+)-8-Hydroxypinoresinol-4-0-β-D-glucopyranoside] (V)、8-羟基松脂醇苷 (8-hydroxypinoresinol-4-0-β-D-glucoside) (VI)、(+)-8-羟基-松脂素 [(+)-8-Hydroxypinoresinol] (VII)、山奈酚

(Kaempferol) (VIII)。这 8 个单体化合物的抗心律失常活性正在筛选中。

采用顶空固相微萃取-气相联用技术的分析方法，对缬草萃取物的化学成分进行了分析研究。研究表明，固相微萃取对缬草特定成分提取效果良好，气相色谱分离度高，重现性好，从而为中药有效成分研究探索了一种新的分析方法。

对缬草各提取分离部位进行了血清药物化学研究，采用优选后的顶空固相微萃取及气相联用方法，比较研究了缬草全药顶空固相微萃取成分与各提取部位血清中的成分，两者色谱峰难以找到对应关系，但在乙酸乙酯部位血清中出现明显新代谢产物峰，提示缬草抗心律失常的活性物质可能为其代谢产物。这对于探讨缬草抗心律失常活性物质具有重要的参考意义。

主题词： 缬草；抗心律失常；化学成分；顶空固相微萃取；血清药物化学

Study on the Anti-arrhythmia Effective Substances and Serum Pharmacochemistry of *Valeriana officinalis* L.

Speciality: Chinese Traditional Medicine

Author: Gong Zhanfeng

Tutor: Liu Yanwen

ABSTRACT

Valeriana officinalis L. was a herbal traditional Chinese medicine belongs to the family of Valerianace which was long used to treat illness such as disquiet, insomnia and aches of various kind, and it has been written into <Chinese Pharmacopoeia of 2005>. Modern research shows that, it has a great potential capability of curing cardiac arrhythmia.

We separated the medicinal materials into oil, ethyl acetate extract, n-BuOH extract, water-extract. Pharmacological method was adopted to compare effect of different extracts. The result shows that the water-extract and oil have obvious anti-arrhythmia effect induced by trichloromethane and the water-extract and the n-BuOH extract have obvious anti-arrhythmia effect induced by aconitine. Then we merged the n-BuOH-extract and water-extract together and separated it with different consistency of ethanol on the Macfotericulf resin. The 90%-ethyl part shows good anti-arrhythmia effect induced by trichloromethane, so we defines it as the most effective part.

The methods of solvent and chromatography were used to get

11 monomeric compounds from the 90%-ethyl part, and 8 of them were elucidated by spectroscopic spectrum as Chlorogenic acid(I)、Caffeic acid(II)、prinsepiol-4-O- β -D- glucoside (III)、(+)-8-Hydroxypinoresinol-4'-O- β -D- glucopyranoside (IV)、(+)-8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D- glucopyranoside (V)、8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-glucoside(VI)、(+)-8-Hydroxypinoresinol(VII)、Kaempferol(VIII). The anti-arrhythmia effect of the 8 compounds is still screening.

The Headspace Solid Phase Micro-extraction and Gas Chromatography (HS-SPME-GC) technology was adopted to analyse the composition of *Valeriana officinalis* L. HS-SPME-GC method gives us a new analytic method which shows a good capability of composition-extraction, Gas Chromatography also has good credibility and stability.


The best condition of HS-SPME-GC was adopted in the Serum Pharmacochemistry study of different extracts and their serum sample. There is little similarities between the extract and the serum sample, so that the metabolized products may be effective substances. The research provided certain scientific parameter of anti-arrhythmia effective substances of Valerian.

KEY WORDS:

Valeriana officinalis L; anti-arrhythmia; chemical constituents; HS-SPME-GC; SPC

湖北中医学院学位论文原创性声明

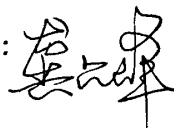
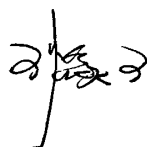
本人声明： 所呈交的学位论文是在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖北中医学院或其他单位的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：
2009年6月2日

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解湖北中医学院有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其他手段保留学位论文；学校可以根据国家或湖北省有关部门的规定送交学位论文。同意《中国优秀博硕士论文全文数据库出版章程》的内容。

(保密论文在解密后遵守此规定)

论文作者签名： 导师签名： 2009年6月2日

前 言

现代社会生活压力的增大及饮食结构的转变使得心脑血管疾病成为了威胁全球人类健康的三大疾病之一，其发病率和死亡率位居首位。临床用于治疗心脑血管疾病的大多为化学药物，但存在着毒副作用大、耐用性强、价格昂贵等弊端。因此，在中医药理论指导下，开发研究有效治疗心脑血管疾患的中药新品种，是从事中医药研究的科学工作者的重大课题。

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 系败酱科缬草属多年生草本植物，为传统常用中药，具有镇静安神、解痉止痛之功效，临床用于治疗心神不安、心悸失眠、癫狂、藏燥；风湿痹痛、腕腹胀痛、痛经、经闭以及跌打损伤等。现代药理研究表明，缬草具有显著抗心律失常的作用，美国食品药品监督管理局认定缬草属于安全性强、毒副作用较小，因此将缬草开发为抗心律失常的中药新品种具有广阔的前景。

为了探讨缬草抗心律失常的物质基础，本省级重点实验室于 2005 年申请了国家自然科学基金课题“缬草抗心律失常活性成分研究”。本论文按照预期的研究目标，在药理试验跟踪下，对缬草抗心律失常的活性物质进行了系统研究，取得了预期的研究成果。初步阐释了缬草抗心律失常的药效物质基础，从而为将缬草开发为抗心律失常药物奠定了一定基础。

第一章 抗心律失常药物及缬草属药用植物的研究进展

缬草 (*Valeriana officinalis* L) 系败酱科缬草属多年生草本植物, 分布于世界各地, 欧洲于 16 世纪便开始应用缬草, 是历史最古老的药用植物之一。缬草具有镇静安神、解痉止痛之功效。现代药理学研究表明, 缬草具有多方面生物活性。由于缬草良好的应用前景, 引起了国内外学者的广泛关注, 因此其研究资料涉及各个领域。

1 生药学研究

败酱科缬草属 (*Valeriana*) 植物全世界约 250 余种, 主要分布于温带地区, 我国有缬草属植物 17 个种和 2 个变种, 主产于西南、西北和东北地区^[1]。除缬草外, 还有以下同属植物的根及根茎亦作“缬草”入药。

湖北西部巴东、鹤峰、利川、五峰等县市有大面积野生缬草资源; 四川、重庆、云南、贵州等省区为蜘蛛香的主产地; 黑水缬草主要分布于东北东部山区、小兴安岭、大兴安岭地区和山东胶东山区、丘陵地; 宽叶缬草的野生资源分布于我国东北至西南, 分布地区与缬草基本相近^[2]。除此四种常见缬草外, 还有细花缬草、毛节缬草、长序缬草等分布也有报道^[3]。

2 化学成分

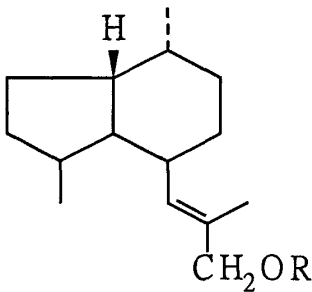
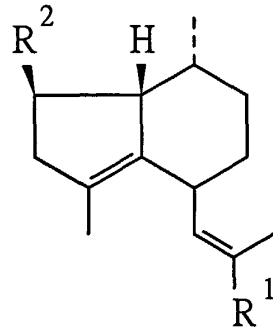
缬草的主要化学成分为萜类中的单萜、倍半萜、环烯醚萜以及木脂素、生物碱和黄酮等成分。缬草根部分含有较多的环烯醚萜与倍半萜, 其中倍半萜和其他单萜类成分多位于根部的挥发油中, 绝大部分生物碱与黄酮存在于缬草地上部分^[3]。

2.1 挥发油成分

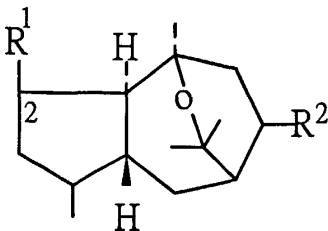
挥发油为缬草化学成分的重要组成部分。目前, 国内外对该属 10 多个植物品种的挥发油成分进行了分析研究, 共鉴定了其中的 60 多个成分, 主要为单萜和倍半萜。龙脑 (borneol)、异戊酸酯及乙酸龙脑酯为其中含量最大的几种成分; 倍半萜类成分以缬草烯酸 (valerenic acid)、缬草酮 (valeranone)、缬草萜醇酸 (valerenolic acid)、缬草烯醛 (valerenal)、valeracetate 等为主, 这类成分也是缬草众多药理活性的有效成分^[3]。

黄龙等^[4]利用 GC 和 GC/MS 对缬草油的化学成分进行了分析, 共鉴定出 65 种化合物, 其中三环烯、芳樟醇、马鞭草烯酮、 δ -榄香烯、2,3,4-可力丁、 α -小茴香烯、 α -萜澄茄油烯、白菖油烯、1,2,9,10-四氢马兜铃烯、对孟三烯、环异长叶烯、9,10-二氢异长叶烯、大根香叶烯 D、 δ -杜松烯、大根香叶烯 B、大花桉油醇、异大花桉油醇、 α -杜松醇、T-杜松醇、2-氨基苻酮、 α -雪松烯、香橙烯、邻苯二甲酸二丁酯等 26 种成分为该植物首次报道。

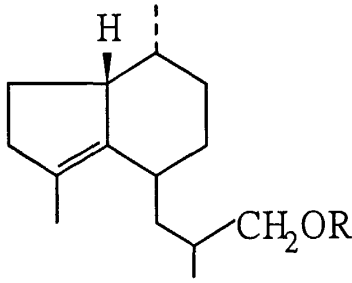
R^1	R^2	
CHO	H	缬草醛
COOH	H	缬草萜酸
COOH	OH	羟基缬草萜酸
COOH	OAC	乙酰氧基缬草萜酸



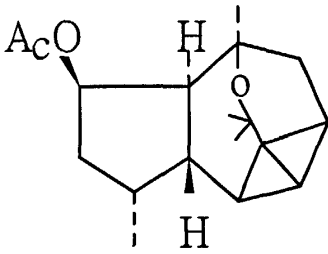
R	
H	戊烯醇
AC	E-戊烯乙酸酯
$COCH_2CH(Me)_2$	E-戊烯异戊酯
COC_4H_9	E-戊烯正戊酯
COC_5H_{11}	E-戊烯乙酯



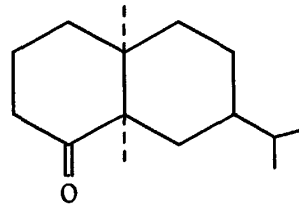
R^1	R^2	
H	H	缬草烷
OH	OH	缬草二醇
H	OH	缬草-8-醇
OH	H	缬草-2-醇



R	
AC	z-戊烯乙酸酯
COCH ₂ CH (Me) ₂	z-戊烯异戊酯
COC ₄ H ₉	z-戊烯正戊酯
COC ₅ H ₁₁	z-戊烯己酯



环野缬草乙酸酯



缬草酮

2.2 木脂素类

近年来国外报道的木脂素均为双环氧型或 7,9'-单环氧型木脂素及其苷。

Britta Schumacher 等^[11]从 *Valeriana officinalis* 中分离得到 8 个木脂素类化合物, 分别为 lignans 8'-hydroxypinoresinol (1) and pinoresinol-4-O-β-D-glucoside (2) 7,9'-monoepoxylignans massoniresinol-4'-O-β-D-glucoside (3), 4'-O-β-D-glucosyl-9-O-(6''-deoxysaccharosyl)olivil (4), and berchemol-4'-O-β-D-glucoside (5) and the 7,9':7',9'-diepoxylignans pinoresinol-4,4'-β-O-D-glucoside (6), 8-hydroxypinoresinol-4'-O-β-D-glucoside (7), and 8'-hydroxypinoresinol-4'-O-β-D-glucoside (8). 其中木脂素 4 和 5 是新的天然产物. 木脂素 4 具有部分对抗 A1 阿糖腺苷受体活性。

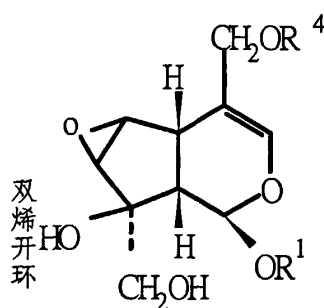
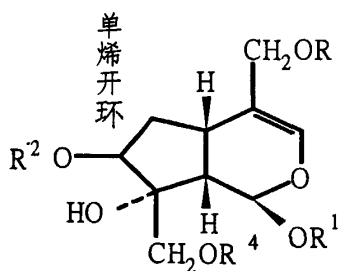
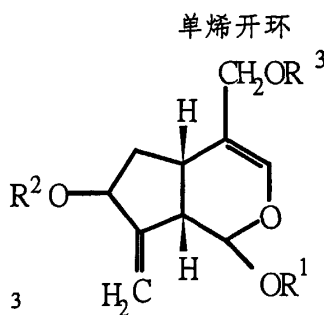
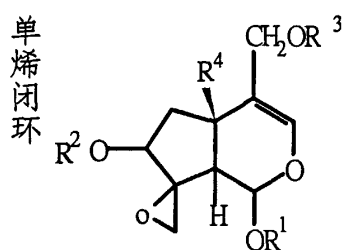
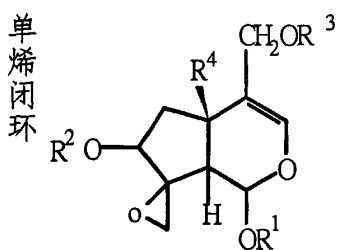
Anna Lisa Piccinelli 等^[12]从 *Valeriana priorrophylla* 中分离得到两个新的木脂素苷, 它们的结构由 1D 和 2D 核磁共振波谱鉴定, 分别是: prinsepiol-4-O-β-D-glucopyranoside 和 fraxiresinol-4'-O-β-D-

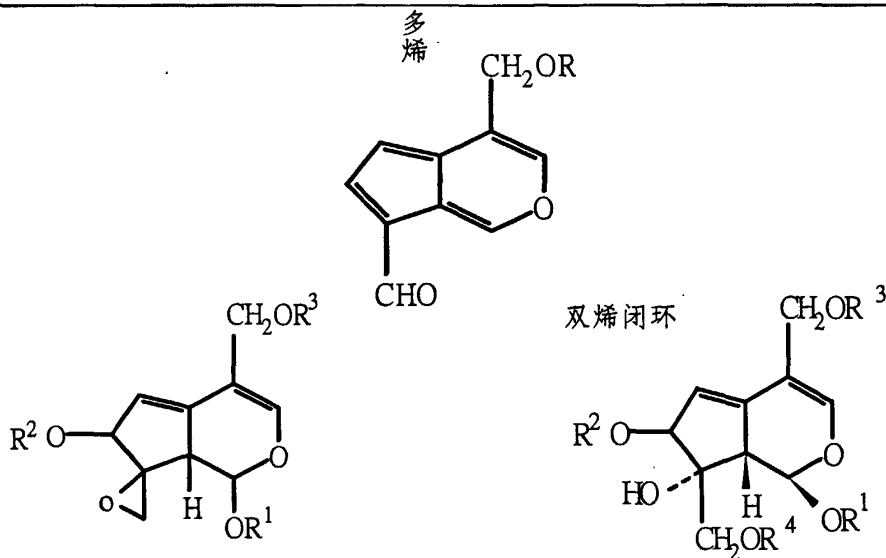
glucopyranoside, 前者有较强的血管舒张活性。

此外还有 8-Hydroxypinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside、8-Hydroxypinoresinol、prinsepiol 等木脂素。

2.3 环烯醚萜类

综合文献报道, 缬草中共分离鉴定了 34 种环烯醚萜, 其中 26 种苷元、8 种苷, 环烯醚萜三酯(又称缬草三酯或缬草素)为环烯醚萜苷元中大多成分种类^[3], 缬草素有较强的镇静、安定活性^[5-6]和抗肿瘤活性^[7-8]。Yuping Tang 等^[9]从蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* 中分离出 5 个新环烯醚 1-homoacevaltrate (1), 1-homoisoacevaltrate (2), 11-homohydroxyldihydrovaltrate (3), 10-acetoxy-1-homovaltrate hydrin (4), 和 10-acetoxy-1-acevaltrate hydrin (5)。郭元强等^[10]从 *Valeriana fauriei* 中分离出一种新环烯醚萜 10-isovaleryl kanokoside C。





2.4 黄酮类

缬草中含有槲皮素(queracetin)、diosmetin、芹菜素(apigenin)、茨菲醇(kaempferol)、金合欢素(acacetin)、腾黄菌素(luteolin)等黄酮类成分。在花、果中黄酮的含量一般超过叶中黄酮的含量^[18]。缬草黄酮苷在最近国外研究报道中有中枢神经抑制作用^[19]。

2.5 生物碱类

缬草根中含有缬草碱(β -valerine)^[13]、鬃草宁碱(chatinine)^[14]、8-甲氧猕猴桃碱(8-methoxyactinidine)^[15]、异缬草酰胺碱(isovaleramide)^[16]、猕猴桃碱(actinidine)^[17]、缬草胺碱(valeriamine)和valeriane等生物碱。

2.6 其他

在缬草的水提取物中含有游离的氨基酸,如 γ -氨基丁酸(GABA),酪氨酸、精氨酸、谷酰胺。此外还含有咖啡酸、绿原酸、鞣质、谷甾醇、1-羟基松脂醇等^[20-21]。

3 药理活性

3.1 对 CNS 的抑制作用

缬草醇提物对小鼠的自发活动具有明显的抑制作用,与戊巴比妥钠有较好的催眠协同作用,可延长小鼠睡眠时间,提高小鼠的入睡率^[22]。缬草挥发油中的缬草醛、缬草萜烯、缬草酮等均有镇静、解痉作用。异缬草酸

有镇痛作用。缬草二醇类为镇静有效成分^[23]。缬草三酯^[5-6]有较强镇静、安定活性。缬草水溶性成分也有镇定和催眠的作用。缬草挥发油能对抗戊四氮硫代氨基脲电休克等导致的惊厥^[24]。

据文献报道,缬草属植物镇静催眠的作用机制主要为:GABA受体机制、苯二氮卓受体机制、腺苷受体机制和神经保护机制^[25]。

3.2 抗抑郁作用

Yoshiteru Oshima 等进行小鼠强迫游泳实验,发现阔叶缬草醇及其 2 种愈创木烷型倍半萜日缬草素醇和醋酸环阔叶缬草醇 a 均显示较强的抗抑郁作用^[26]。缬草宁碱也具有抗抑郁作用^[27]。缬草的抗抑郁作用可能与其能强烈抑制 GABA 受体亲和力有关^[28]。

3.3 对心血管系统作用

缬草能改善心肌缺血。缬草乙醇提取物在麻醉猫实验中能明显扩张冠状血管并降低心肌的耗氧量^[29]。缬草氯仿提取物不仅可抑制中枢,而且有预防心肌缺血和改善心肌循环的作用^[23]。薛存宽等^[30-31]发现缬草挥发油能增加实验动物的冠脉流量、改善心肌组织的微循环灌注、缩小心肌梗死范围,提示缬草挥发油有抗心肌缺血再灌注损伤的作用。

缬草还有良好的抗心律失常作用。王玉良等^[32]研究发现缬草水提物对由乌头碱、哇巴因、肾上腺素等诱发的心律失常动物模型均有良好的对抗作用,延长动作电位时程和有效不应期,抑制心肌自律性。贾健宁等^[33]研究发现缬草提取物(V3d)能明显对抗乙酰胆碱-氯化钙诱发的小鼠房颤和氯仿诱发的小鼠室颤等。缬草中挥发性成分也有抗心律失常及降压作用^[23]。黄峥嵘^[34]研究发现缬草提取物(所含成份为挥发油中的单萜、倍半萜的含氧化合物)浓度依赖性缩短动作电位时程;浓度依赖性抑制 I_{Na} 、 I_{Ca-L} 、 I_{to} ,并作用于 I_{Na} 、 I_{Ca-L} 的失活状态;不同浓度缬草提取物对 I_K 、 I_{K1} ,无明显影响;缬草提取物对 I_{KATP} 无直接的开放作用。缬草提取物对上述离子通道的影响可能是其抗心律失常的重要机制。

3.4 抗肿瘤作用

缬草环烯醚萜类物质具有显著的细胞毒与抗肿瘤作用,尤其是环烯醚

萜酯^[35]。体外实验表明缬草波春对Kreb II腹水癌细胞、肝癌细胞、骨髓造血祖细胞和人T2淋巴细胞有抑制作用^[36]。动物学实验证明二氢缬草素与肝癌细胞反应迅速^[37]。药理试验表明,缬草素对宫颈鳞癌细胞、胃腺癌细胞、肺腺癌细胞均有杀灭作用^[38]。叶建明等^[39]阐明了缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡的机制。

3.5 抗菌抗病毒作用

从缬草中提出的总生物碱有抗菌作用,特别是对革兰氏阳性细菌效力较好^[23]。体外实验表明,缬草有抗轮状病毒作用,并认为缬草素类成分可能为其抗病毒的有效成分^[40]。

3.6 保护肝脏

对四氯化碳引起肝损害的兔,每天给予缬草 3-5 克,病理切片研究表明,对兔肝脏有相当程度的保护作用^[24]。

3.7 保护肾脏

缬草油可以明显改善 2 型糖尿病大鼠的肾脏损害,减少蛋白尿,延缓肾功能损害的进展。其作用与其降低血脂、抗氧化、抑制肾皮质内 PKC 的激活有关^[41]。

3.8 其他

缬草挥发油能抗脑缺血^[42]、宽叶缬草能预防血管狭窄^[43]等。

4 临床应用

缬草在临床用于镇静催眠等,如失眠、劳累压力、肌肉痛、月经痛、支气管痉挛、长久咳嗽、紧张头痛、焦虑、停药安定。

缬草还可用于过度激动导致的心律不齐、小孩厌食、颤抖、胃肠不适、慢性消化不良、胃绞痛、疝气、痢疾、肿胀、以及帕金森氏症、小孩的尿床及蛔虫等^[24]。

5 抗心律失常药物

心律失常指心律起源部位、心搏频率、节律以及冲动传导等任一项异常所引起的心脏节律的异常。临床常见的心律失常有窦性心动过速、窦性心动过缓、期前收缩(早搏)、阵发性室上性心动过速、阵发性室性心动过

速及房室传导阻滞等表现^[45]。

5.1 常用药物及分类

按临床应用分类主要是通过抗心律失常药物对心脏作用部位进行的,可分为3类,分别为作用于房室结的药物、作用于心室的药物以及作用于心房、心室和房室旁道的药物^[45]。若按其电生理作用不同,则可分为4大类。I类为钠通道阻滞剂(膜稳定剂),II类为 β 受体阻滞剂,通过抑制 β 受体,间接影响膜离子流。对慢反应细胞可抑制钙内流,从而降低传导和自律性。III类为延长动作电位时程和有效不应期的药物。IV类为钙拮抗剂,抑制慢反应细胞的除极和自律性,抑制触发活动,减轻心肌细胞内钙超负荷^[46]。

5.2 现有药物存在的问题

临床实践证明,多数抗心律失常药物都有一定的毒副作用,而且抗心律失常作用越强其毒副作用可能越明显,甚至出现严重的致心律失常作用。例如广泛应用的奎尼丁可引起心肌收缩力下降和低血压,严重时可发生心功能不全或休克。口服给药时可发生食欲不振、恶心呕吐及腹泻等消化道反应。用量过大可引起心脏停搏或心室颤动。严重低血钾或Q-T间期延长时应用本药易引起扭转型室性心动过速^[47]。

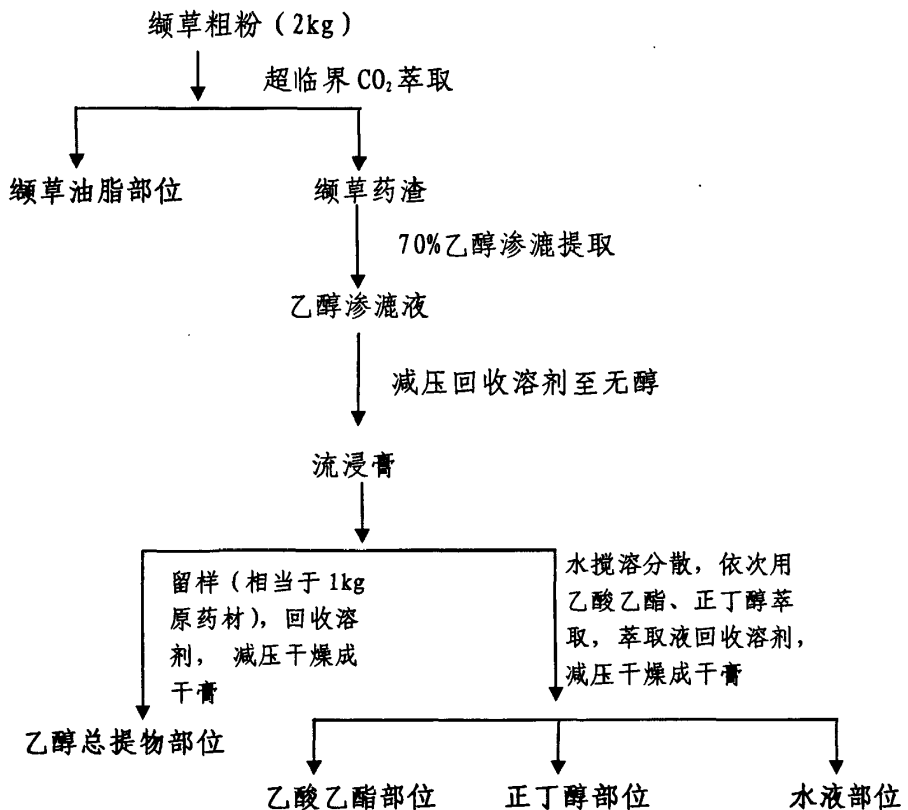
综上所述,现代研究表明,缬草生物活性广泛,疗效明显,安全性好,服用推荐量20倍,仅轻微不适且24小时后缓解,无毒性及致突变性。长期服用缬草安全,我国民间有长期作茶饮用的历史。无成瘾性^[1]。是一种很有开发前景的中药资源。缬草有着明确的抗心律失常活性,并且无严重不良反应,应用前景广泛。但是,缬草的开发还相对落后。本论文对缬草的生药资源、化学成分、药理活性和临床应用等方面的研究进展进行综述,为本论文的研究思路提供了参考依据。

第二章 缬草抗心律失常活性部位和活性组分的筛选研究

本实验采用超临界 CO₂ 萃取法和溶剂提取法, 将缬草粗粉分为挥发油、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水液四个提取部位; 以氯仿诱导心律失常的为指标, 对各提取分离部位进行了药理筛选研究。

1 缬草的提取分离

将 2kg 缬草干药材碾成可以通过 80 目筛的粉末, 超临界 CO₂ 萃取得到缬草油部位, 再以 70% 乙醇对药渣渗漉提取, 回收提取液中乙醇, 采用溶剂萃取法依次以乙酸乙酯、正丁醇依次萃取, 萃取液回收溶剂, 减压干燥, 得乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部位的干膏, 具体流程图如下:



取缬草油部位、乙酸乙脂部位、正丁醇部位和水液部位的备用液，分别稀释成两种剂量，即 5g 生药/mL 和 2.5 g 生药/mL，作为供试品溶液备用。普萘诺尔药粉 60mg（湖北华中药业有限公司），以 80mL 生理盐水溶解后摇匀，制得阳性对照品溶液；氯仿（分析纯，天津市海迪化工有限公司）

2 抗心律失常活性部位筛选研究

2.1 氯仿诱发小鼠心室纤颤的影响

2.1.1 试验动物

昆明种小鼠，雄性，体重 18-22g，由武汉医工所提供。动物许可证号：SCXK（鄂）2003-2005。

2.1.2 试验药材

缬草 *valeriana officinalis. L.*，采自湖北省恩施州，经湖北中医学院鉴定教研室吴和珍副教授鉴定，确认其为败酱科 (Valerianaceae) 缬草属 (*valeriana Linn.*) 植物的根及根茎。

2.1.3 试验方法

选择体重 23-27g 小鼠 200 只，随机分成 10 组：即生理盐水组、给药组（四个提取部位，分别为高、低剂量组）和普萘诺尔组。连续三天灌胃给药，每次剂量 20mL/kg。第三天给药后 30min 时，将小鼠放入倒扣的用橡皮泥密闭的 500mL 烧杯中，同时将装有吸附 2mL 氯仿（每做完一次补充 0.5mL）的棉花的安剖瓶敞口平躺放入烧杯，使小鼠吸入过量的氯仿，直到呼吸停止时立即剖胸检查。实验结果见表 2-1。

2.1.4 结果

表 2-1. 不同部位提取物对氯仿诱发小鼠心室纤颤的影响

药物	浓度 (g 生药/mL)	鼠数	室颤发生率
NS	0	20	17/20
普萘诺尔	40mg/kg	20	9/20*
水液部位	5	20	6/20**
	2.5	20	8/20**
正丁醇部位	5	20	12/20
	2.5	20	13/20
乙酸乙脂部位	5	20	17/20
	2.5	20	10/20*
油部位	5	20	7/20**
	2.5	20	8/20**

表注：与对照组相比：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；与阳性对照组比较： $\Delta P < 0.05$ ； $\Delta \Delta P < 0.01$

表 2-1 可见：缬草提取分离部位中的水液部位在高、低剂量组均能非常显著降低氯仿所致小鼠室颤发生率， $P < 0.01$ ，具有统计学意义；缬草油部位在两个剂量组也能、显著降低氯仿所致小鼠室颤发生率， $P < 0.01$ ；乙酸乙酯部位在低剂量组能显著降低氯仿所致小鼠室颤发生率， $P < 0.05$ ，而高剂量组中无显著性差异。

2.2 乌头碱诱发的大鼠心律失常的影响

为了进一步观察缬草抗心律失常的活性以及确定其活性部位，采用另外一种造模方法，即乌头碱诱发的大鼠心律失常进行药理筛选研究。

2.2.1 试验材料

2.2.1.1 试验动物

Wistar 大鼠，体重 $200 \pm 30\text{g}$ ，雌雄各半。由湖北省疾病控制动物实验中心提供，动物许可证号：SCXK（鄂）2003-2005。

2.2.1.2 试药及其制备

按上述氯仿诱发小鼠心律失常试验中的提取流程和备用液的制备方

法, 制得得乙醇总提取物的备用液, 取乙醇总提物、缬草油部位、乙酸乙脂部位、正丁醇部位和水液部位的备用液各 70mL, 分别配制成高、中、低三个剂量, 即 5 g 生药/mL、2.5 g 生药/mL 和 1.25 g 生药/mL, 作为供试品溶液。盐酸利多卡因注射液, 用生理盐水稀释至 30mL 即得阳性对照品。乌头碱 (DELTA 天然有机化合物信息中心, 用生理盐水配成 0.02mg/mL 溶液)。乌拉坦: 0.25g/mL (化学纯, 中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: C)。

2.2.1.3 仪器

BL-420F 生物机能实验系统 (成都太盟科技有限公司)。

2.2.2. 试验方法

选择体重 170-230g 大鼠 170 只, 随机分成 17 组: 生理盐水组、给药组 (四个提取部位及总提物, 分高、中、低剂量) 和利多卡因组。连续两天灌胃给药, 每次剂量 15mL/kg. 阳性药每次给药量为 7.5 mL/kg, 腹腔注射。第二天给药后 20min 时腹腔注射乌拉坦 (5mL/kg) 麻醉, 插入电极, 观察二导联心电图, 此时为正常波形。10min 后舌下静脉注射乌头碱 (2.9mL/kg)。记录此后 2.5h 内室早、室速和室颤的开始时间 (未出现失常, 按 2.5h 算)、持续时间和死亡率。取各组 $X \pm S$ 值, 进行组间 t 检验。选出具有比较意义的指标, 结果见表 2-2。

表 2-2. 缬草各提取部位对抗乌头碱引起心律失常作用

组别	剂量 g 生药. mL ⁻¹	动物 数	室早开始时间 (min)	室早维持时间 (min)	室速维持时间 (min)	室颤开始时间 (min)	室颤 率	死亡 率
阴性组	—	10	1.49 ± 1.52	20.09 ± 30.19	18.37 ± 28.71	56.4 ± 61.9	7/10	5/10
利多卡 因组	10	10	6.34 ± 5.37 *	16.01 ± 21.02	3.53 ± 5.89	125.8 ± 49.3	3/10	3/10
缬草水 溶性部 位	50	10	97.24 ± 64.2* *	6.40 ± 16.44	0.05 ± 0.14	150 ± 0.0* *	0/10* *	* 2/10
	25	10	17.85 ± 22.77	6.27 ± 11.41	18.54 ± 38.31	150 ± 0.0* *	0/10** *	3/10
	12.5	10	7.89 ± 11.50	36.23 ± 20.16	39.14 ± 33.79	105.5 ± 56.8	3/10	4/10

缬草正 丁醇部 位	50	10	15.46 ± 14.3 *	31.29 ± 21.53	11.75 ± 14.59	137.2 ± 38.4 *	1/10 *	1/10
	25	10	16.97 ± 29.15	18.28 ± 21.90	17.01 ± 27.98	109.1 ± 62.5	3/10	0/10 *
	12.5	10	2.02 ± 1.93	14.19 ± 23.24	17.24 ± 24.64	55.9 ± 61.9	7/10	6/10
缬草乙 酸乙酯 部位	50	10	1.56 ± 1.53	46.25 ± 43.68	35.06 ± 37.47	106.0 ± 59.3	5/10	3/10
	25	10	7.87 ± 14.24	26.11 ± 30.44	11.37 ± 20.49	61.6 ± 59.9	6/10	5/10
	12.5	10	2.70 ± 3.76	17.93 ± 23.74	25.31 ± 41.08	53.3 ± 63.5	7/10	5/10
缬草油 部位	50	10	14.53 ± 18.71	40.57 ± 38.41	15.33 ± 20.02	79.0 ± 66.7	8/10	3/10
	25	10	6.53 ± 9.99	27.71 ± 32.83	11.19 ± 15.64	80.9 ± 69.2	5/10	3/10
	12.5	10	1.97 ± 1.58	17.33 ± 25.64	27.82 ± 37.79	84.9 ± 65.2	5/10	5/10
缬草乙 醇总提 物部位	50	10	3.46 ± 4.43	25.24 ± 29.73	14.56 ± 27.49	90.8 ± 62.8	4/10	3/10
	25	10	2.08 ± 1.57	24.81 ± 29.64	53.74 ± 34.7 *	86.2 ± 64.5	5/10	3/10
	12.5	10	1.56 ± 1.01	21.87 ± 20.47	43.44 ± 38.45	99.20 ± 62.5	4/10	2/10

表注：与对照组相比：* P<0.05；** P<0.01；与阳性对照组比较：△P<0.05；△△P<0.01

2.2.3 结果

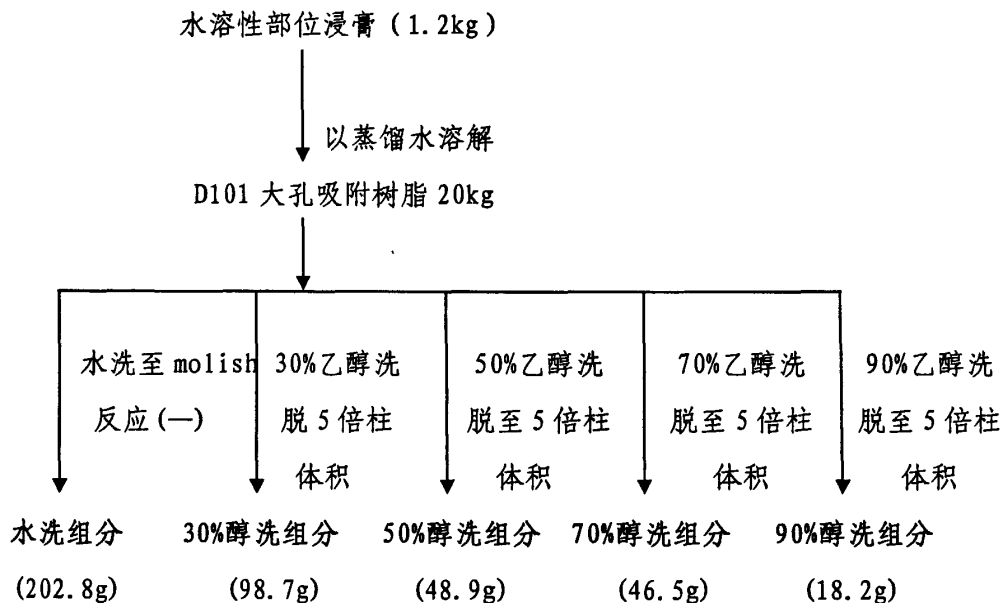
由表 2-2 可见：缬草提取物中水液部位在 5g 和 2.5 g 生药/ml 能非常显著推迟乌头碱致大鼠室性早搏 (VE)、室性纤颤 (VF) 发生时间，减少室颤发生率， $P < 0.01$ ；正丁醇部位在 5g 生药/mL 显著推迟乌头碱致大鼠室性早搏 (VE)、室性纤颤 (VF) 发生时间，减少室颤发生率， $P < 0.05$ ，在 2.5g 生药/mL 时显著减少死亡率。缬草油和乙酸乙酯部位在一定浓度下有相对较弱的对抗乌头碱致大鼠心律失常的作用。

3 缬草水溶性部位活性组分的提取分离及筛选

3.1 缬草水溶性部位大孔吸附树脂洗脱组分的分离

为使活性成分进一步集中，将药理实验中筛出的活性较强的水液部位

及正丁醇萃取部位合并得到缬草水溶性成分。通过大孔吸附树脂柱，依次用水、30%、50%、70%、90%乙醇洗脱至流出液澄清，各洗脱部位经过喷雾干燥后得到干粉备用。流程图如下：



3.2 缬草水溶性部位大孔吸附树脂洗脱组分活性筛选

3.2.1 试验动物

昆明种小鼠，体重 25 ± 2 g，雌雄各半。由湖北省疾病控制动物实验中心提供，动物许可证号：SCXK（鄂）2003-2005。

3.2.2 供试品药液制备

取上述大孔树脂分离得到的各组分的干粉，分别稀释成两种剂量，即相当于 5g 生药/mL 和 2.5 g 生药/mL，作为供试品溶液。普萘诺尔（湖北华中药业有限公司 批号 20061003：60mg 药片碾成粉末，溶于 80mL 生理盐水 摇匀，制得阳性对照品溶液）氯仿（分析纯，天津市博迪化工有限公司）

3.2.3 试验方法及结果

选择体重 23-27g 小鼠 240 只，随机分成 12 组：即生理盐水组、给药组（5 个大孔树脂分离组分，分高、低剂量）和普萘诺尔组。将小鼠灌胃

给药一次，每只小鼠 0.6ml/次，24 小时后以相同剂量再灌胃给药一次，半小时后放入密封的装有 1.5ml 氯仿及棉花的安剖瓶中，并扣于烧杯中，待小鼠刚好无呼吸时迅速取出解剖，观察是否出现心室震颤的现象，并做纪录，详细结果见表 3-1

表3-1: 缬草各提取部位对氯仿诱发小鼠心律失常的对抗作用

组别	剂量(g生药/kg)	动物数	室颤发生率
阴性对照组	—	20	15/20
缬草水洗部位	50	20	10/20
	100	20	8/20
缬草30%乙醇洗脱部位	50	20	13/20
	100	20	9/20
缬草50%乙醇洗脱部位	50	20	13/20
	100	20	12/20
缬草70%乙醇洗脱部位	50	20	10/20
	100	20	13/20
缬草90%乙醇洗脱部位	50	20	6/20 *
	100	20	6/20 *
普萘洛尔组	—	20	4/20 **

与对照组相比: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

由上表可见，90%醇洗部分在高低剂量组的效果最佳，且已接近阳性药物的效果。其他部位有一定效果，但不明显，说明 90%乙醇洗脱组分为活性物质最集中的组分。

药理跟踪筛选结果表明，水溶性部位经大孔吸附树脂分离纯化，90%醇洗部位对抗小鼠心律失常的活性较强，确定其为水溶性部位的活性组分，并对该组分中的化学成分进行了提取分离和结构鉴定。

第二章 水溶性部位活性组分的化学成分研究

药理实验结果表明,缬草提取部位中,水液部位为活性部位,为富集有效成分,将水液与正丁醇萃取部位合并得到水溶性部位;水溶性部位经大孔吸附树脂分离后继续筛选,发现90%醇洗组分抗心律失常作用显著,故本项研究对90%乙醇洗脱组分进行了化学成分的研究。

1 缬草水溶性部位活性组分的提取分离

1.1 仪器与试药

缬草 *valeriana officinalis* 购自湖北省中药材公司,经湖北中医学院鉴定教研室吴和珍副教授鉴定为败酱科 (Valerianaceae) 缬草属 (*valeriana* Linn.) 植物的根及根茎。

显微熔点测定仪: XRC-1 型显微熔点仪 (温度未校正)

EI-MS: VG ZAB-3F 型质谱仪 FAB-MS. EI-MS

¹H-NMR: Varian Mercury VX-300 型核磁共振仪

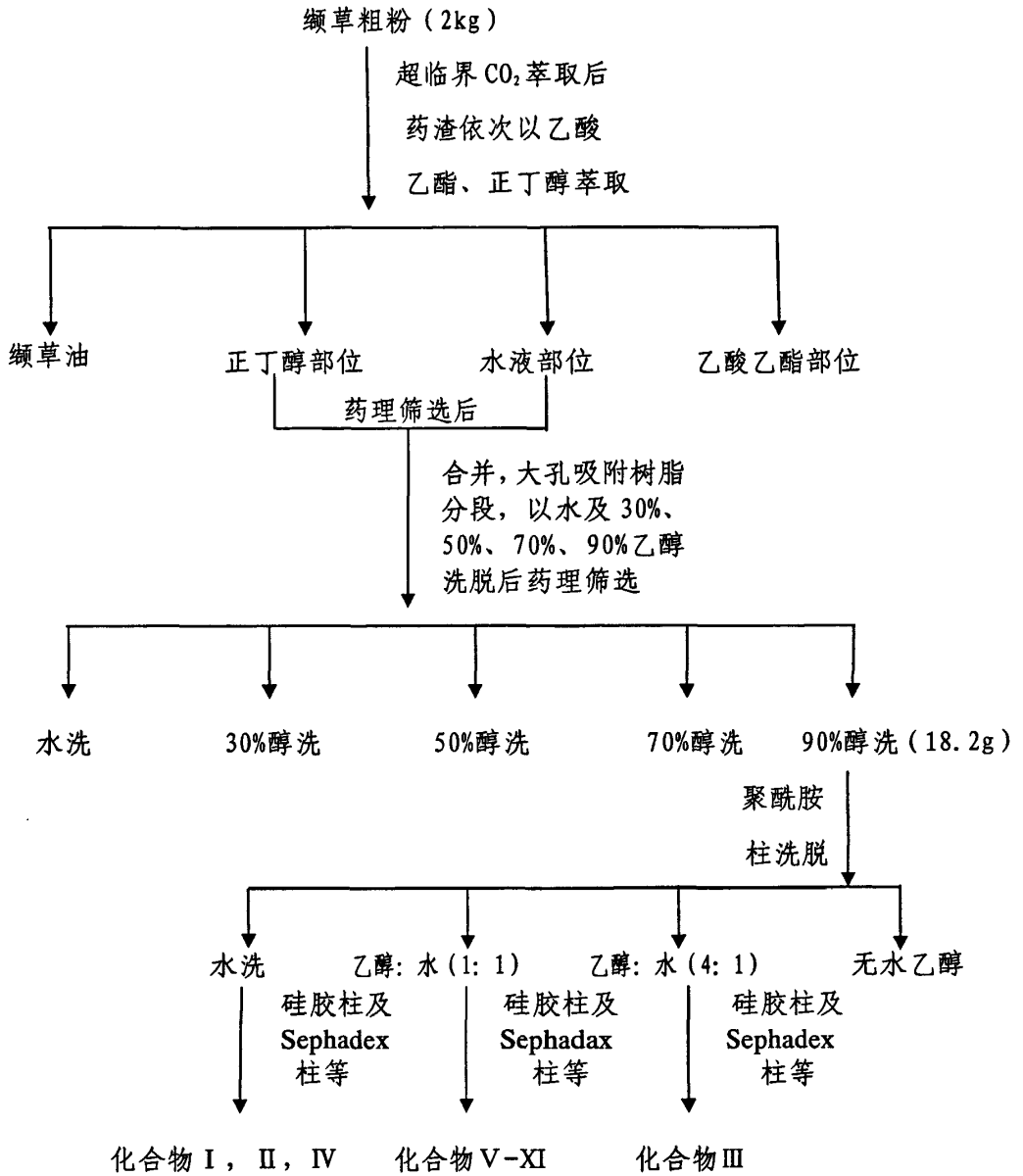
¹³C-NMR: Varian INOVA-600 型核磁共振仪

显色剂: 10%硫酸茴香醛乙醇溶液, 3%FeCl₃乙醇溶液, 5%磷钼酸乙醇液

硅胶为青岛海洋化工厂生产; 所用试剂均为化学纯或分析纯

1.2 提取与分离

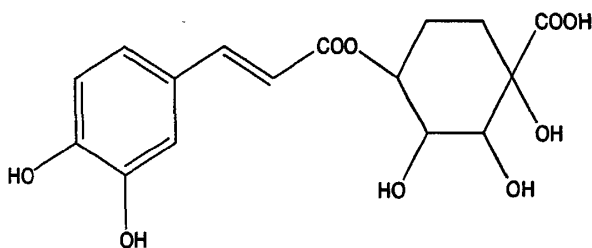
取缬草粗粉 (15kg), 采用超临界 CO₂ 萃取 (SFE-CO₂), 缬草经超临界 CO₂ 萃取后的药渣 (13kg), 置渗漉桶中, 用 70%乙醇渗漉, 浓缩乙醇提取物, 加适量水充分搅拌, 依次以乙酸乙酯、正丁醇萃取得到乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和水液部分。将正丁醇与水部位合并后经大孔吸附树脂以不同浓度乙醇进行洗脱, 浓缩干燥后得到 5 个组分; 90%醇洗组分再分别经聚酰胺柱、硅胶柱、Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化, 得到 11 个单体成分, 并鉴定了其中 8 个。提取分离流程图如下:



2 抗心律失常活性组分的分离与鉴定

化合物 I 的鉴定

白色无定形粉末(甲醇), $^1\text{H-NMR}$ 谱显示 δ 6.85 (1H, d, $J=8.4$ Hz), δ 6.86 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, 1.8 Hz), δ 7.00 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 另有一组质子信号为 δ 6.22 (1H, d, $J=16.1$ Hz), δ 7.50 (1H, d, $J=16.1$ Hz), 鉴定为反式偶合的烯键质子, 这与苯丙烯酸类成分的波普特征是温和的, 其波谱数据与文献报道的咖啡酸数据一致^[48], 且 TLC 与对照品的 R_f 值相同, 故鉴定该化合物为咖啡酸 (Caffeic acid), 其核磁图谱见附表 1。其化学结构如下:



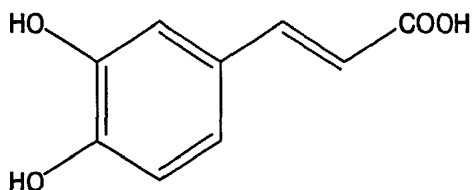
咖啡酸
(Caffeic acid)

化合物 II 的鉴定

白色无定形粉末(甲醇), $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)。 δ 2.04-2.18 (2H, m, 15-H), δ 2.21-2.28 (2H, m, 13-H), δ 3.73 (1H, dd, $J=3.20, 8.56$ Hz, 12-H), δ 4.17-4.20 (1H, m, 11-H), δ 5.33-5.38 (1H, m, 10-H), δ 6.26 (1H, d, $J=15.88\text{Hz}$, 8-H), δ 6.79 (1H, d, $J=8.20\text{Hz}$, 3-H), δ 6.96 (1H, dd, $J=2.00, 8.16$ Hz, 6-H), δ 7.56 (1H, d, $J=15.88\text{Hz}$, 7-H)。

化合物 II 的波谱数据与文献报道^[48]绿原酸的数据一致, TLC 与绿原酸标准品 R_f 值及斑点颜色一致, 相互混合熔点不下降, 因此鉴定化合物

II 为绿原酸 (Chlorogenic acid), 其核磁图谱见附表 2。其化学结构如下:

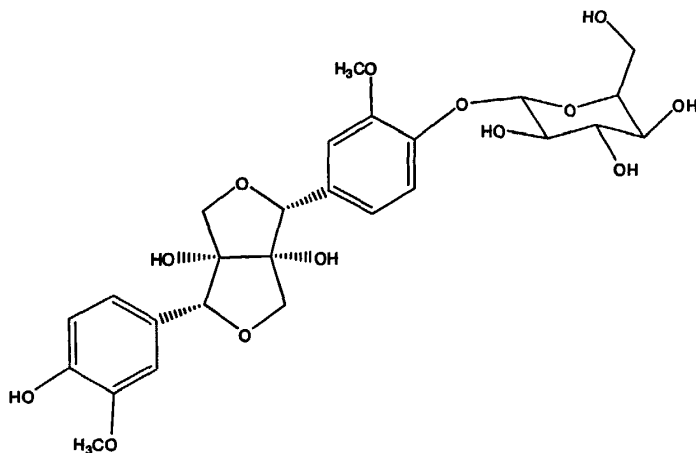


绿原酸

(Chlorogenic acid)

化合物 III 的鉴定

白色无定形粉末, 易溶于甲醇, EI-MS m/z : 552 [M⁺]; 其 ¹³C-NMR 显示 26 个碳信号, ¹H-NMR 显示有 25 个氢信号, 推测分子式为 C₂₆H₃₂O₁₃。¹H-NMR 明显可以发现两个 ABX 系统, 提示有两个 1, 3, 4-取代苯环, 进一步将其 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 与文献进行对比发现, 其波谱数据与文献报道^[49]一致, 故鉴定该化合物为青刺尖木脂醇苷 (prinsepiol-4-0 β-D-glucoside), 其核磁谱图见附表 3-4。其结构式如下:



青刺尖木脂醇苷

(prinsepiol-4-0-β-D-glucoside)

化合物 III 的 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 波普数据归属见表 3-1

表 3-1 化合物 3 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱的归属

position	δ ^1H (JH-H in Hz)	δ ^{13}C (JC-H)	position	δ ^1H (JH-H in Hz)	δ ^{13}C (JC-H)
1		132.0	4'		146.3
2	7.16 (d, 1.5)	112.3	5'	6.83 (d, 8.0)	114.4
3		149.2	6'	6.89 (dd, 1.5, 8.0)	120.4
4		146.5	7'	5.01 (s)	87.9
5	7.20 (d, 8.0)	116.3	8'		88.1
6	6.99 (dd, 1.5, 8.0)	120.2	9'a	4.02 (d, 9.4)	75.5
7	5.05 (s)	87.6	9'b	4.16 (d, 9.4)	
8		87.9	3'-OCH ₃	3.91 (s)	55.2
9a	4.02 (d, 9.4)	75.6	3		
9b	4.17 (d, 9.4)		Glc-1''	4.94 (d, 7.5)	101.7
3-OCH ₃	3.92 (s)	55.5	Glc-2''	3.55 (dd, 9.5, 7.5)	73.7
1'		128.3	Glc-3''	3.51 (t, 9.5)	76.6
2'	7.09 (d, 1.5)	112.3	Glc-4''	3.44 (t, 9.5)	70.2
3'		149.2	Glc-5''	3.45 (m)	77.0
				3.74 (dd, 12.1, 4.5)	
			Glc-6''	3.91 (dd, 12.1, 3.5)	61.3

化合物 IV 的鉴定

白色无定形粉末，易溶于甲醇。三氯化铁反应阳性，示有酚羟基存在；Molish 反应阳性，示其为糖或苷类化合物；结合化合物 IV 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 谱等可推测其分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ ；计算其不饱和度为 11。

$^1\text{H-NMR}$ 谱中，在 δ 4.88 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$) 处判断为葡萄糖连接处氢信

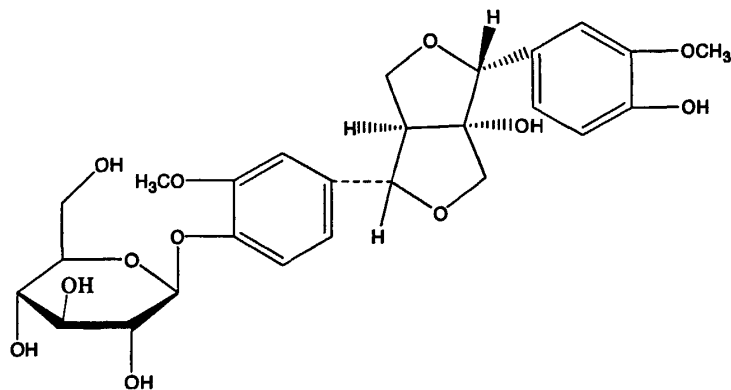
号, 根据偶合常数推断其苷键的构型为为 β 构型。在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中还显示有两组三取代芳环的 6 个芳香质子信号, 其中在 δ 7.03 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), δ 6.84 (1H, dd, $J=8.4, 2.0\text{Hz}$) 和 δ 6.77 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$) 处的信号构成一个苯环的 AMX 系统; 在 δ 7.11 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), δ 6.96 (1H, dd, $J=8.4, 2.0\text{Hz}$) 和 δ 7.15 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$) 处的信号构成另一个苯环的 AMX 系统。 δ 4.67 (1H, s, H-7) 和 δ 4.88 (1H, d, $J=3.6\text{Hz}$) 处为 2 个氧代次甲基质子信号。 δ 4.67 (1H, s, H-7) 以单峰信号形式出现, 说明 8 号碳为季碳; δ 3.77 (1H, dd, $J=6.4, 8.4\text{Hz}$) 和 δ 4.46 (1H, t, $J=8.4\text{Hz}$) 及 δ 3.84 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$) 和 δ 4.04 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$) 处的信号归属为氧代亚甲基的 4 个质子信号。 δ 3.02 (1H, m) 处归属为 1 个次甲基的质子信号; 2 个甲氧基的质子信号位于 δ 3.86 (3H, s) 和 δ 3.87 (3H, s) 处; 该化合物的不饱和度为 11, 除去两个苯环和一个糖外, 还有 2 个不饱和度, 推测可能为双环氧木脂素苷类化合物。

$^{13}\text{C-NMR}$ 谱中, 可见两组三取代芳环碳信号, 一组葡萄糖基碳信号, 另有两组相似的氧代碳信号 δ 89.3 (CH) 和 δ 87.3 (CH), δ 76.2 (CH_2) 和 δ 72.1 (CH_2), 还有一个季碳信号 δ 92.8 (C) 和一个次甲基碳信 δ 62.5 (CH), 分别为 C-7、C-7', C-9、C-9' 和 C-8、C-8', 进一步证明化合物 IV 是一个双环氧木脂素苷类化合物。

在 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ 谱中, 可见 H-8' (δ 3.02) 信号分别与 H-7' (δ 4.88) 和 H-9' (δ 4.46, 3.77) 信号呈相关关系, 2 个 H-9 (δ 4.04, δ 3.84) 之间存在相关关系; 另外可见, H-6 (δ 6.84) 信号分别与 H-2 (δ 7.03) 和 H-5 (δ 6.77) 信号, H-6' (δ 6.96) 信号分别与 H-2' (δ 7.11) 和 H-5' (δ 7.15) 信号出现了明显相关峰。

化合物 IV 的 HMBC 谱中, H-7 (δ 4.67) 与 C-2 (δ 112.7)、C-6 (δ 121.5)、C-1 (δ 129.0) 存在明显相关峰; H-7' (δ 4.88) 与 C-2' (δ 111.9)、C-6' (δ 120.2) 存在明显相关峰, 以上证明两个稠合的四氢呋喃环与芳香环之间的连接位置是 7 位和 7' 位。H-1' (δ 4.88) 与 C-4' (δ 147.5) 存在明显相关峰, 由此确定糖和苷元的连接位置为 $\text{C}_4-\text{C}_{1'}$ 。

将化合物IV的 ^{13}C -NMR和 ^1H -NMR谱数据与文献数据^[50]进行对照,最后鉴定化合物IV为(+)-8-羟基-松脂素-4'-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷[(+)-8-Hydroxypinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside],其核磁谱图见附表5-8。其化学结构如下:



(+)-8-羟基-松脂素-4'-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷

[(+)-8-Hydroxypinoresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside]

化合物IV的 ^1H -NMR及 ^{13}C -NMR波普数据归属见表3-2

表3-2 化合物4的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR谱的归属

position	d^1H (JH-H in Hz)	d^{13}C (JC-H)	position	d^1H (JH-H in Hz)	d^{13}C (JC-H)
1		132.8	5'	6.76(d, 8.4)	116.0
2	7.11 (d, 1.8)	113.4	6'	6.86 (dd, 1.8, 8.4)	120.5
3		150.5	7'	4.89 (d)	87.8
4		147.7	8'	3.00-3.06 (m)	62.4
5	7.15 (d, 8.4)	117.5	9'	3.74-3.78 (dd, 9.0, 6.4)	72.1
6	6.96 (dd, 2.0, 8.4)	121.3	3-CH ₃ O	3.88 (s)	56.4
7	4.72 (s)	88.9	3'-CH ₃ O	3.84 (s)	56.4
8		93.0	Glc-1''	4.88 (d, 7.2)	102.9
9	3.86 (d, 9.2); 4.05(d, 9.2)	76.0	Glc-2''	3.55 (dd, 9.5, 7.5)	74.9

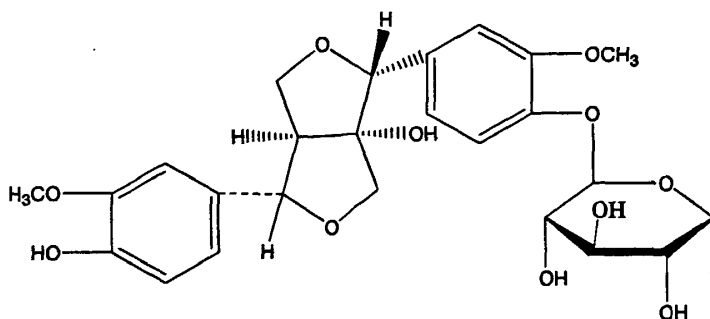
1'		133.6	Glc-3''	3.51 (t, 9.5)	77.8
2'	7.04 (d, 2.0)	111.3	Glc-4''	3.44 (t, 9.5)	71.3
3'		149.1	Glc-5''	3.45 (m)	78.2
4'		147.4	Glc-6''	3.66 (m); 3.73 (m)	62.5

化合物 V 的鉴定

白色无定形粉末(甲醇),三氯化铁反应阳性,示有酚羟基存在;Molish 反应阳性,示其为苷类;酸水解后,糖部分经薄层色谱检识证明只含有 D-葡萄糖。化合物 V 的 ESI-MS 在 m/z 535 处给出分子离子峰,表明其分子量为 536。结合化合物 V 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、和 DEPT 谱等可推测其分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ 。计算其不饱和度为 11。

化合物 V 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱与化合物 IV 极其相近,表明两者具有非常相近的化学结构。结合质谱数据认定化合物 IV 与 V 为同分异构体。将其与化合物 IV 的波普数据对比分析发现,化合物 V 与化合物 IV 的结构差异只存在于苷键的连接位置不同。

进一步将化合物 V 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$ 谱数据与文献数据^[50]进行对照,最后鉴定化合物 V 为 (+) 8-羟基-松脂素-4-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 [(+) 8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside], 其核磁谱图见附表 9-11。其化学结构如下:



(+) 8-羟基-松脂素-4-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷

[(+) 8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside]

化合物 V 的 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据归属见下表 3-3

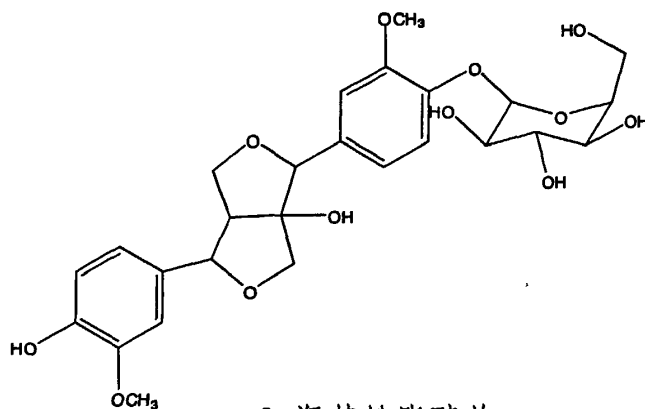
表 3-3 化合物 5 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱的归属

position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)	position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)
1		128.5	5'	6.80(d, 8.1)	116.2
2	7.10 (d, 1.6)	114.0	6'	6.88 (dd, 1.8, 8.1)	119.8
3		148.3	7'	4.82 (d,5.6)	87.8
4		147.4	8'	3.39 (m)	60.3
5	6.71 (d, 8.1)	115.1	9'	4.4(t,8.4);3.80(dd,6.0,8.8)	72.2
6	6.86 (dd, 1.6, 8.1)	122.4	3-CH ₃ O	3.84 (s)	56.5
7	4.68 (s)	90.0	3'-CH ₃ O	3.88 (s)	56.4
8		99.2	Glc-1''	4.33 (d, 7.7)	100.0
9	3.94 (d, 10.4); 4.40(d, 10.4)	73.1	Glc-2''	3.03 (m)	74.8
1'		133.1	Glc-3''	3.15 (m)	78.3
2'	7.03 (d, 1.6)	110.6	Glc-4''	3.14 (m)	71.1
3'		149.3	Glc-5''	2.89(m)	78.0
4'		147.2	Glc-6''	3.66 (m);3.51 (m)	62.4

化合物 VI 的鉴定

白色无定形粉末, 易溶于甲醇, EI-MS m/z : 536 [M⁺]; $^{13}\text{C-NMR}$ 显示 26 个碳信号, $^1\text{H-NMR}$ 显示有 32 个氢信号, 推测分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 显示有两个 ABX 系统: 其中一个为 δ 7.11 (1H, d, $J=1.8\text{Hz}$, H-2), 7.15 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5), 6.94 (1H, dd, $J=1.8$ 、 8.4Hz , H-6); δ 7.04 (1H, d, $J=1.8\text{Hz}$, H-2'), 6.77 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5'), 6.86 (1H, dd, $J=1.8$ 、 8.4Hz , H-6') 为另外一个苯环 ABX 系统的信号。

^{13}C -NMR 中 6 个碳 δ 102.9、74.9、77.8、71.3、78.2、62.5 和 ^1H -NMR 中对应的 δ 3.40-4.94 范围内为糖的信号, 提示该化合物连接了一个单糖; 由不饱和度可推测, 结构中还有两个环, 推测其为以双环氧木脂素为母核的苷。进一步将化合物 V 的 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 谱数据与文献数据^[50]进行对照, 其波谱数据与文献报道^[51]一致, 故鉴定该化合物为 8-羟基松脂醇苷(8-Hydroxypinoresinol-4-o- β -D-glucoside)其核磁图谱见附表 12-14。其化学结构式为:



8-羟基松脂醇苷

(8-Hydroxypinoresinol-4-o- β -D-glucoside)化合物 VI 的 ^1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 数据归属见下表 3-3表 3-4 化合物 VI 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱的归属

position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)	position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)
1		132.7	4'		147.4
2	7.11 (d, 1.8)	113.4	5'	6.77 (d, 8.4)	116.0
3		150.5	6'	6.86 (dd, 1.8, 8.4)	120.5
4		149.1	7'	4.89 (d)	87.8
5	7.15 (d, 8.4)	117.6	8'	3.00-3.06 (m)	62.4
6	6.94 (dd, 1.8, 8.4)	121.3	9'ax	3.74-3.78 (dd, 9.0, 6.4)	72.1

7	4.72 (s)	88.9	9' eq	4.43-4.47 (dd $^2J= 9.0\text{Hz}$)	
8		93.0	3'-OCH ₃	3.88 (s)	56.4
9ax	3.86 (d, 7.2)	76.1	Glc-1''	4.88 (d, 7.2)	102.9
9eq	4.05 (d, 7.2)		Glc-2''	3.55 (dd, 9.5, 7.5)	74.9
3-OCH ₃	3.83 (s)	56.7	Glc-3''	3.51 (t, 9.5)	77.8
1'		133.6	Glc-4''	3.44 (t, 9.5)	71.3
2'	7.04 (d, 1.8)	111.3	Glc-5''	3.45 (m)	78.2
3'		147.7	Glc-6''	3.74 (dd, 12.1, 4.5) 3.91 (dd, 12.1, 3.5)	62.5

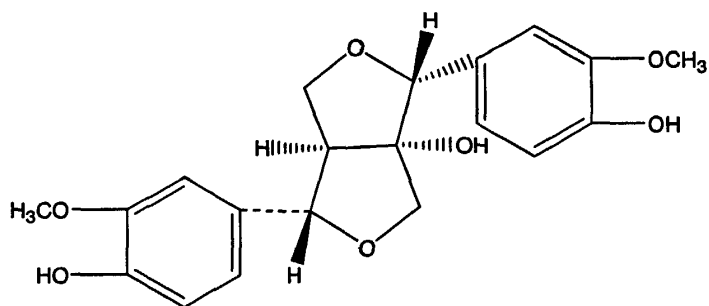
化合物VII的鉴定

白色无定形粉末，可溶于甲醇、乙醇、水；三氯化铁反应阳性，示有酚羟基存在；Molish反应为阴性。

化合物VII的¹H-NMR谱中显示有两组三取代芳环的6个芳香质子信号，其中在 δ 7.03 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$)， δ 6.83 (1H, dd, $J=8.0、2.0\text{Hz}$)和 δ 6.76 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$)处的信号构成一个苯环的AMX系统；在 δ 7.02 (1H, d, $J= 2.0\text{Hz}$)， δ 6.85 (1H, dd, $J=8.0、2.0\text{Hz}$)和 δ 6.75 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$)处的信号构成另一个苯环的AMX系统。该化合物的不饱和度为10，除去两个苯环，还有2个不饱和度，推测可能为双环氧木脂素类化合物。

化合物VII的¹³C-NMR谱中，可见两组芳环的信号，另有两组相似的氧化碳信号 δ 76.2和 δ 72.0， δ 89.2和 δ 87.6，还有一个次甲基碳信号 δ 62.3和一个季碳信号 δ 92.5，进一步证实为双环氧木脂素类化合物。

进一步将化合物VII的¹³C-NMR和¹H-NMR谱数据与文献数据^[50]进行对照，最后鉴定化合物VII为(+)-8-羟基-松脂素[(+)-8-Hydroxypinoresinol]，其核磁共振波谱图见附表15-16。其化学结构如下：



(+) 8-羟基-松脂素

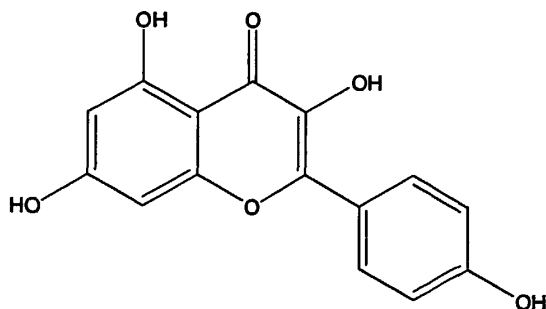
[(+) 8-Hydroxypinoresinol]

化合物VII的 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据归属见下表 3-5表 3-5 化合物VII的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱的归属

position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)	position	$\delta^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (JC-H)
1		129.1	2'	7.03(d,2.0)	111.3
2	7.03 (d, 2.0)	112.7	3'		148.7
3		149.1	4'		147.4
4		147.5	5'	6.76(d,8.0)	115.6
5	6.76 (d, 8.0)	116.0	6'	6.85(dd,2.0,8.0)	120.5
6	6.83 (dd, 2.0, 8.0)	121.6	7'	4.84(d,5.2)	87.8
7	4.66(s)	88.3	8'	3.03(m)	62.4
8		92.7	9'	4.45(t,8.4); 3.75(dd,6.4,8.4)	72.0
9	4.03 (d,9.2); 3.83 (d, 9.2)	76.1	3-CH ₃ O	3.86(s)	56.4
1'		133.6	3'-CH ₃ O	3.86(s)	56.4

化合物VIII的鉴定

黄色无定形粉末，易溶于甲醇；盐酸-镁粉反应和三氯化铁反应均为阳性，推测为黄酮类成分。推测化合物VIII的 $^1\text{H-NMR}$ 中 δ 8.05ppm (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$,) 与 6.93 (d, $J=8.5\text{Hz}$,) 为 AA' BB' 系统，归属于黄酮 B 环上的 H-2', 6' 和 H -3', 5'。 δ 6.44 ppm (1H, d, $J=2.5\text{Hz}$) 与 6.19 (1H, d, $J=2.5\text{Hz}$) 为间位偶合的两个氢，归属为 A 环的 H-8 和 H-6，即 5, 7 位连接有-OH。与文献数据对比推断化合物VIII为山柰酚(Kaempferol) ^[52]，其核磁图谱见附表 17。其化学结构如下：



山柰酚
(Kaempferol)

第三章 缬草挥发性成分的顶空固相微萃取-气相色谱分析

顶空固相微萃取 (HS-SPME) 具有集采样、分离、富集及进样于一体、不需加入有机溶剂、萃取时间短等优点。为了探讨顶空固相微萃取-气相联用技术在中药研究中的应用, 本实验以缬草为研究对象, 对顶空固相微萃取的条件和气相色谱的分离条件进行了考察。

1 仪器及试剂

1.1 试验仪器

CLASS-GC10 色谱工作站, 高纯 N_2 ($\geq 99.9\%$), 高 H_2 ($\geq 99.9\%$); BP-211D 型十万分之一分析天平 (德国 Satorius), JTMX-80-2 型台式离心机。

1.2 试验材料

对照品: 乙酸龙脑酯、龙脑、异戊酸 (中国药品生物制品检定所提供), 乙醇、乙醚为分析纯。缬草药材经湖北中医学院中药鉴定教研室鉴定为缬草属植物缬草 (*Valeriana officinalis* L), 粉碎备用。Wistar 大鼠, 体重 $200 \pm 30g$, 雌雄各半。由湖北省疾病控制动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK (鄂) 2003-2005。

1.3 色谱条件

载气为氮气 (N_2), 供试品溶液进样量 $1 \mu l$, 分流比 10:1, 载气流速 $1.8 ml/min$, 柱前压 50Kpa, DB-WAX 石英毛细管柱 ($30m \times 0.32mm \times 0.25 \mu m$) 进样口温度 $250^\circ C$, 检测器温度 $250^\circ C$, 柱起始温度 $60^\circ C$ 。

程序升温:

$60^\circ C \xrightarrow{10^\circ C/min} 120^\circ C \xrightarrow{4^\circ C/min} 115^\circ C \xrightarrow{10^\circ C/min} 250^\circ C$
(20min)

2 HS-SPME 萃取条件考察

固相微萃取主要针对有机物进行分析, 根据有机物与溶剂之间“相似者相溶”的原则, 利用石英纤维表面的色谱固定相对分析组分的吸附作用, 将组分从试样基质中萃取出来, 并逐渐富集, 完成试样前处理过程。在进样过程中, 利用气相色谱进样器的高温, 液相色谱、毛细管电泳的流

动相将吸附的组分从固定相中解吸下来，由色谱仪进行分析。

但由于待分析样品与吸附涂层之间的结合是个动态平衡过程，且每种涂层的对分析物有着特定的吸附范围。所以在分析前对萃取头涂层的Fiber种类、萃取的温度、时间、萃取样品的质量都需要进行考察。

2.1 Fiber 种类的考察

由SPME萃取的原理可知：涂层的极性、厚度差异都将对待测物的选择萃取有影响。根据相似相溶原理，非极性涂层（如聚二甲基硅氧烷）有利于对非极性或极性小的有机物的分离，极性涂层（如聚丙烯酸酯、聚乙二醇）对极性有机物的分离效果较好。市场上主要的固相微萃取Fiber种类及其使用范围见下表：

表4-1：固相微萃取Fiber种类及其使用范围

Fiber类型	固定相及其厚度	温度	极性	适用样品类型	适用设备
PDMS	Ploydimethylsiloxane,100 μm	280	非极性	非极性挥发物质	GC/HPLC
PDMS	Ploydimethylsiloxane,30 μm	280	非极性	非极性半挥发物质	GC/HPLC
PDMS	Ploydimethylsiloxane,7 μm	340	非极性	中等或非极性半挥发物质	GC/HPLC
PDMS-DVB	PDMS-divinylbenzene,65 μm	270	中极性	极性挥发物质	GC
PDMS-DVB	PDMS-divinylbenzene,60 μm	270	中极性	常规用途	HPLC
PA	Polyacrylate,85 μm	320	极性	极性半挥发物质（酚类）	GC/HPLC
CAR-PDMS	Carboxen-PDMS,75,85 μm	320	中极性	痕量测定，气体，挥发性物质	GC
CW-DVB	Carcowax-divinylbenzene,65,70 μm	265	中极性	极性物质，尤其醇类	GC
CW-TPR	Carcowax-templated resin,50 μm	240	极性	极性物质	HPLC
DVB-CAR-PDMS	Divinylbenzene-carboxen-PDM S,50/30 μm	270	极性	极性物质，香料等，检测限宽（C3-C20）	GC

注: PDMS-聚二甲基硅氧烷; CW-聚乙二醇; PA-聚丙烯; DVB-二乙烯苯; Carboxen-碳分子筛

本课题中考察了PDMS (100 μm)、PDMS-DVB、PA、CW-DVB (65 μm) 四种Fiber在相同条件下对0.5g缬草药粉顶空萃取的效果。萃取的其他条件均为萃取时间: 30min; 萃取温度为60 $^{\circ}\text{C}$; 缬草粉质量为0.5g。考察了4个单峰情况及总峰面积与总峰数, 结果见表4-2:

表4-2: Fiber种类的考察

Fiber	乙酸龙脑酯	异戊酸	龙脑	23.3min	总面积	总峰数
PDMS	348811	无	33995	19038	736191	24
PDMS-DVB	107285	23195	48858	19113	270256	17
PA	143885	16861	57059	18880	328273	18
CW-DVB	156708	17922	34874	18029	490544	25

由上表可看出, PDMS虽然对异戊酸没有特定吸收, 但其在总峰面积上大大领先于其他种类涂层的Fiber, 且总峰数也较多, 综合考虑最终选择了涂层种类为PDMS的萃取头进行下面一系列萃取条件的考察。使用涂层种类为PDMS的萃取头在萃取温度为60 $^{\circ}\text{C}$; 萃取时间为30分钟; 萃取的缬草粉质量为0.5g的条件下, 其GC分析图谱如下图4-1:

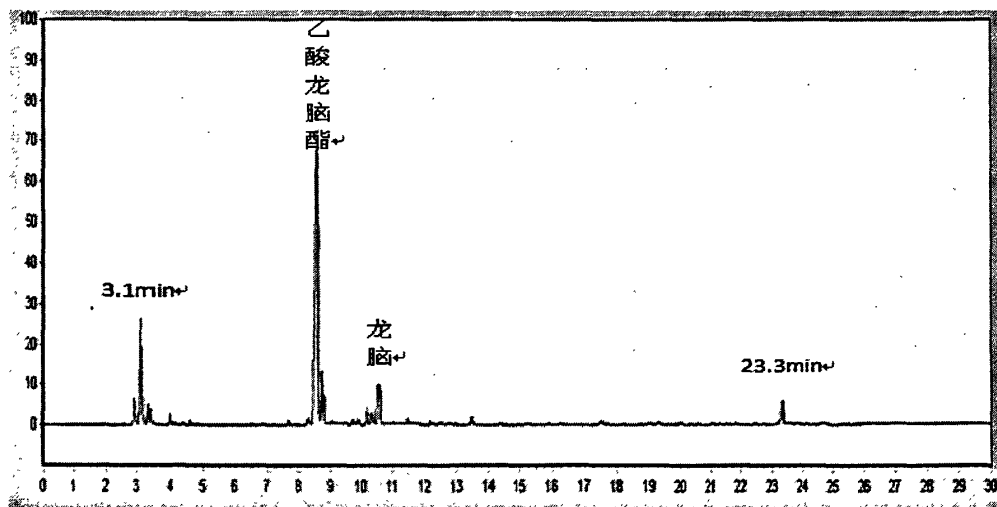


图 4-1: PDMS 在 60°C 萃取 0.5g 缬草粉 30min 的 GC 图谱

由于 PDMS 涂层对异戊酸无特定吸附, 为了不减少考察的峰数, 故在后面的条件考察中加以分离较好的 3.1min 处的峰代替异戊酸进行考察, 即考察 3.1min、乙酸龙脑酯、龙脑、23.3min 四个单峰情况以及总峰面积、总峰数。

2.2 缬草粉质量的考察

萃取物质量也是考察的要素之一, 质量过小, 萃取头涂层没有达到最大吸附, 分析效果会受影响; 质量过大, 在一定的容器体积内样品累积过厚, 底层较难挥发的物质不能挥发至上层, 吸附必然下降; 对易挥发物质而言, 吸附达到饱和会造成样品的浪费。本课题在萃取温度 60°C 下以 PDMS 顶空萃取样品 30min 条件下, 对萃取物质量勘察的 GC 色谱分析结果如下:

表 4-3: 缬草粉质量的考察

质量 (g)	3.1min	乙酸龙脑酯	龙脑	23.3min	总面积	总峰数
0.2	43323	329820	1342	24067	695980	25
0.5	148989	593163	32251	13979	1141052	25
1.0	171206	602247	44540	17402	1191604	27
2.0	214352	619690	45715	20976	1271061	26

从上图中的数据可以看出, 出峰时间较晚的难挥发物质 (23.3min), 质量小 (0.2g), 缬草粉较少可以使其易挥发出来, 质量增加 (0.5g 及 1g) 的时候反而出现降低, 这可能与缬草粉厚度增加后底层物质难挥发出来有关, 到 2g 的时候由于质量的成倍增加, 其峰面积又会增大。但我们还是以总峰面积及总峰数为主要参考因素。而 2g 时峰面积略大, 但不是很明显, 所以还是选择了 1g 为最佳萃取质量。

2.3 萃取时间的考察

萃取时间不同对萃取的最终效果也有着很大的影响,萃取时间过长虽然会使难挥发物质更多的累积,但同时也会使易挥发物质产生逃逸现象,因此,对萃取时间进行考察是十分必要的。

表 4-4: 萃取时间的考察

时间 (min)	3.1min	乙酸龙脑酯	龙脑	23.3min	总面积	总峰数
10	74973	272770	31544	8217	487939	17
20	66820	352904	30029	18782	649698	27
30	89334	428412	30029	25792	775476	25
45	82994	418168	30490	30610	769382	26
60	65312	282534	42578	41465	559655	23

30min 与 45min 的峰面积及出峰数较其他条件多,但 30min 与 45min 差距不大,为了节省萃取时间,故选择 30min 为最好萃取时间。

2.4 萃取温度的考察

萃取温度是 HS-SPME 的重要影响因素,萃取动态平衡的分配系数与温度有关。温度升高,分析物扩散系数增大,扩散速度随之增大,同时升温加强了对流过程,因此有利于缩短平衡时间,加快分析速度。但是升温会使分析物的分配系数减小,在固相涂层的吸附量减少,所以在使用 SPME 技术时应寻找最佳工作温度。本课题加热使用的方法为水浴加热。萃取温度考察见下表:

表 4-5: 萃取温度的考察

温度 (°C)	3.1min	乙酸龙脑酯	龙脑	23.3min	总面积	总峰数
30	67118	210597	20986	4137	370185	13
40	59954	289555	46093	6353	482585	17
50	38819	350521	46093	11164	561302	20
60	39143	230490	30407	19735	398930	17
70	37494	211215	30325	26495	382945	18

由上表中的数据可以看出, 50°C 时总峰面积及总峰数均为最高, 所以选择 50°C 为最佳萃取温度。

2.5 最佳萃取条件的确定

综合上面所有单因素考察的结果, HS-SPME 的最佳条件为: 1g 缬草粉装在固定容器内, 以涂层为 PDMS 的萃取头在 50°C 水浴温度下加热萃取 30 min。在最佳 HS-SPME 萃取条件下萃取后的气相色谱结果如下图 4-2:

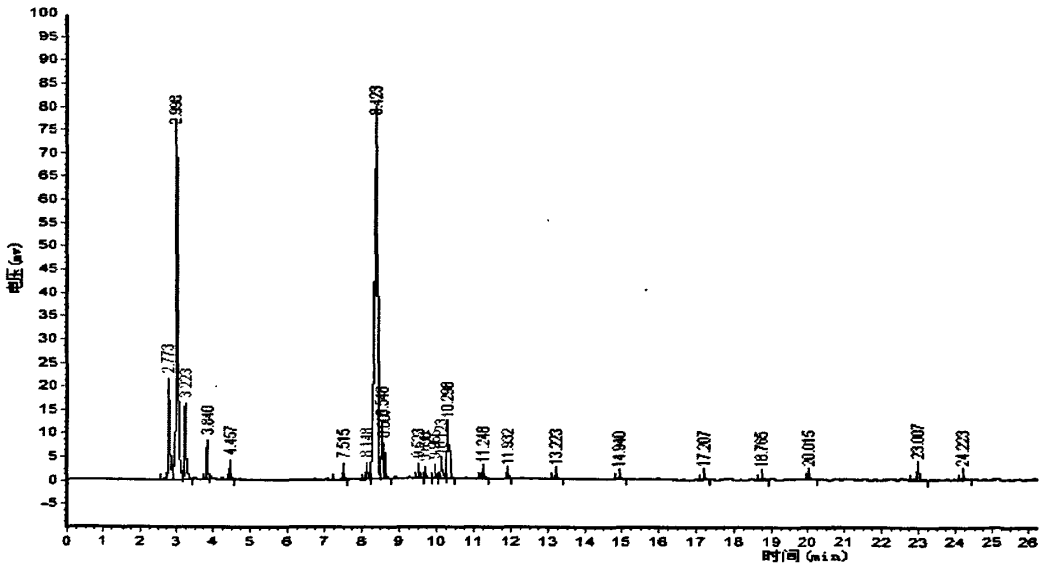


图 4-2: 最佳条件下的全药 GC 图谱

可见总峰面积明显增大, 且色谱图分离度良好。为了证明缬草全药的

HS-SPME-GC 结果并不完全等同于挥发油部位的 HS-SPME-GC 结果,我们以相同条件对乙醚溶解的缬草挥发油进行了 HS-SPME-GC 研究,色谱图如下图 4-3:

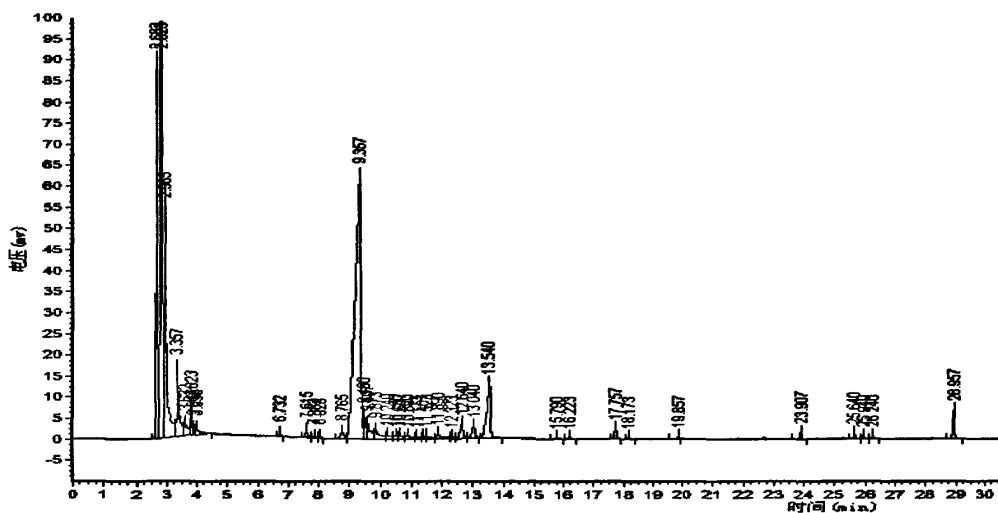


图 4-3: 最佳条件下的缬草挥发油 GC 图谱

可以看出两者的色谱图存在着很大的不同,说明 HS-SPME 可以将挥发油中没有的物质萃取出并进行分析。

第四章 缬草抗心律失常部位的血清药物化学研究

近年来,血清药物化学(Serum Pharmacochemistry, SPC)的研究方法在中药研究中得到了很大的发展^[8],许多学者采用此研究方法来探讨中药单方的有效部位、中草药药理药效的真正物质基础的研究以及作用机理等,取得了有意义的结果^[9]。但是采用血清药物化学的研究方法对缬草的有效部位的研究尚未见报道,用血清药物化学的研究方法对缬草药效物质基础进行深入的研究也尚未见报道;本课题在药理研究的基础上,对缬草各提取部位的血清药物化学进行了研究,以期从血清药物化学的角度阐述提取部位具有活性的原因。采用大鼠灌胃取血,固相微萃取顶空萃取(HS-SPME)技术制样,气相检测的方法进行。

1 仪器与试样:

1.1 试验仪器:

CLASS-GC10 色谱工作站,高纯 N₂(≥99.9%),高 H₂(≥99.9%);BP-211D 型十万分之一分析天平(德国 Satorius),JTMX-80-2 型台式离心机。

1.2 样品制备:

Wistar 大鼠 6 只,体重 170-230g,五个提取部位以及阴性每组一只。空腹下连续两天灌胃给药,每次剂量 15mL/kg^[57]。第二次灌胃结束后 1 小时断头取血,高速离心后取上层血清备用。

2. 方法与结果

2.1 试验方法:

采用优选的 HS-SPME 条件对各提取部位血清进行萃取后,迅速进入气相色谱进行考察,将考察得到的数据去掉阴性血清中的物质峰后与缬草药粉的 HS-SPME-GC 数据进行对比,观察是否有相同物质,如有则说明该物质以原型的方式进入到了血液循环。若出现了阴性血清和缬草药粉中均不具备的新物质则为代谢物质。

2.2 各提取部位血清的顶空固相微萃取-气相联用分析结果(HS-SPME-GC)

将各部位血清按 HS-SPME 最佳优选条件萃取后,与气相色谱联用进行分析,将不同部位血清气相色谱图累加如下图 5-1,其中为阴性血清在图中为蓝色曲线,挥发油部位血清在图中为红色曲线,乙酸乙酯部位血清在图中为绿色曲线,正丁醇部位血清在图中为粉色曲线,水部位血清在图中为浅绿色曲线。

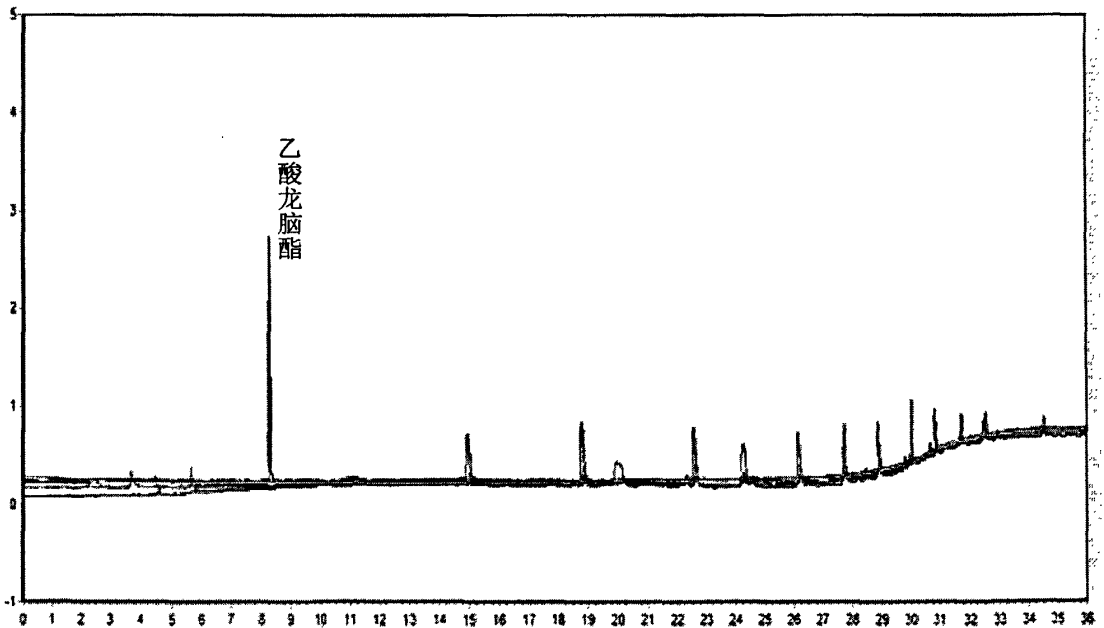


图 5-1: 各提取部位血清 HS-SPME-GC 全图

图 5-1 中的数据对比缬草全药 HS-SPME-GC 数据可知,清晰可见的只有挥发油部位有部分的乙酸龙脑酯以原型形式直接进入到了血清当中。其他部位峰小,难以进行分析,为了进一步说明各部位入血成分,我们对上图进行了放大如下图 5-2:

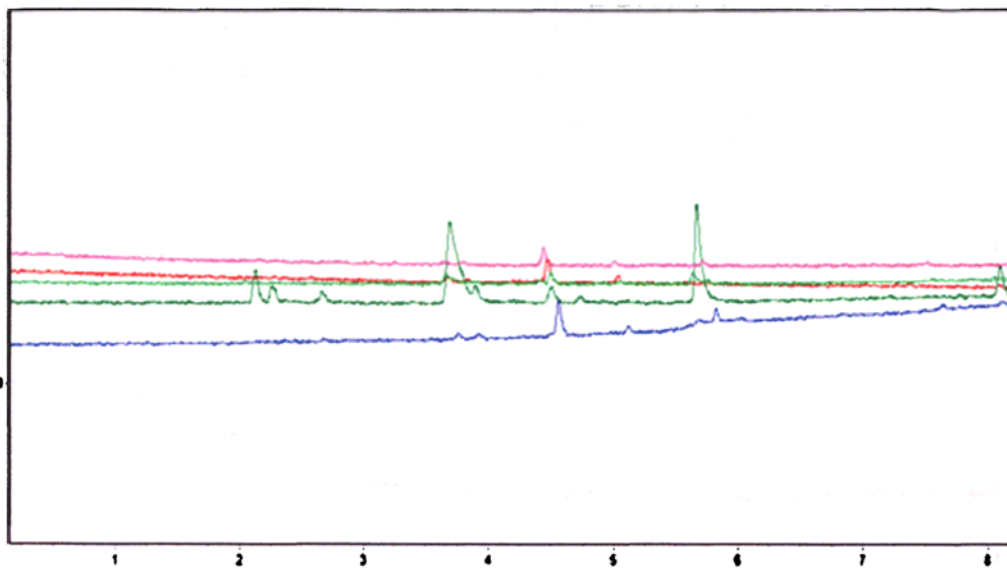


图 5-2 保留时间为 8 分钟前的放大谱图

图 5-2 中可以看出，与阴性血清相比，主要是乙酸乙酯部位（绿色）存在显著差异，在 2-3min，4.7min 与 8.2min 共比阴性（蓝色）多出 5 个峰，其他部位无显著性差异。

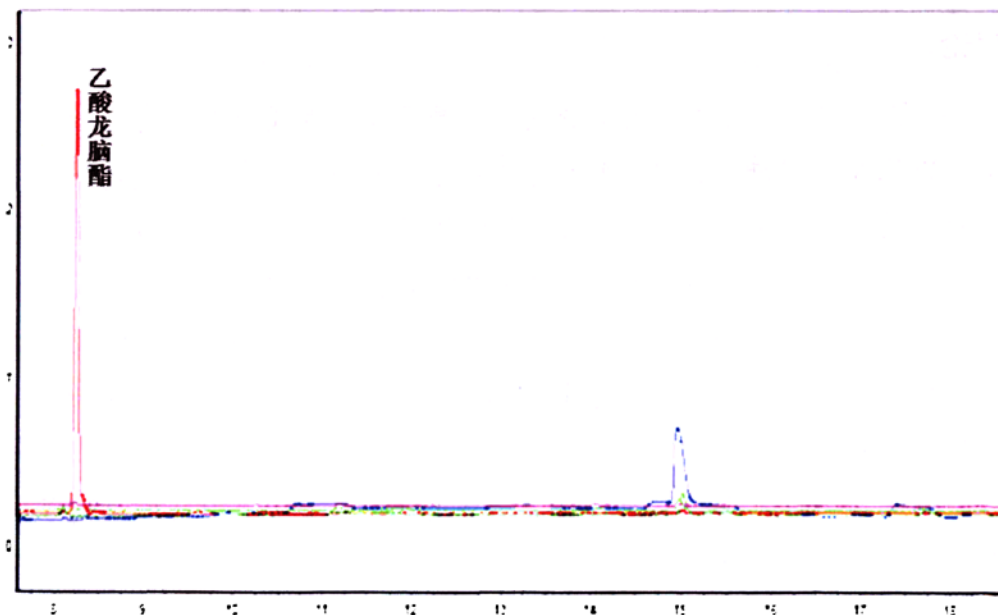


图 5-3: 保留时间为 8-18 分钟的放大谱图

可见 8-18 分钟放大谱图最明显的差别即为挥发油部位在 8.4min 左右的乙酸龙脑酯峰，这也是此次检测出的唯一一个直接进入血液代谢的成分，其他与阴性（蓝色）无明显差别。

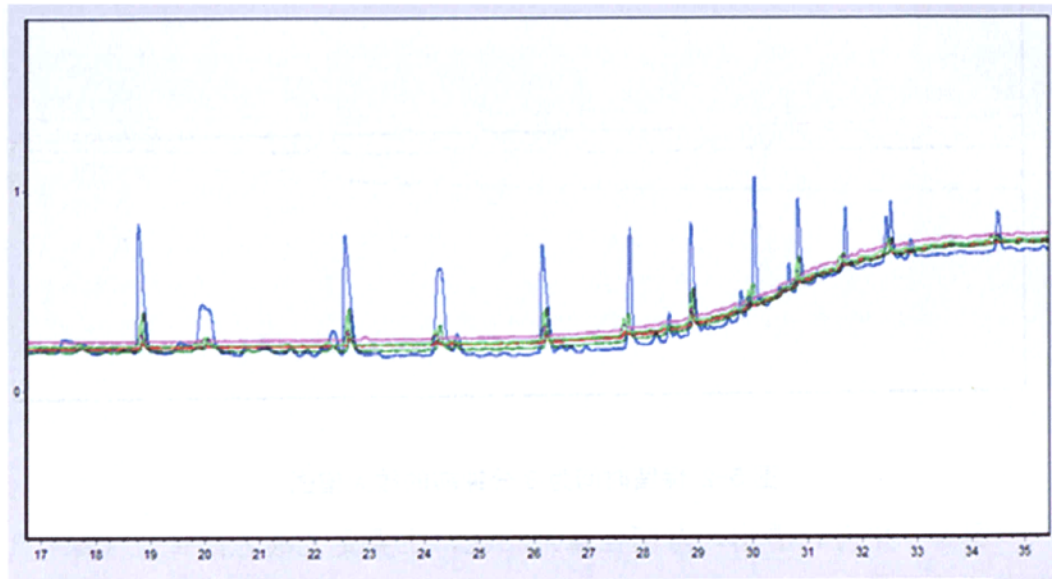


图 5-4: 保留时间 18-35 分钟的放大

18-35min 的放大图谱显示，在保留时间较长，也就是较难挥发的物质对比中，各提取部位与阴性几乎无差别。

3 讨论

各提取部位与阴性血清的对比说明：缬草挥发性成分中仅有乙酸龙脑酯部分以原型形式进入血清，其他物质或是无法进入血液循环或是被代谢为其他产物。在保留时间 0-8min，也就是极易挥发部分，乙酸乙酯部位与阴性有较大差别，但不是原药材中的成分，说明乙酸乙酯部位在代谢中产生了新的易挥发成分，可能为乙酸乙酯部位有抗心律失常活性的原因；有着很好的抗心律失常活性正丁醇部位与的水部位成分由于极性较大，挥发性较差，故检测出峰较少。

缬草油作为挥发性成分最多的活性部位，在此次实验中只检测到了乙酸龙脑酯一个原型成分峰，可能与其中大部分脂溶性成分与血清中蛋白等成分结合，难以在固相微萃取中挥发出来有关。这需要进一步的研究。

结语与创新

本论文采用多学科交叉的研究方法和现代科学技术,对缬草抗心律失常的活性物质进行了较系统研究,这对阐释该传统中药的药效物质基础具有重要意义,其创新性体现在以下几个方面:

1. 在现代药理学跟踪下,采用超临界 CO₂ 萃取法、溶剂分离方法和现代色谱分离技术,确定了缬草抗心律失常的活性部位和活性组分,并从活性组分中分离出 11 个单体成分,鉴定了其中 8 个化合物,其抗心律失常的单体化合物活性正在筛选中。从而为缬草用于临床治疗心律失常疾患提供了科学依据,也为进一步研究其抗心律失常的药效物质基础和作用机理奠定了良好的基础。
2. 首次采用顶空固相微萃取-气相色谱联用分析技术,对缬草萃取物的化学成分进行了分析研究,能有效分析缬草中相关活性成分,从而为中药研究探索了一种新的分析方法。
3. 首次对缬草抗心律失常活性部位进行了血清药物化学研究;采用相同的分析方法,比较研究了缬草全药成分与提取部位血清中化学成分的对应关系,两者的色谱难以找到对应关系,提示缬草抗心律失常活性成分可能为其代谢产物。这对于探讨缬草抗心律失常的活性物质具有重要参考意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1986. 27 (73)
- [2] 陈磊. 中国缬草属药用植物的生药鉴定和资源利用研究 [A]. 第二军医大学学位 论文. 2002. 5 : 45-47
- [3] 张振学, 姚新生. 药用植物草的化学研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2000. 9, 10 (3): 226
- [4] 黄龙, 宋旭艳, 孙海辉, 马舒翼. 缬草油化学成份 GC/ MS 分析研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002 , 24 (2) : 11-13
- [5] Dunaev VV. Farmakol Toksikol [J] .1987, 50(6): 33-37
- [6] Grusla D. Dtsch Apoth-ztg [J], 1986, 126(41): 2249-2253
- [7] Bounthanh C, et al. Valepotriates: a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* [J] . 1981, 41(1): 21-23
- [8] 张人伟. 马蹄香环烯醚萜类成分的分离鉴定 [J] . 云南植物研究, 1986, 8(1): 107-109
- [9] Yuping Tang, Xin Liu, and Biao Yu. Iridoids from the Rhizomes and Roots of *Valeriana jatamansi* [J] . *Nat. Prod* [J]. 2002, 65, 1949-1952
- [10] Yuanqiang Guo, Jing Xu, Yushan Li, et al. Iridoids and Sesquiterpenoids with NGF-Potentiating Activity from the Rhizomes and Roots of *Valeriana fauriei*. *Chem* [J]. *Pharm. Bul.* 2006. 1, 54(1) 123-125
- [11] Britta Schumacher, Silke Scholle, Josef Ho · · lz1, et al. Lignans Isolated from Valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors [J]. *Nat. Prod.* [J] 2002, 65, 1479-1485

- [12] Anna Lisa Piccinelli, Swizly Arana, Armando Caceres, et al. New Lignans from the Roots of *Valeriana prionophylla* with Antioxidative and Vasorelaxant Activities[J]. Nat. Prod. 2004, 67, 1135-1140
- [13] Drobot' ko VG, et al. Antibacterial activity of alkaloids obtained from *Valeriana officinalis*, *chelidonium majus*, *Napharaluteum*, and *Asarum europaeum*[J]. Tetrahedron Letters, 1976, (4): 645-657
- [14] Kurt T, et al. The Structure of the principal alkaloid from *Valeriana officinalis*[J]. Tetrahedron Letters, 1966, (4): 445-447
- [15] Kurt T, et al. Isolation, structure, and synthesis of alkaloids from *Valeriana officinalis*[J]. Acta Chem Scand, 1967, 21(1): 53-55
- [16] Johnson RD, et al. Isolation of actinidine from *Valeriana officinalis*[J]. Phytochemistry, 1971, 10(1): 3334-3336
- [17] Burchard F, et al. Valeramine, a Tertiary monoterpene alkaloid from valerian. Angew Chem(Enged) [J] .1970, 9(11): 891-893
- [18] Fursa NS, et al. Study of the flavonoid composition of common valerian of the Asian part of the USSR[J]. Farm Zh. 1980, (3): 72-74
- [19] Mariel Mardera, Haydee Violab, Cristina Wasowskia, et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS[J]. Pharmacology, Biochemistry and Behavior . 2003 (75) : 537 545
- [20] 明东升. 中药蜘蛛香和缬草类的形态组织学研究[J]. 上海医科大学学报, 1993, 20(3): 205-207

- [21] 中国药材公司.《中国中药资源志要》[M].科学出版社,1994. 12,17
- [22] 陶涛,朱全红.缬草醇提物的镇静催眠作用研究[J].中药材.2004 .3,27 (3): 209
- [23] 袁珊琴.缬草属植物化学和药理学研究进展[J].国外医学药学分册 1992,19(6): 346-351
- [24] 侯困章.中药提取物[M].中国医药科技出版社.2004. 3,1: 265-267
- [25] 黄宝康,郑汉臣,秦路平.缬草属植物的镇静催眠作用及机制[J].Journal of Pharmaceutical Practice 2007, 25 (3):134
- [26] Yoshiteru Oshima, et al. Antidepressant Principles of Valeriana fauriei Roots[J].Chem Pharm Bull (Tokyo), 1995 43 (1): 169-170
- [27] 郑汉臣《药用植物学》[M].第三版,北京:人民卫生出版社,1999. 260
- [28] Simmen-U, et al. Extracts and constituents of Hypericum perforatum inhibit the binding of various ligands to recombinant receptors expressed with the Semliki Forest virus system[J]. J-Recept- Signal- Transduct- Res, 1999 19(1-4): 59-74
- [29] 张宝恒.缬草乙醇提取物(VES)对心血管的作用[J].药学学报 1982, 5: 382-384
- [30] 薛存宽,蒋彦章,杨晶,等.神农缬草挥发油对动物心血管系统的作用[J].中西医结合杂志,1988, 理论研究特集:8-12.
- [31] 尹虹,薛存宽,叶建明,等.缬草提取物抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J].微循环学杂志,2000, 10 (1):12-14.
- [32] 王玉良,徐森根,范世藩.缬草抗心律失常的心肌细胞电生理学观察[J],中华心血管病杂志,1979 7 (4): 275-282.
- [33] 贾健宁,张宝恒.缬草提取物(V3d)对心血管系统的作用[J].广西中医学院学报,1999, 16(1): 40-42.
- [34] 黄峥嵘.缬草提取物对兔心室肌细胞离子通道的影响[A].武汉大学

- 学位论文. 2004. 5: 22
- [35] 薛存宽, 何学斌, 张书勤, 等. 缬草环烯醚萜抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志. 2005. 8, 14 (15): 1969
- [36] Bounthanh C, Bergmann C, Pbeck JP, et al. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Medica* [J], 1981, 41: 21-28
- [37] Bounthanh C, et al. Valepotriates: a new class of cytotoxic and antitumor agents [J]. *Planta Med*, 1981, 41 (1): 21-23
- [38] 张人伟. 马蹄香环烯醚萜类成分的分离鉴定 [J]. 云南植物研究, 1986, 8 (1): 107-109
- [39] 叶建明, 易粹琼, 薛存宽. 缬草波春诱导胃癌细胞凋亡与信号分子表达的关系 [J]. 中华消化杂志. 2004. 10, 24 (10): 619-620
- [40] 郭济贤. 缬草类专题研究 [M]. 《常用中药材品种整理和质量研究》, 第 2 册, 福建科学技术出版社, 1997. 490
- [41] 陈玲, 贾汝汉, 丁国华, 等. 缬草油对 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制探讨 [J]. 中华肾脏病杂志. 2003. 6, 19 (3): 168
- [42] 李颖, 薛存宽, 何学斌, 等. ^{99m}Tc -ECD 示踪评价缬草提取物对小鼠脑血流灌注的影响 [J]. 放射学实践. 2003. 2, 19 (2): 133
- [43] 陈柏华. 宽叶缬草对兔血管平滑肌细胞增殖及迁移抑制作用的实验研究 [J]. 数理医药学杂志 2004, 17 (3): 281-282
- [44] 高燕, 蔡丽, 李海燕等. 甘肃醉鱼草化学成分研究 (II) [J]. 中药材 2007, 6 (30) : 667-669
- [45] 楚英杰. 常用口服抗心律失常药物的临床应用要点. 医师进修杂志 (内科版) 2004, 7 (1): 6-7
- [46] 赵志刚, 史卫忠, 王孝蓉. 抗心律失常药的分类、进展及安全应用. 临床药物治疗杂志 2007, 5 (3) : 5-9
- [47] 成建国. 常用抗心律失常药物的临床应用. 西藏医药杂志 2008, 29 (3) : 21-24

- [48] 张赞彬,谈毅婷.甘薯渣中多酚类化合物的分离与结构鉴定[J].食品研究与开发 2007, 28(12):120-122
- [49] New Lignans from the Roots of *Valeriana prionophylla* with Antioxidative and Vasorelaxant Activities. Anna Lisa Piccinelli, Swizly Arana, Armando Caceres, et. J. Nat. Prod. 2004, 67, 1135-1140
- [50] Britta Schumather, Silke Scholle, Josef Holzl, et al. Lignan isolated from valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors. [J]. Jnat. Prod 2002, 65, 1479-1485
- [51] 韩华. 博士论文《接骨木根皮促进骨折愈合有效部位化学成分和药理作用研究》. 黑龙江中医药大学, 2006 年
- [52] Lignans Isolated from Valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors. Britta Schumacher, Silke Scholle, Josef Holzl, J. Nat. Prod. 2002, 65, 1479-1485
- [53] 詹红生. 含药血清实验方法及其在中药新药研制中的应用展望[J], 浙江中医学院学报. 2000, 24(2): 79-80
- [54] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术—中药现代化. 药学前沿. 2002, 4(2): 1-2
- [55] 杨奎, 郭力, 周明眉等. 中药血清药化学与中药血清药理学协同研究方法初探[J]. 中药药理与临床. 1998, 14(4): 41~42
- [56] 张宁. 六味地黄丸体外成分分析方法的建立及大鼠血中移行成分的研究[D]. 黑龙江. 黑龙江中医药大学. 硕士学位论文. 2003. 05
- [57] 丁岗, 崔瑛, 盛龙生等. 地黄血清药物化学的初步研究[J]. 中国天然药物. 2003, 1(2): 34-37
- [58] 熊纓, 余荣华, 周岐新. 大鼠血清中喹啉酸含量的气质联用测定[J].

第三军医大学学报. 2007, 2 (29): 350-354 .

[59] 应建波, 张迪. SPME 与 GC/MS 相结合检验尿液中的氯胺酮[J]. 中国法医学杂志. 2005, 6 (20): 342-343

附图

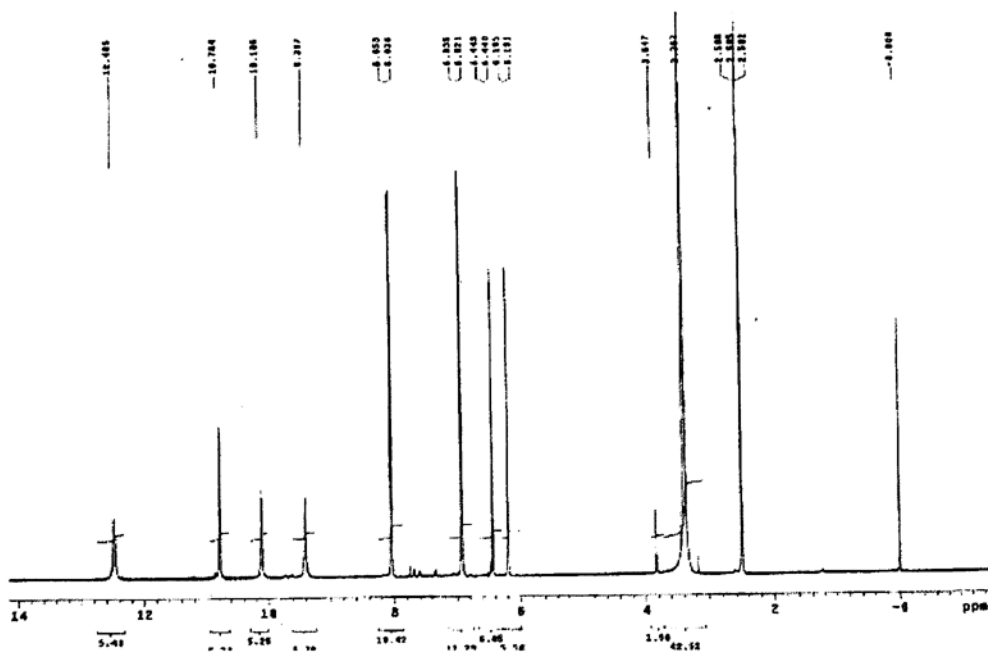


Fig1 $^1\text{H-NMR}$ of Compound I

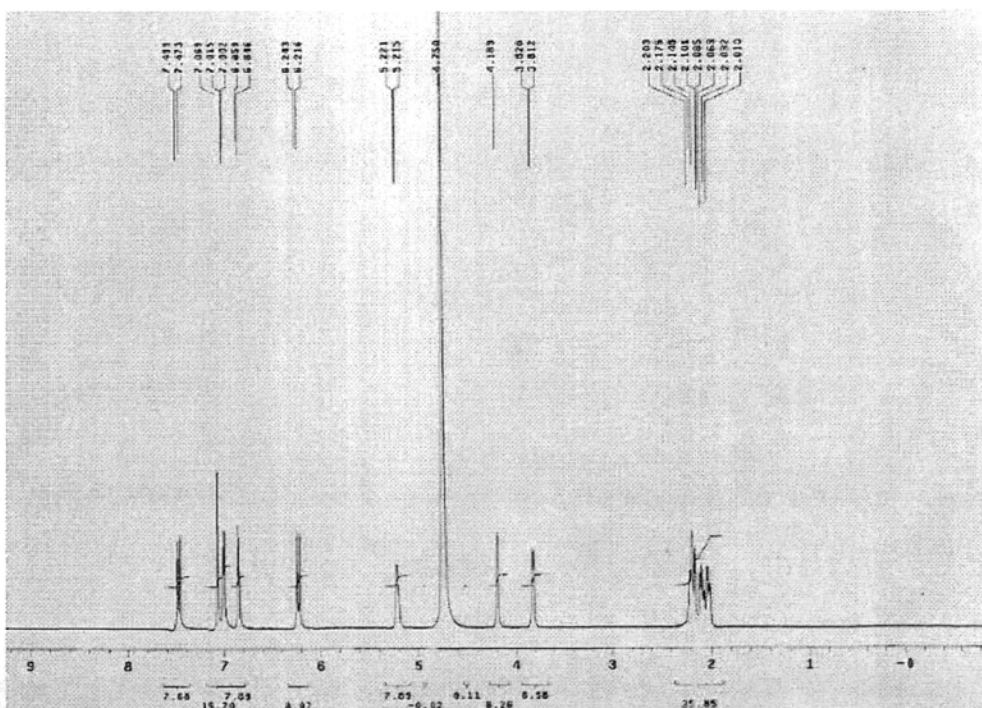


Fig2 $^1\text{H-NMR}$ of Compound II

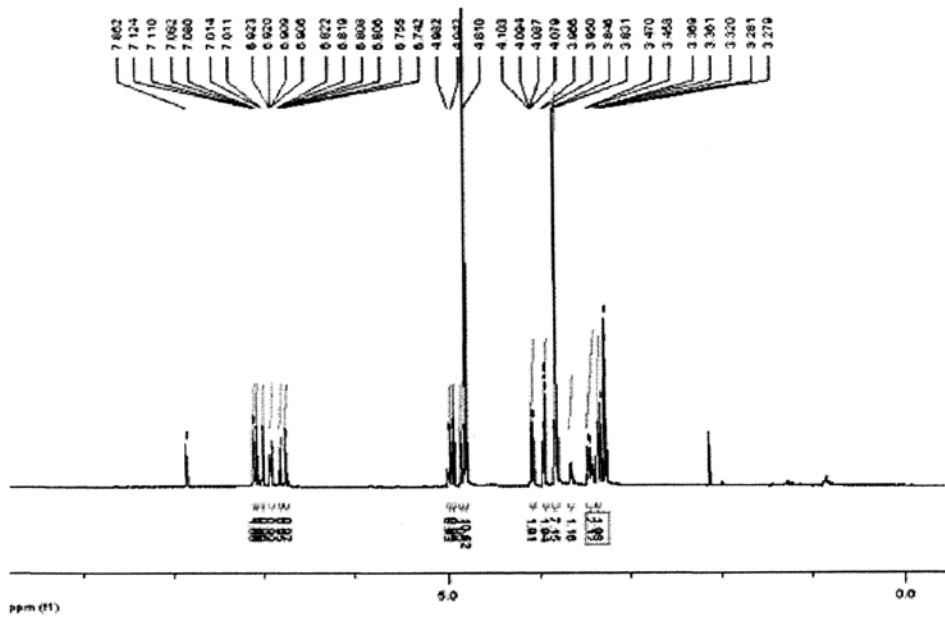


Fig3 ¹H-NMR of Compound III

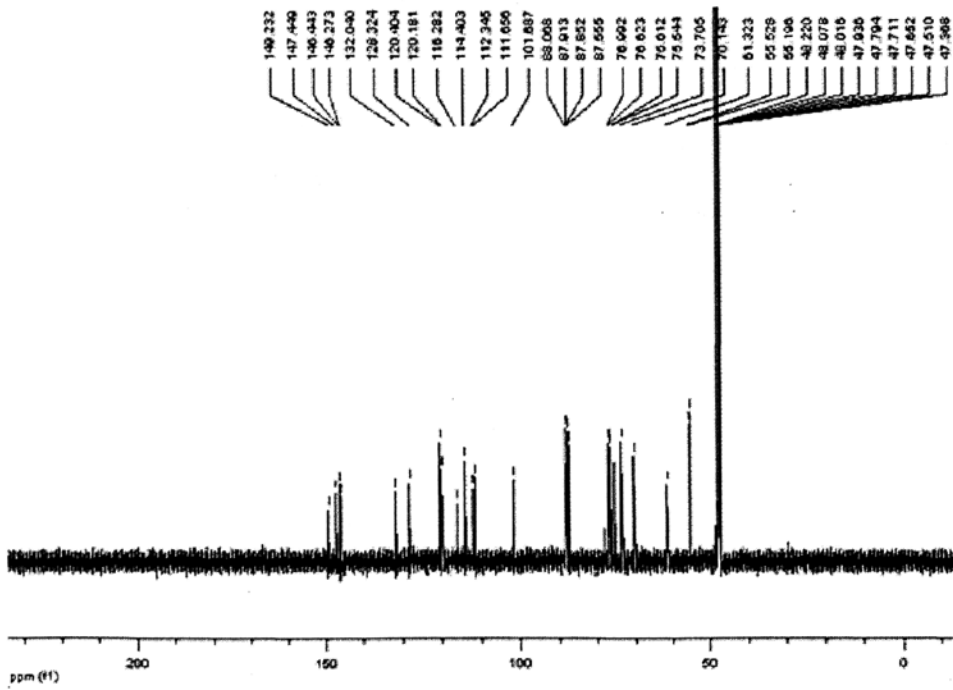


Fig4 ¹³C-NMR of Compound III

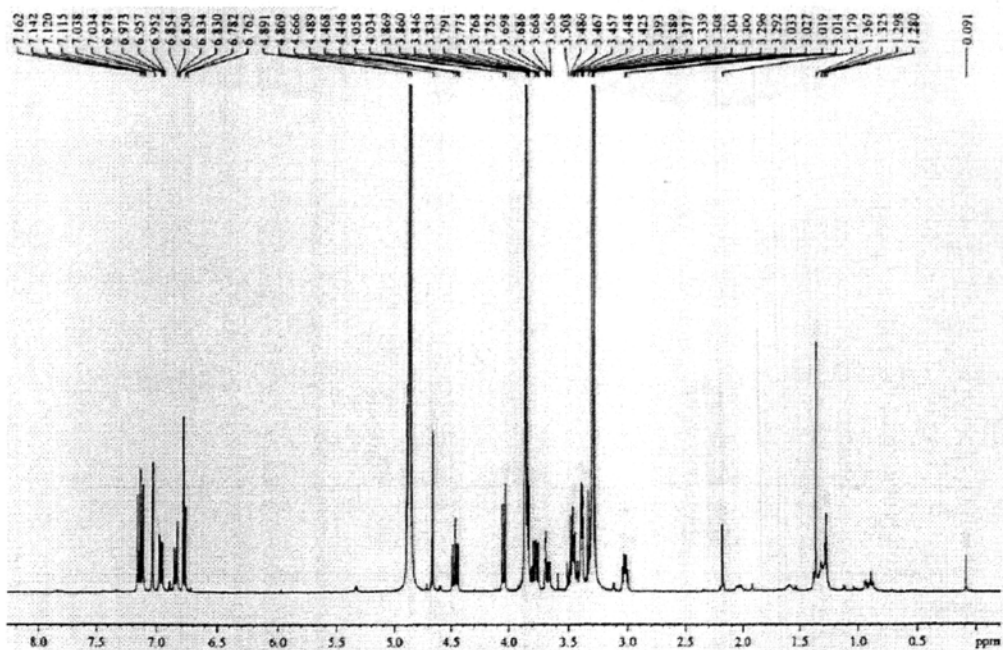


Fig5 $^1\text{H-NMR}$ of Compound IV

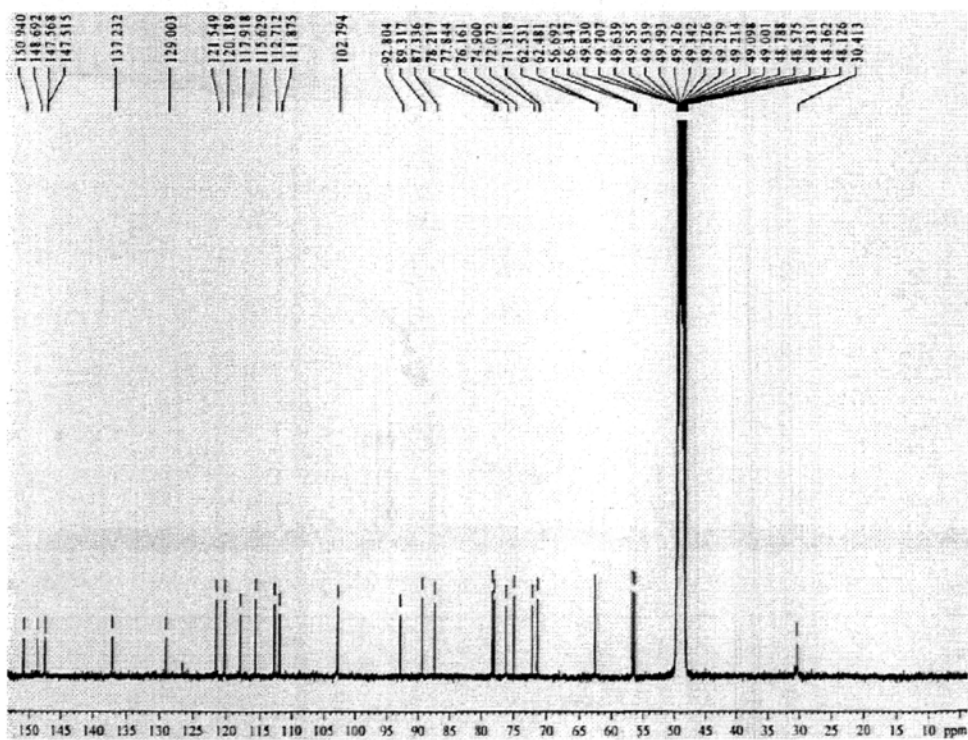


Fig6 $^{13}\text{C-NMR}$ of Compound IV

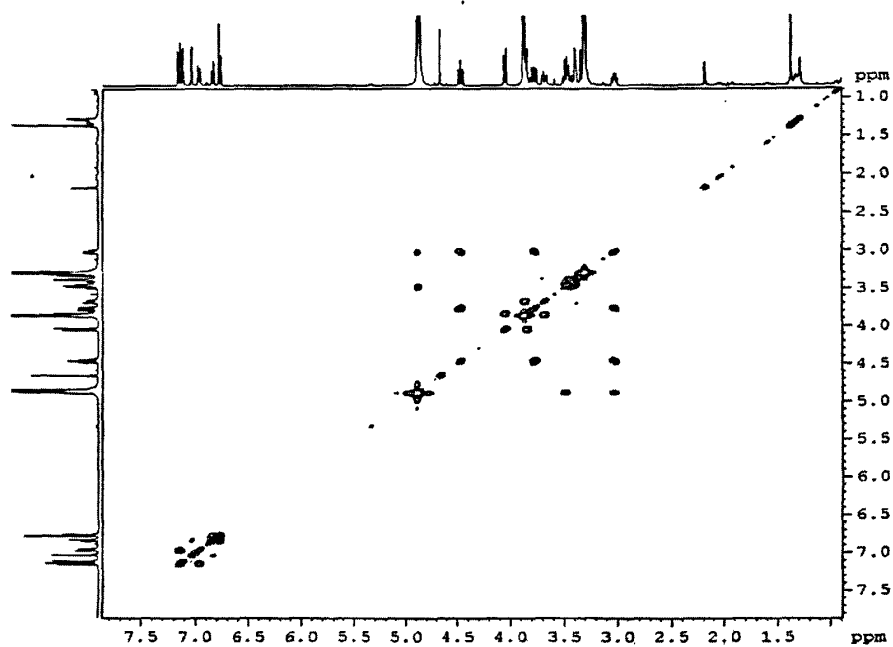


Fig7 ^1H - ^1H COSY of Compound IV

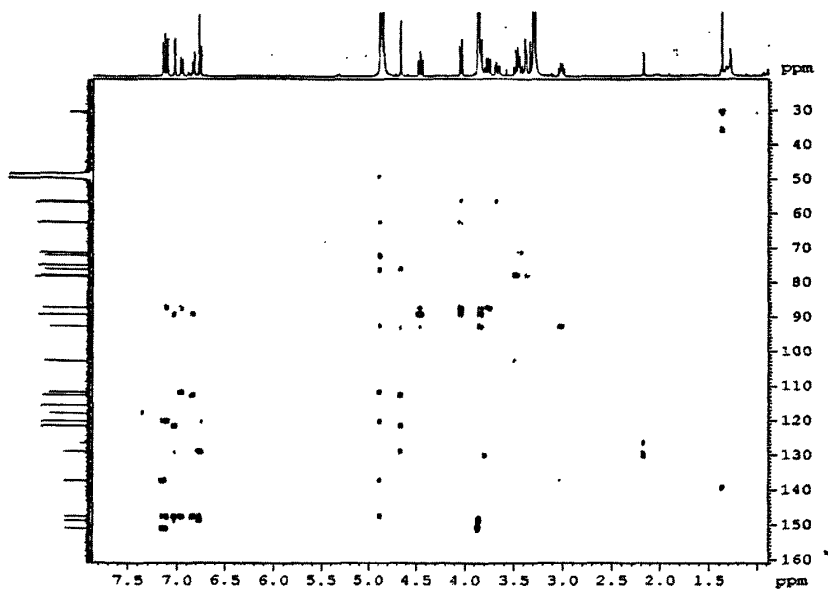


Fig8 HMBC of Compound IV

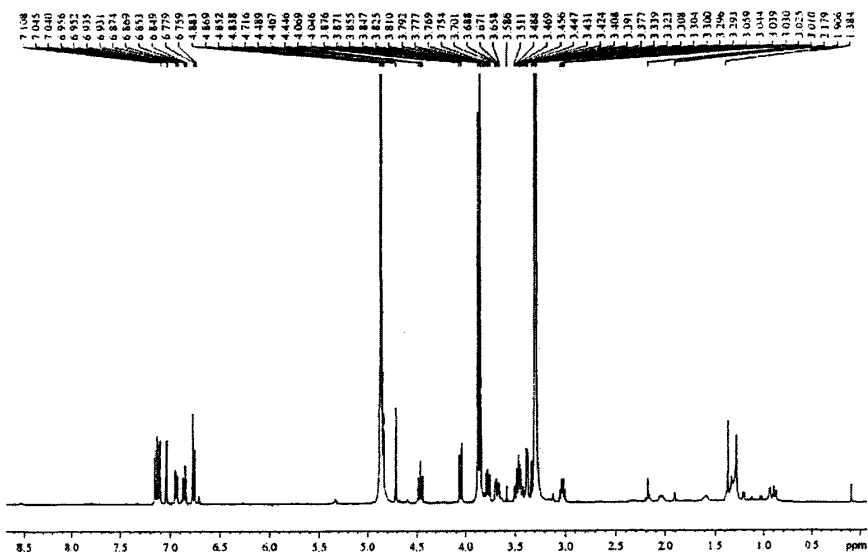


Fig9 ¹H-NMR of Compound V

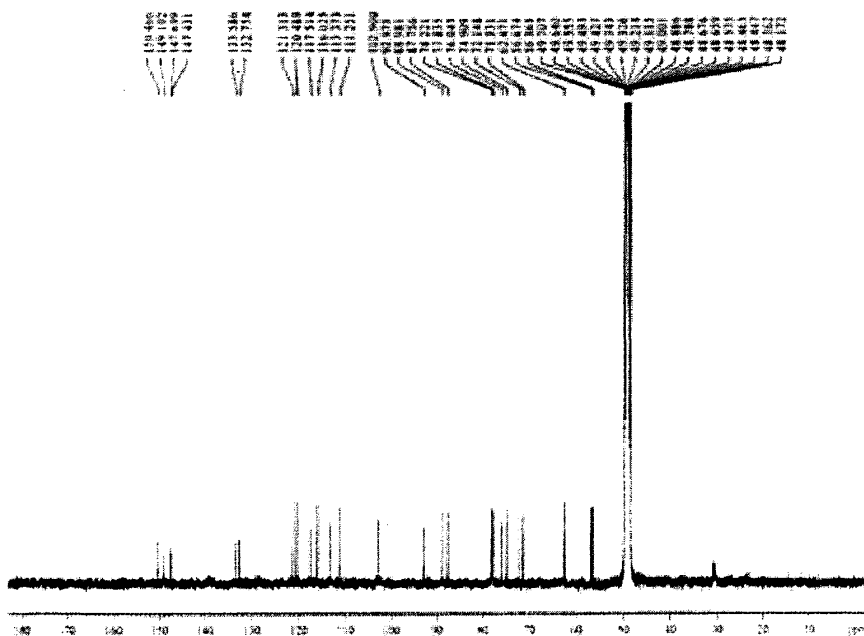


Fig10 ¹³C-NMR of Compound V

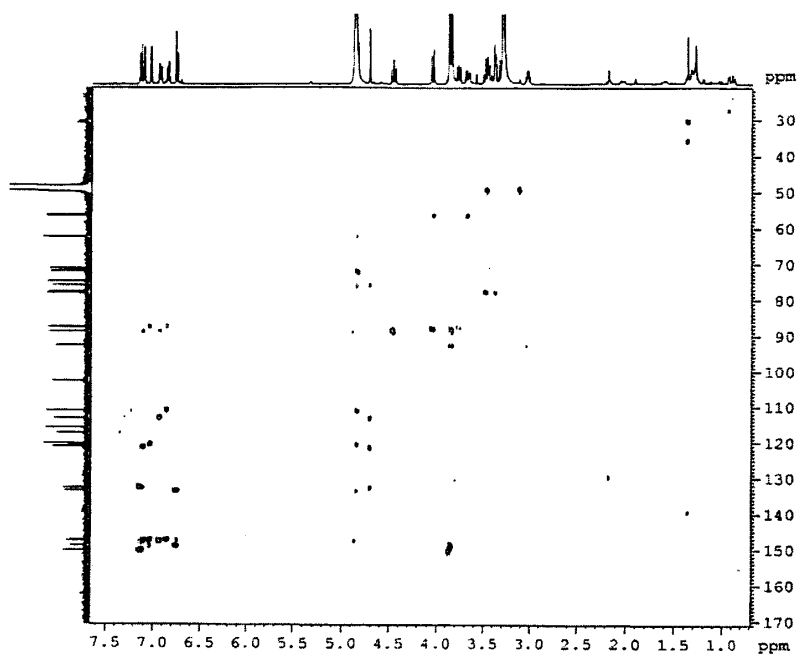


Fig11 HMBC of Compound V

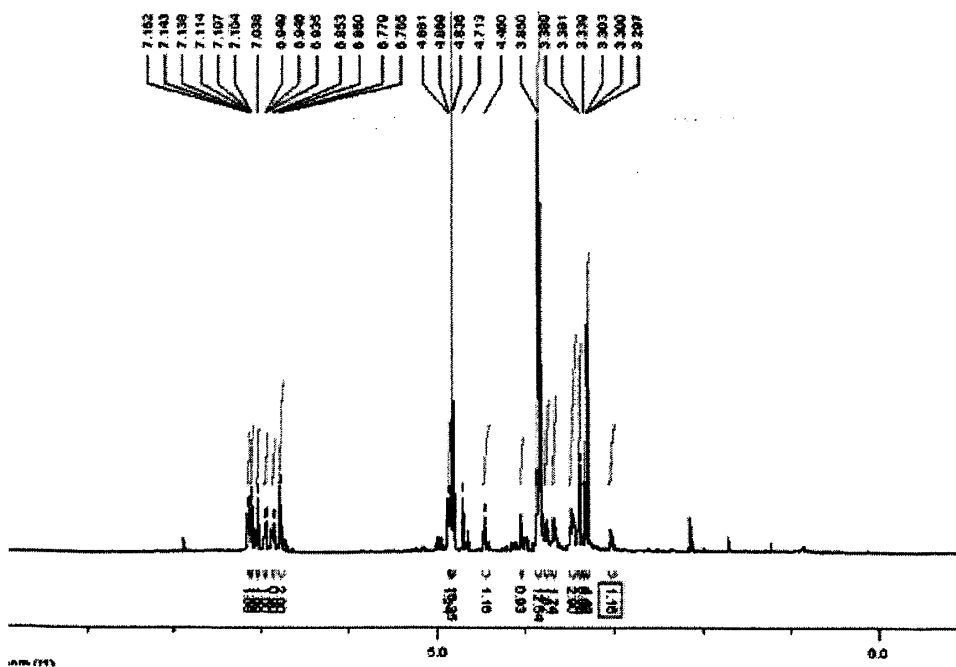


Fig12 $^1\text{H-NMR}$ of Compound VI

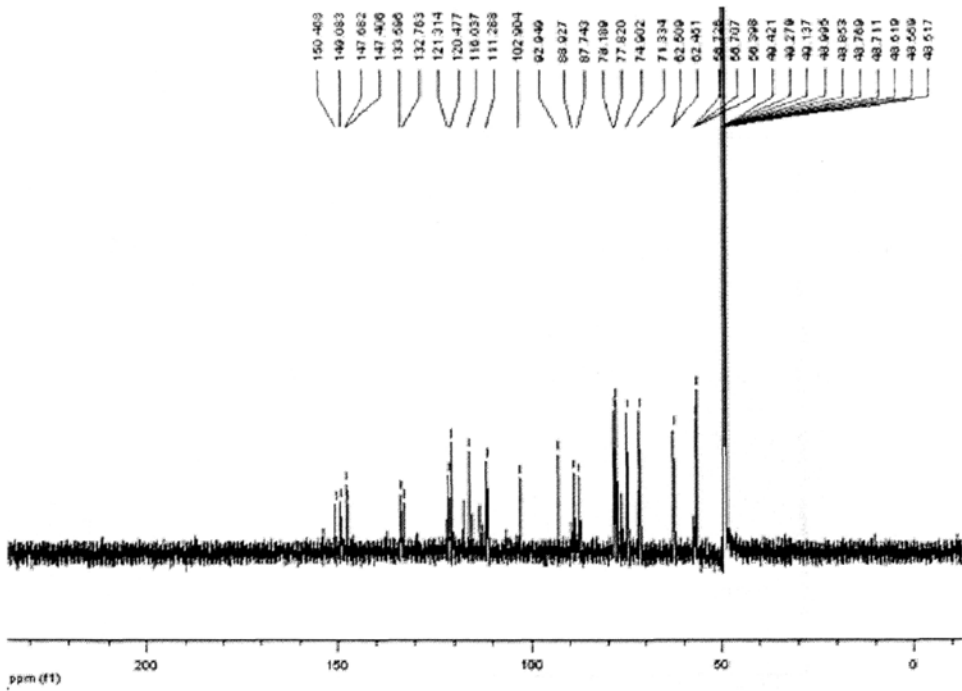


Fig13 ^{13}C -NMR of Compound VI

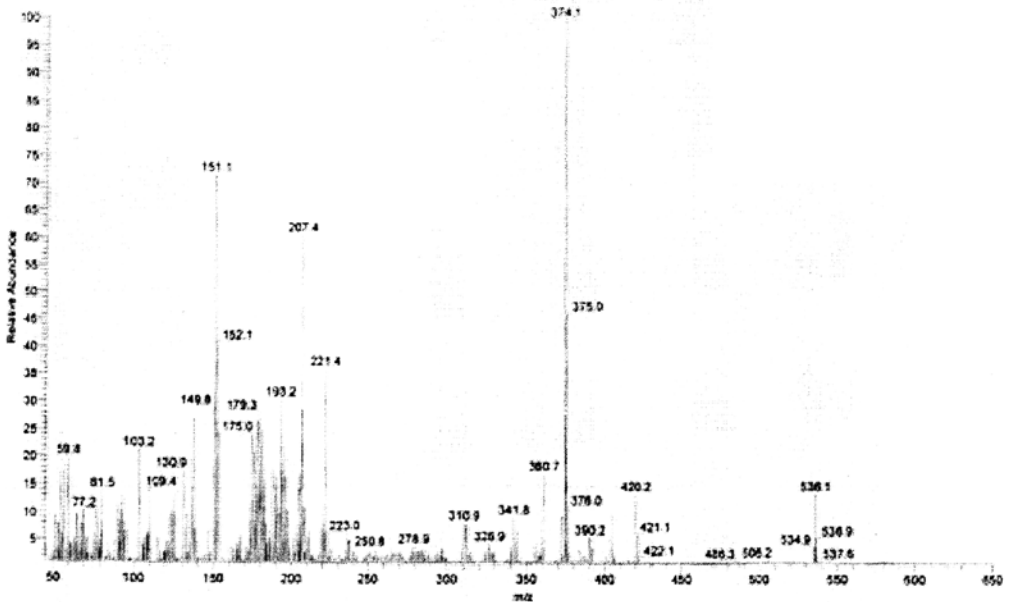


Fig 14 EI-MS of Compound VI

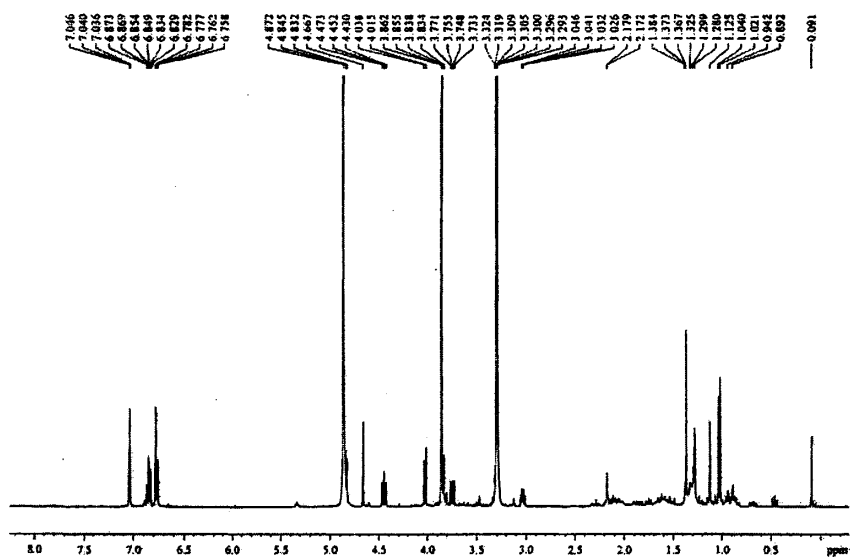


Fig15 $^1\text{H-NMR}$ of Compound VII

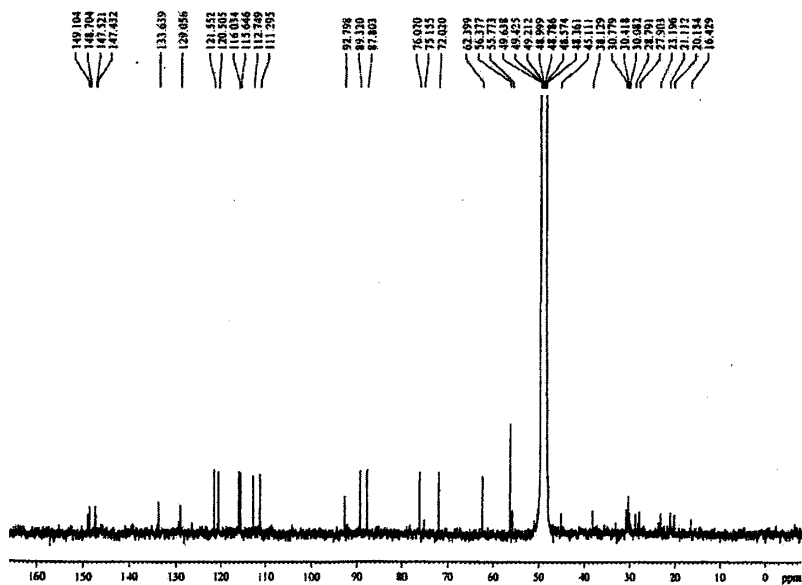


Fig16 $^{13}\text{C-NMR}$ of Compound VII

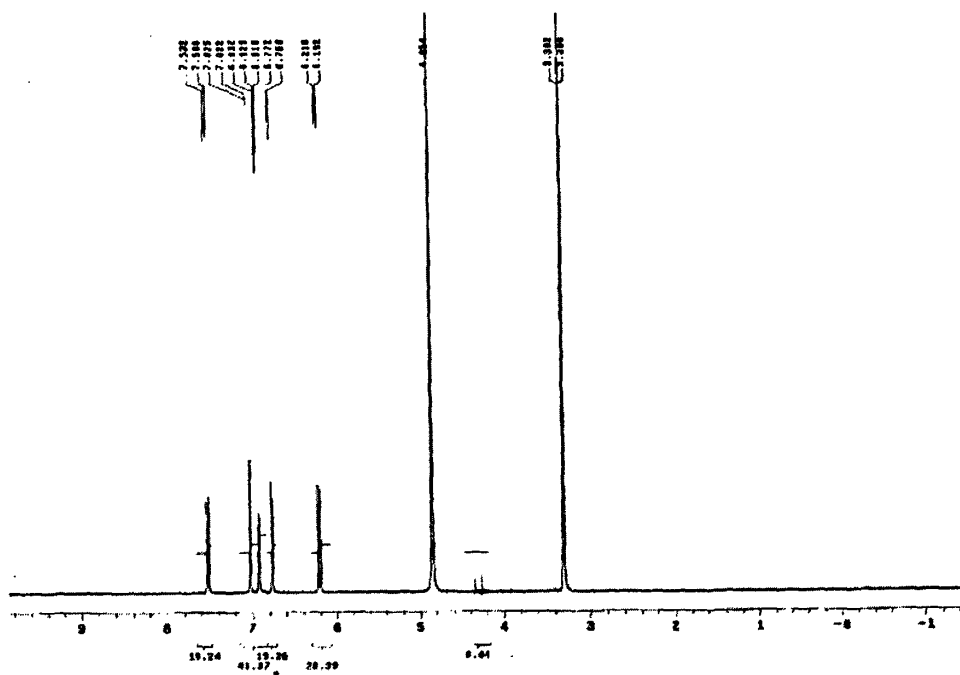


Fig17 $^1\text{H-NMR}$ of Compound VIII

已发表和待发表文章

1. 龚占峰, 陈进文, 章文颖等. 中药复方化妆品防晒添加剂质量分析. 亚太传统医药 已录用. 2009, 2 (5): 55-57
2. 龚占峰, 段雪云, 刘焱文等. 缬草水溶性成分的提取和分离. 审稿中
3. ZHOU Ying, FANG Ying, GONG Zhan-Feng. A New Aromdrendane From *Valeriana officinalis*. Chinese Journal of Natural Medicines. (审稿中)
4. 段雪云, 方颖, 龚占峰等. 缬草属植物综合研究概况. 中国药师. 2008. 11 (7): 793-796
5. 段雪云, 龚占峰, 陈树和等. 缬草抗心律失常有效部位的指纹图谱研究. 中药材. 2009. 6
6. 段雪云, 龚占峰, 周颖等. 缬草抗心律失常活性部位的筛选. 中国药师. 排版中

致 谢

本论文是在导师刘焱文教授的悉心指导和帮助下完成的。三年来，导师在学习、工作和生活中给予我无微不至的关怀、教导和帮助。导师渊博的理论知识、严谨求实的治学态度、创新的科学思维、活跃敏捷的学术思想和孜孜不倦的敬业精神都将令我受益终身。在此，谨向我的导师致以衷心的感谢和诚挚的敬意！

感谢本课题组方颖老师、文莉老师、王光忠老师、吴和珍老师、杨艳芳老师、晷俊峰老师、何再安老师、张建超老师、段雪云老师对我试验的悉心指导，感谢课题组全体老师对我的帮助。

感谢华中师范大学叶德连老师、湖北大学柴仕淦老师、张金枝老师提供的帮助。

感谢刘红兵、周颖、李桥、师磊、金惠等师兄师姐对我试验的指导和帮助。

感谢周威、赵英博、陈进文、陆毅、张明、孙进、艾伦强、台小华、万威、陈刚、卢山等同学的帮助。

感谢徐斌、章文颖、何丽珊等师弟师妹们的帮助。

感谢家人和朋友对我的鼓励和支持，他们是我努力进取的精神支柱和坚实后盾。

感谢所有曾经给予我关怀和帮助的朋友们！