

湖北中医学院

---

博士学位论文

---

缬草抗心律失常的药效物质及作用机理研究

---

姓名：段雪云

---

申请学位级别：博士

---

专业：中医基础理论

---

指导教师：刘焱文

---

20090518

## 中文摘要

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 系败酱科 (*Valerianace*) 缬草属 (*Valerian*) 植物, 根及根茎是主要入药部位。具有镇静安神、解痉止痛之功效, 主治心神不安, 心悸失眠, 癫狂, 风湿痹痛, 痛经等。现代药理研究表明, 缬草具有较好的抗心律失常作用。

为了阐释缬草抗心律失常作用的物质基础, 在前人研究的基础上, 采用学科交叉的研究方法, 通过超临界  $\text{CO}_2$  萃取法和溶剂法, 将缬草分为不同提取部位; 然后以乌头碱、氯仿两种诱导剂诱导心律失常的模型为指标进行药理筛选, 确定了缬草抗心律失常的主要活性部位。缬草水溶性物质部位有稳定的降低室颤发生率, 推迟心律失常发生时间, 减少死亡率的作用; 超临界  $\text{CO}_2$  萃取物和水液部位对氯仿诱发小鼠心室纤颤具有明显的拮抗作用。氯仿、乌头碱两种诱导剂均能诱导心律失常的发生, 但其诱发机理不同。缬草水溶性物质部位对两种诱导剂诱导的心律失常均有明显的对抗作用, 说明其抗心律失常机制是多方面的, 符合中药多成分多靶点的作用机理。

采用色谱分离法和波谱鉴定法等现代科学技术, 从缬草抗心律失常有效部位中分离和鉴定了 5 种化合物, 分别为青刺尖木脂醇苷 (prinsepiol-4-O- $\beta$ -D-glucoside)、8-羟基松脂醇苷 (8-hydroxy pinoresinol-4-O- $\beta$ -D-glucoside)、 $\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)、kanokoside A、绿原酸 (Chlorogenic acid)。

利用现代电生理学中的膜片钳技术, 将上述分离得到的化合物对转基因 Kv1.5 细胞进行了抗心律失常活性筛选, 从中筛选出 2 个具有抗心律失常活性的化合物, 分别为青刺尖木脂醇苷、8-羟基松脂醇苷; 并对青刺尖木脂醇苷进行了作用机理探讨, 研究表明, 青刺尖木脂醇苷对 Kv1.5 钾通道的抑制, 说明青刺尖木脂醇苷的抗心律失常可能主要是通过抑制钾通道, 延长动作电位和有效不应期而达到治疗目的, 初步阐释了缬草抗心律失常的作用机制, 所以青刺尖木脂醇苷有

望成为治疗抗心律失常药。

在抗心律失常物质基础研究的基础上,采用高效液相色谱法对缬草水溶性部位进行了指纹图谱研究,标定了 15 个共有峰,归属了 4 个共有峰,分别是青刺尖木脂醇苷、8-羟基松脂醇苷、绿原酸和橙皮苷;并对不同产地、不同采收时间以及缬草近缘品种进行了比较;建立了可靠的分析方法,符合《国家食品药品监督管理局》颁布的中药注射剂指纹图谱技术要求。从而为规范缬草属植物的药用来源及采收季节提供了参考依据。

采用高效液相色谱法对缬草中抗心律失常有效成分青刺尖木脂醇苷进行了含量分析研究,建立了灵敏度高、重现性好、可靠性强的含量测定方法。从而为有效控制缬草药材的质量,保证用药安全提供了科学依据。

**主题词: 缬草; 抗心律失常; 活性成分; 膜片钳; 质量分析**

Study on the drug effect substances and the mechanism of  
arrhythmic effects of *Valeriana officinalis* L.

**Speciality:** Phytochemistry

**Author :** duan xueyun

**Tutor :** Prof. Liu yanwen

**ABSTRACT**

*Valeriana officinalis* L. belongs to department of Patrinia of valerian, its roots and rhizomes are the main parts of medicine which have sedative and spasmolytic effects, attending uneasy, palpitation insomnia, mania, rheumatism Bitongkang, dysmenorrheal, etc. Modern pharmacological studies have shown that valerian has anti-arrhythmic effect.

In order to clarify the material basis of the anti-arrhythmic effects of *Valeriana* we adopted interdisciplinary research methods based on the previous studies. Through supercritical CO<sub>2</sub> extraction method and solvent method the *Valeriana* was divided into different valerian extracts, and then using aconitine alkali and chloroform to induce arrhythmia model for pharmacological screening indicators to determine the main active

anti-arrhythmic site of Valeriana. The water-soluble parts of Valerian stably decrease the incidence of ventricular fibrillation, postpone arrhythmias time and reduce the mortality. Supercritical CO<sub>2</sub> extract and water-liquid parts have more pronounced antagonism to chloroform-induced ventricular fibrillation in mice. And the other parts also have anti-arrhythmic effects in different extent. Although inducing arrhythmia through different mechanisms, the water-soluble part of Valerian have altogether obvious antagonistic effects to the two agent chloroform and aconitine induced arrhythmia, while the other parts have different response. The all above reflect the mechanisms for its anti-arrhythmic is multifaceted and there are multiple active ingredients.

Using chromatographic separation and spectral identification method, we can separate and identify five kinds of compounds from the effective anti-arrhythmic parts of Valeriana as follows: Green barbed tip lignan glycosides (prinsepiol-4-O-β-D-glucoside); 8-hydroxy resin glycosides (8-hydroxypinoresinol -4-O-β-D-glucoside); β-sitosterol; kanokoside A; Chlorogenic acid.

Using modern electrophysiological patch-clamp technique to investigate these compounds separated above, there are two

compounds that have been proved had anti-arrhythmic activity: Green barbed tip lignan glycosides and 8-hydroxy resin glycosides. We explored the action mechanism of the green lignan glycosides and the results show that the Green barbed tip lignan glycosides through inhibiting potassium channels and prolonging effective refractory period to achieve the anti-arrhythmic therapeutic purposes. Green barbed tip lignan glycosides are expected to become anti-arrhythmic drug. The paper initially explain the mechanism of its anti-arrhythmic.

On the basis of basic research of anti-arrhythmic substances we utilized high-performance liquid chromatography to research the fingerprint of water-soluble parts of Valeriana and demarcate 15 common peaks. Valeriana from different original Sources, different harvesting time and Valeriana close related species were also compared, establishing a reliable analytical method in accordance with the "Chinese Pharmacopoeia" and the State Food and Drug Administration issued technical standards. Thereby the research provides a reference for the Valeriana medicinal plants harvesting sources and season.

Using high-performance liquid chromatography to analyze active anti-arrhythmic ingredients Green barbed tip lignan

glycosides of *Valeriana* content has high sensitivity, good reproducibility, powerful reliability, through which we can effectively control *Valeriana* medicinal quality and provide a scientific basis to ensure drug safety.

**KEY WORDS:** *Valeriana officinalis* L; anti-arrhythmia;

**Patch Clamp; Active Substance; quality analysis**

## 缩 略 词 表

英文缩写	英文全称	中文全称
AF	atrial fibrillation	心房颤动
AP	Action potential	动作电位
APD	Action potential duration	动作电位时程
$^{13}\text{C}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ nuclear magnetic resonance	$^{13}\text{C}$ -核磁共振
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer	无畸变极化转移增益法
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EI-MS	Electron impact ionization mass spectrum	电子电离质谱
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HH-COSY	HH correlation spectroscopy	H, H 相关二维核磁共振谱
HMQC	Heteronuclear multiple quantum Coherence	异核多量子相干谱
HMBC	Heteronuclear multiple bond Coherence	异核多键相干谱
$^1\text{H}$ -NMR	$^1\text{H}$ nuclear magnetic resonance	$^1\text{H}$ -核磁共振
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
$I_{Kur}$	Ultra piddelayed rectifier potassium current	超快速延迟整流钾电流
I-Vcurve	Current-voltage curve	电流-电压曲线
IR	Infrared spectrophotometry	红外光谱
m/z	mass-to-charge ratio	质荷比
mp	melting point	熔点
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
UV	Ultraviolet spectrophotometry	紫外光谱
$V_h$	Holding potential	维持电压
$V_t$	Test potential	测试电压



## 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他任何个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：段雪云 日期：2009年6月4日

## 学位论文使用授权说明

本人完全了解湖北中医学院关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：

按照学校要求提交学位论文的印刷本；学校有权保存学位论文的印刷本；在不以赢利为目的的前提下，学校可以公布学位论文的部分或全部内容。（保密论文在解密后，遵守此规定）

论文作者签名：段雪云 导师签名：刘/志  
日期：2009年6月4日

## 前 言

随着现代生活节奏的加快,人民生活水平的提高,心脑血管疾病对人类造成极大的威胁,世界上每年都有成千上万的心血管疾病患者死亡,心律失常是心血管系统疾病中的常见病,多发病,其所导致的死亡比例呈逐年上升的趋势,严重威胁人类的生命和健康。

严重心律失常是心脏病的主要死因之一,尽管以临床电生理检查和经导管射频消融为突出标志的心律失常治疗方法取得了巨大的成就,但利用药物预防和治疗心律失常的发生仍是降低心律失常患者死亡率、提高心脏病患者生活质量的主要手段之一。目前临床上使用的抗心律失常西药已有 50 种以上,一般按药物对心肌细胞动作电位的作用来分为四大类 (Vaughan Williams 法): I 类药抑制  $O$  相除极,被称为膜抑制剂;按抑制程度强弱及对不应期和传导速度的不同影响,再分为 Ia、Ib 和 Ic 亚类,分别以奎尼丁、利多卡因和恩卡尼作为代表性药物;II 类为肾上腺素  $\beta$  受体阻滞剂;III 类延长动作电位时限和不应期,以胺碘酮为代表性药物;IV 类为钙内流阻滞剂,以维拉帕米为代表性药物。近年又有 Sicilian Gambie 分类法。以上这些西药的不足之处是,既能抗心律失常,但使用不当又可诱发心律失常,因此给临床用药和患者安全带来一定的困难。

中药一般价廉易得,不良反应较少,且具有多部位、多靶点等综合作用优势,是目前的研究热点。中药治疗心律失常的临床应用日渐增加,但多停留在临床经验的层面,随着现代电生理基础的发展,特别是膜片钳技术的发明和应用,使中药抗心律失常的研究越来越深入。近年来,国内先后开发研制了几种抗心律失常中药,如蝙蝠葛碱、小檗碱、小檗胺、苦参碱、粉防己碱等。其中,苦参碱已应用于临床,但发现其抗心律失常作用并不明显,而缬草临床观察其口服毒性低、作用较理想。

缬草 (*valeriana officinalis* L.) 为败酱科缬草属植物, 其入药部位是根及根茎, 大部分分布在温带地区。传统医学认为缬草有安心神、祛风湿、行气血、止痛的功效; 主治心神不安、心悸、失眠、癫狂、脏燥、风湿痹痛、腕腹胀痛、痛经、经闭、跌打损伤。现代药理研究表明, 缬草提取物对由乌头碱、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; 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, 也能明显对抗大鼠由结扎左冠状动脉前降支诱发的早期缺血性心律失常。

为了探讨缬草抗心律失常的药效物质和作用机理, 本论文在前人研究的基础上, 采用中药化学、分析化学、药理学、电生理学等多学科交叉的方法, 确定了缬草抗心律失常的活性部位; 从活性部位中分离纯化得到 5 个单体化合物, 并鉴定了它们的结构; 筛选出 2 个抗心律失常的活性化合物; 对主要化合物进行了抗心律失常的作用机理研究; 同时对缬草的有效部位进行了指纹图谱研究, 对活性成分进行了含量分析。从而为阐释缬草抗心律失常的药效物质和作用机理提供了一定的依据, 为构建该药材与国际接轨的质量评价体系奠定了良好的基础, 也为其进一步深度开发提供了一定的依据。

## 第一章 缬草属植物的研究概况

缬草，英文名 Valerian，来源于拉丁语“valere”<sup>[1]</sup>；缬草（*V.officinalis* L.）为败酱科(Valerianaceae)缬草属(valeriana L.)植物，多年生草本，多数可作药用，根及根茎是其主要入药部位。缬草属植物药用历史悠久，欧洲在 16 和 17 世纪时，多用作镇静剂和解痉剂以治疗精神紊乱性疾病(如癫痫、歇斯底里症等)、剧烈咳嗽、便秘等；1983 年，缬草被列入《欧洲药典》用作镇静剂；在德国和荷兰，缬草的有效成分已经成为商品上市；前西德于 1988 年已上市商品名为 Valmane 的缬草酯混合物(标准配比为：didrovaltrate 80% ,valtrate 15% ,acevaltrate 5%)。在我国缬草属植物的药用历史也较早，明代李时珍的本草纲目记载有缬草属植物蜘蛛香，谓其根能“辟瘟疫，中恶邪精，鬼气尸疰”<sup>[2]</sup>；1977 年版中国药典曾收载马蹄香(*V. jatamansi* Jones)<sup>[3]</sup>。

为了更好地开发利用缬草属药用植物资源，现将国内外对缬草属药用植物的植物资源、生药学、化学成分、药理作用及临床应用等方面的研究结果简要综述如下。

### 1 植物资源

缬草属植物在全世界约有 250 种，大多数分布于温带地区，主产于欧洲和亚洲温带地区<sup>[4]</sup>；我国自东北至西南均有分布，黄宝康<sup>[5]</sup>等对中国缬草属植物进行了全面的分类整理，我国共有 30 种，4 变种，2 栽培种，并发现 2 新种(凤凰缬草、轮叶缬草)，2 个新栽培变种(红花中国缬草、白花中国缬草)，均可作为缬草类药材的新资源植物。缬草属植物作为药用植物，目前应用较多的有缬草（*Valeriana offeinalis* L.），蜘蛛香（*Valeriana jatamansi* Jones），日本的北海缬草（*V. officinalis* var *latifolia*），印度缬草（*V. wallichii*DC）和墨西哥缬草（*V. edulis* Meyer）<sup>[6]</sup>。除缬草外，还有以下同属植物的根及根茎亦作缬草入药<sup>[7]</sup>，黑水缬草(*V.amurensis* Smir.ex Kom)、宽叶缬

草(*V.officinalis* L.var. *Latifolia* Miq)、毛节缬草(*V.alternifolia* Bunge)、土耳其斯坦缬草(*V.turkestanica* Summ)、细花缬草(*V.meonantha* C.Y. Chenget H.B.Chen)、长序缬草(*V.hardwickii* Wall)、川滇缬草(*V.rhodoleuca* C.Y.Chenget H.B.Chen)、唐古特缬草(*V.tangutica* Bat)又名小缬草、香草仔;缬草(*V.pseudofficinalis* C.Y.Chenget H.B.Chen)又名拔地麻,该种过去一般常鉴定为缬草(*V.officinalis* L.),但陈虎彪把欧洲原产及我国栽培的缬草进行详细比较发现,我国种与欧洲缬草尚可明显区分,因此对其学名进行了重新拟定。

## 2 生药学研究

国外对缬草的生药学研究报道很少,缬草(*valeriana officinalis* L.)在本草书籍中未见记载,仅记载其同属植物蜘蛛香,蜘蛛香始载于《滇南本草》“马蹄香(即蜘蛛香),一名鬼见愁,形似小牛舌,叶根黑,采枝叶入药,味苦、性寒<sup>[8]</sup>。1977年版中国药典(一部)记载蜘蛛香性状及显微鉴别特征如下:本品根茎呈圆柱形,略扁,稍弯曲,有分枝,表面灰褐色,有紧密的环节及突起的点状根痕,顶端略膨大,具茎、叶残基;质坚实,不易折断,断面灰棕色,可见筋脉点排列成环;根多数长4~10cm,直径约0.2cm,质脆,气特异,味微苦辛;本品粉末灰棕色,淀粉粒甚多,单粒类圆形、长圆形或广卵形,有的一端尖突,脐点裂缝状、三叉状或点状,有的可见层纹,复粒由2~4粒组成,薄壁组织含黄棕色物,有网纹及具缘纹孔导管仁<sup>[3]</sup>。

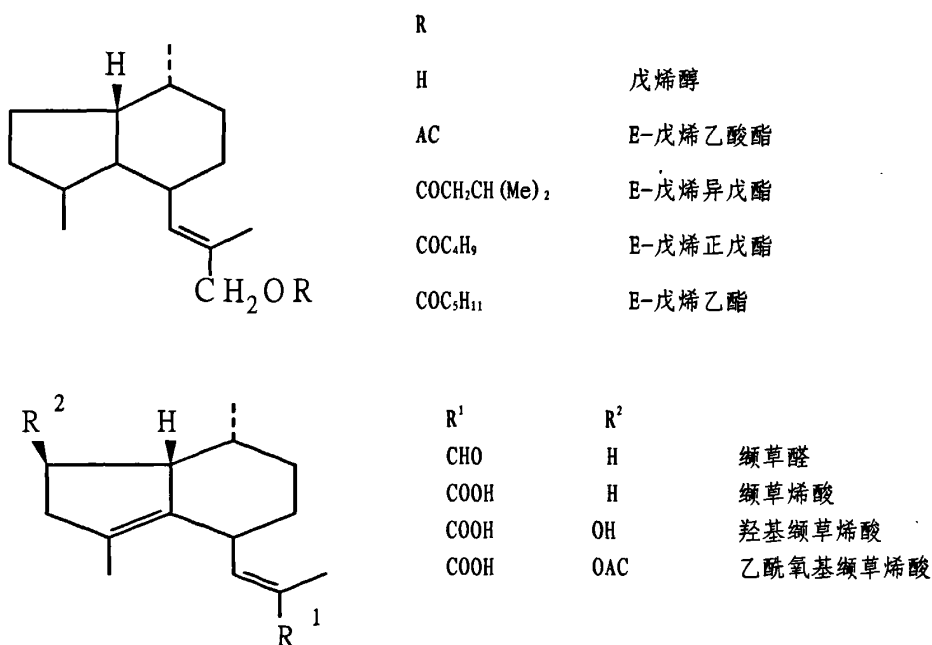
郭济贤<sup>[9]</sup>等对我国缬草属16种植物叶毛茸进行了显微观察,结果表明,腺毛多呈棒槌状,腺头多细胞,腺柄单细胞,罕为多细胞;非腺毛多为单细胞,少为2~7个细胞,具明显的疵点,此项结果支持缬草属的经典分类。江泽荣<sup>[10]</sup>等对我国辽宁产缬草进行过生药学研究,对其原植物形态、生药性状、组织及粉末特征作了较详细的报道。明东升<sup>[11]</sup>等对蜘蛛香、缬草、宽叶缬草和黑水缬草进行了系统形态组织学研究。但关于缬草属的生药学特征还有待进一步深入研究。

### 3 化学成分研究

缬草属植物主要含有挥发油、环烯醚萜、黄酮、生物碱和氨基酸等类型化学成分。其中生物碱和黄酮多存在于缬草属植物的地上部分，环烯醚萜多存在于缬草属植物的根部，而单萜及倍半萜作为挥发油的组分存在于根部。

#### 3.1 挥发油

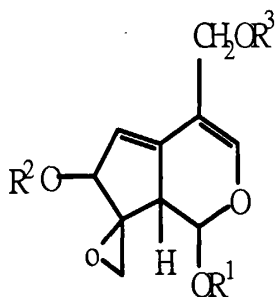
缬草属植物含挥发油0.5%~2.0%，其成分较为复杂，随着生态环境的不同，挥发油中所含成分有一定差异。国内外对10多个品种进行分析得到40多个成分，以单萜和倍半萜为主。倍半萜成分因其生物活性而倍受人们重视，主要成分为缬草烯酸(Valerenic acid)、缬草酮(Valeranone)和阔叶缬草甘醇(kessylglycol)，其中缬草烯酸和阔叶缬草甘醇是缬草属植物特有的<sup>[12]</sup>。



#### 3.2 环烯醚萜类

包括环烯醚萜及其酯和苷，其中主要含二氢缬草醚酯(didrovaltrate)和缬草三酯(valtrate)，缬草三酯又称缬草素。他们在保存过程中易产生降解。环烯醚萜可能为缬草属植物的镇静、抗抑郁、抗肿

瘤等活性的主要物质基础。



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
Aav	Aav	Ac	乙酰氧基缬草素
Iv	Iv	Ac	缬草素
Iv	H	Iv	7-表去乙酰基异缬草素
Aiv	Iv	Ac	1-β-乙酰缬草素
Iv	Ac	Iv	异缬草素
Iv	Ac	Ac	二乙酰基缬草素
Miv	Iv	Ac	高缬草素1
Iv	Ac	Miv	高缬草素2
Iv	Ac	Aav	11-乙酰缬草素
Iv	Hiv	Ac	羟基缬草素
Iv	Aic	Ac	异高乙酰缬草素
Cr	Iv	Ac	千里光缬草素

### 3.3 黄酮类成分

缬草中含有槲皮素(querctin)、芹菜素(apigenin)、茨菲醇(kaempferol)、金合欢素(acacetin)、腾黄菌素(luteolin)等黄酮类成分。从缬草中最新分离的2S(-)橘皮苷(2S-hesperidin)和蒙花苷(linarin),发现两者都有镇静催眠的活性,其活性可以被缬草烯酸(Valerenic acid)增强<sup>[13]</sup>。

### 3.4 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<sup>[14]</sup>从Valeriana officinalis中分离得到8个木脂素类化合物,分别为:lignans 8'-hydroxy-pinoresinol(1); 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); berchemol-4'-O-β-D-glucoside(5); the 7,9':7'9'-diepoxylignans pinoresinol-4,4'-di-β-O-D-glucoside(6);

8-hydroxy pinoselinol-4'-O- $\beta$ -D-glucoside(7);8'-hydroxypinoselinol-4'-O- $\beta$ -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。另从 *Valeriana prionophylla* 中分离得到两个新的木脂素苷,它们的结构通过 1D 和 2D 核磁共振谱测定,分别是 prinsepio-4-O--D-glucopyranoside 和 fraxiresino4'-O--D-glucopyranoside,前者有较强的血管舒张活性<sup>[15]</sup>。

### 3.5 生物碱、木酚素、氨基酸及其他成分

生物碱在缬草属植物中的含量不高,目前认为其总生物碱有抗菌作用;主要有缬草碱 (valerine)、鬃草宁碱(chatinine)、猕猴桃碱(actinidine)、缬草宁碱 (valeriane)等生物碱。最近,又从缬草属植物中分离得到一种咪喃并咪喃木酚素,具有结合 2, 3-苯并二噁(benzodiazepines)受体的作用,可能与中枢神经系统的镇静作用有关。从缬草根水提物中还分离出一些游离氨基酸,如 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA),酪氨酸,精氨酸,谷酰氨。此外,还含有咖啡酸,绿原酸,鞣质, $\beta$ -谷甾醇等。

## 4 药理作用研究

缬草的主要药理作用是镇静安神、解痉镇痛、改善微循环、抗心肌缺血及缩小急性心肌梗塞范围、抗肺水肿、抗抑郁、细胞毒和抗肿瘤、抗菌作用等;缬草属植物的药理研究主要集中在缬草、缬草的一个变种-宽叶缬草和蜘蛛香。宽叶缬草的药理作用主要是解痉、抗心律失常、调节血脂;蜘蛛香的药理作用主要是中枢抑制作用、细胞毒和抗肿瘤作用及抗病毒作用。

### 4.1 镇静催眠

徐红<sup>[16]</sup>等研究发现缬草挥发油能明显抑制小鼠的外观行为活动,显著加强戊巴比妥钠及水合氯醛对中枢神经系统的抑制作用;对戊四氮、电刺激所致的小鼠惊厥有明显的对抗作用,并可明显延长硫代氨基脲所致小鼠惊厥的潜伏时间。对士的宁、印防己毒素所致小鼠惊厥无明显对抗作用。Hiller等<sup>[17]</sup>对缬草乙醇提取物的神经药理学进行了研究,结果表明缬草乙醇提取物无苯二氮卓样镇静作



用；同时还观察到纯的缬草烯酸也有抗印防己毒素所致惊厥的作用；其作用机理可能与其和GABA-苯二氮受体形成复合物有关，其作用途径与地西洋不同；当神经受到 $\beta$ 样淀粉蛋白(A $\beta$ ,25~35)所致的毒性作用，缬草可以降低神经网络的兴奋性，防止神经元容量的减少和相关神经的退化<sup>[18]</sup>。吉富史郎[日]<sup>[19]</sup>实验证明，在镇静作用方面北海缬草对戊巴比妥诱发睡眠的延长作用稍强于阔叶缬草，而二者的自发运动抑制作用大致相同，且二者毒性低。蜘蛛香提取物<sup>[20]</sup>能明显抑制小鼠的自发活动，延长戊巴比妥钠小鼠的睡眠时间，增加入睡小鼠数；减少小鼠扭体反应次数；能对抗硫代氨基脲(TSZ)诱发小鼠惊厥，对印防己毒素(PT)诱发的惊厥虽无明显影响，但能明显延长其诱发惊厥潜伏期。其抗惊厥作用可能与GABA有关。

#### 4.2 抗抑郁活性

Oshima<sup>[21]</sup>等从缬草中提取分离的六个化学成分进行小鼠强迫游泳实验，结果表明， $\alpha$ -阔叶缬草醇( $\alpha$ -kessyla lcohol)及其2种愈创木烷型倍半萜日缬草素醇(kessanol)和酯酸环阔叶缬草醇酯(cyclokessyl acetate)均显示较强的抗抑郁作用，缬草宁碱(chatinine)也有抗抑郁作用。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。

#### 4.3 抗心肌缺血

张宝恒<sup>[22]</sup>等试验发现缬草提取物增加小鼠心肌对<sup>86</sup>Pb的摄取，改善心肌微循环。杨晶<sup>[23]</sup>等实验结果表明，缬草挥发油与缬草环烯醚萜具有显著的增强心肾组织微循环灌流量的作用。尹虹等研究表明缬草提取物有抗心肌缺血再灌注损伤的作用，可能是通过抑制黄嘌呤氧化酶，减少自由基产生，减少细胞膜脂质过氧化，抑制血小板聚集，改善冠状微循环以减轻复灌区的无菌性炎症等途径减轻了心肌的负荷。神农缬草挥发油<sup>[24]</sup>具有显著的抗肺水肿作用，其作用机理被认为是扩张小动脉、小静脉、增加冠脉流量、改善心肌微循环灌注和抗心律失常等综合影响的结果。

#### 4.4 抗心律失常

陈灼芳<sup>[25]</sup>等报道, 宽叶缬草挥发油具有抗心律失常的作用, 能降低氯仿诱发小鼠室颤的发生率。王玉良等<sup>[26]</sup>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。袁韶华等<sup>[27]</sup>发现缬草提取物(V3d)有抑制心肌自律性作用, 对异丙肾上腺素诱发的异位自律性的抑制更为明显。贾健宁等<sup>[28]</sup>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, 也能明显对抗大鼠由结扎左冠状动脉前降支诱发的早期缺血性心律失常; 缬草提取物(V3d)对由高 $K^+$ 诱发的犬耳壳及肾脏血管的收缩作用亦有明显的对抗作用, 提示缬草提取物(V3d)抗心律失常作用可能与抑制高 $K^+$ 诱发的钙通道开放有关。以上研究表明, 缬草水提取物以及一些可溶于水的组分有抗心律失常作用。黄峥嵘<sup>[29]</sup>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。

#### 4.5 镇痛、解痉、调节血脂的作用

薛存宽等<sup>[30]</sup>采用水蒸汽蒸馏法制备缬草挥发油, 提油后的药渣醇渗漉制得浸膏, 挥发油和浸膏均有镇痛作用, 挥发油还有突出的平滑肌解痉作用, 二者在解痉、镇痛上有良好的协同作用。胡昌兴<sup>[31]</sup>等用健康雄性白兔复制高脂血症模型, 实验提示, 宽叶缬草油具有显著调节血脂作用及抗脂质过氧化作用。

#### 4.6 细胞毒作用

从印度缬草(*vallichii* DC)的根茎中分离到三种环烯醚萜: 即缬草素(valtrate)、二氢缬草素(didrovaltrate)和降解产物缬草醛(baldrinal)。缬草素细胞毒作用最强, 存活率曲线显示它是二氢缬草素的2倍, 缬草醛的8倍; 而二氢缬草素与肝癌细胞反应迅速。另外

经实验证明细胞毒作用在2小时内可逆, 2小时后不可逆。采用扫描和透射电镜观察缬草素和二氢缬草素对培养的肝细胞瘤超微结构的影响<sup>[32]</sup>, 发现这两种化合物能引起死亡之前细胞膜微绒毛的消失, 大量内质网的膨大和线粒体的显著缩合。用MTT法测定缬草三酯、缬草烯酸及其分解产物、衍生物的配剂对人小细胞肺癌细胞株(GLC4)及结肠癌细胞株(COLO320)的细胞毒作用<sup>[33]</sup>, 结果显示, 双烯类表现出最强的细胞毒活性, 属于双烯类的异缬草酸的细胞毒性则比其母体化合物高; 缬草烯酸及其衍生物均具低细胞毒性。

#### 4.7 抗病毒和抗菌作用

缬草属植物蜘蛛香在民间常用于腹泻、痢疾的治疗, 马静等对其机理进行了研究, 推测蜘蛛香治疗病毒性腹泻与促进机体免疫功能有关。缬草的总生物碱有抗菌作用, 对革兰氏阳性菌的效果尤好, 可用于治疗呼吸道疾病和感冒<sup>[34]</sup>; 从*V. capense*中分离得到的缬草三酯类成分有抗真菌活性。

#### 4.8 保护肾脏

陈玲等<sup>[35]</sup>发现缬草油可明显减轻II型糖尿病大鼠的肾小球体积缩小、系膜增生, 明显改善II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。

#### 4.9 近期药理研究

唐久余<sup>[36]</sup>等研究发现小剂量缬草能够促进抑郁大鼠大脑海马5-HT水平及细胞增殖数量恢复至正常状况, 同时具有保护海马受损伤神经元的作用。吴波<sup>[37]</sup>等研究经缬草挥发油治疗后的癫痫大鼠与对照组大鼠海马内的 $\gamma$ -氨基丁酸含量明显升高, 谷氨酸显著降低( $P < 0.05$ ), 由此得出缬草可调节癫痫大鼠脑内的兴奋性与抑制性氨基酸的平衡, 从而起到抗癫痫的作用。陈素美<sup>[38]</sup>等研究发现缬草提取物可以有效防治博莱霉素诱导的大鼠肺泡炎及肺纤维化, 其机制可能是降低TGF- $\beta$ 1表达。缬草制剂还可用于前列腺炎<sup>[39]</sup>、癫痫、慢性肾功能衰竭、眼病和皮肤病<sup>[40]</sup>、过敏性疾病<sup>[41]</sup>、变态反应病和轻度辐射后遗症<sup>[42]</sup>、妇科疾病<sup>[43]</sup>的治疗, 具有抗疲劳、抗氧化、生发乌

发<sup>[44-45]</sup>等作用。

#### 4.10 毒理研究

环烯醚萜成分可以造成胃肠道和肝脏的损害,在体内实验中没有发现它有致癌性和胎毒性。詹国瑛等<sup>[46]</sup>对缬草进行了毒性及致突变性测试,结果表明缬草使用安全。Tufik等<sup>[47]</sup>用缬草素的混合物喂饲大鼠,连续用药30天,发情周期的平均长度和生育指数均不改变;孕期大鼠的胎鼠毒素和胎鼠发育未见异常;腹膜内用药对怀孕大鼠和其子代可诱导一些改变,口服则无毒性。

#### 5 临床应用

目前缬草提取物及其制剂在国际十分畅销,销售额列植物药前10名,在欧洲及美国常被用于治疗轻、中度失眠,用药期间,不会影响驾驶车辆和机械操作,也不会导致上瘾和依赖,但建议在医生指导下服用;还可用来解除胃肠痉挛、神经性头痛或解除胃肠胀气。

##### 5.1 镇静作用

Vorbach用缬草制剂治疗了121例患者,疗程4周。观察结果表明缬草制剂治疗有效率66%。Ziegler用缬草( $600\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ )或去甲羟基安定( $10\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ )治疗202例患者,用CGIS评价,6周后,发现两者有相似的改善睡眠的作用<sup>[48]</sup>。其他的研究也支持缬草在治疗失眠方面的有效性和安全性。

##### 5.2 抗焦虑

在一个双盲临床观察试验中,缬草能减少受试者主观上焦虑的感觉,但没有明显可测的镇静作用<sup>[49]</sup>。一种缬草制剂同地西洋比较,缬草制剂显示和地西洋相似的明显减少焦虑症状的作用<sup>[50]</sup>。

##### 5.3 抗癫痫

缬草过去作为治疗癫痫的药物被高度推荐。缬草制剂含有异缬草酸,它的结构类似于抗癫痫药丙戊酸(valproic acid),据此推测可能为治疗癫痫的物质基础<sup>[51]</sup>。

##### 5.4 用法与不良反应

失眠症患者在睡前服用300 mg ~ 600mg,相当于2g ~ 3g缬草干

燥根的粉末，沸水中浸泡15分钟后服用；美国FDA认定缬草属于使用安全的药物，变态反应很少；有个案报道<sup>[51]</sup>，服用Valerian超过20倍的临床治疗剂量，亦未发现任何中毒症状，病人的轻微不适，在24小时内完全解除。

## 第二章 缬草抗心律失常有效部位的药理筛选

据国内外文献报道,缬草具有抗心律失常作用<sup>[52-55]</sup>。为了阐释缬草的抗心律失常物质基础,本论文采用超临界CO<sub>2</sub>萃取法和系统溶剂法,将缬草分为不同提取部位,然后以乌头碱、氯仿两种诱导剂诱导心律失常的模型为指标进行药理实验,确定缬草抗心律失常的主要有效部位<sup>[56-57]</sup>。

### 1 缬草不同物质部位的提取分离

#### 1.1 试验材料与仪器

药材:缬草采自湖北恩施,经湖北中医学院鉴定教研室吴和珍副教授鉴定为败酱科缬草属植物缬草(*valeriana officinalis* L.)的根及根茎。

仪器:HA221-40-11C型超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司)。

#### 1.2 试验方法

将2kg过80目筛的缬草粉末,超临界CO<sub>2</sub>萃取:萃取温度45℃,分离温度35℃,压力12MPa,提取1小时得超临界CO<sub>2</sub>萃取物部位<sup>[58]</sup>;萃取后粉末用70%的乙醇渗漉,渗漉液浓缩减压至无醇味,用溶剂法依次以乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液减压回收溶剂,干燥,得乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部位。提取分离流程图如下。

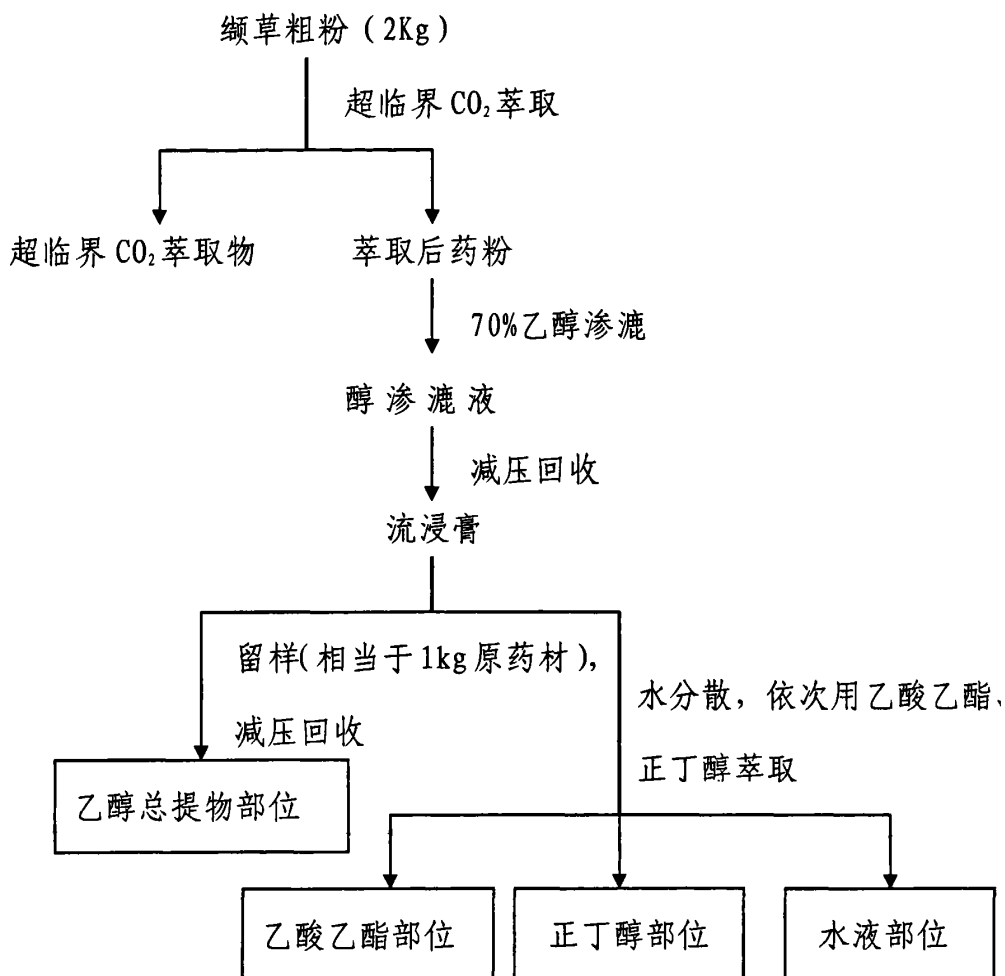


图 2-1 缬草药材不同部位提取分离流程图

## 2 缬草抗心律失常有效部位的筛选

### 2.1 对乌头碱诱发大鼠心律失常的影响

#### 2.1.1 试验材料与仪器

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

**试药:** 取缬草药材不同部位提取物: 乙醇总提部位、超临界  $\text{CO}_2$  萃取物部位 (图表中简称缬草油)、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部位萃取物适量, 配制成三个剂量, 分别是  $5\text{g 生药} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.5$

g 生药  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 和 1.25g 生药  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 作为供试品溶液。盐酸利多卡因注射液 (0.1g:5mL, 上海复星朝晖药业有限公司, 批号: 070806), 用生理盐水稀释至 30mL 作为阳性对照。乌头碱 (DELTA 天然有机化合物信息中心), 生理盐水配成 0.02mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 溶液用于造模。乌拉坦 (化学纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 生理盐水配成 0.25g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 溶液用于麻醉。

仪器: BL-420F 生物机能实验系统 (成都太盟科技有限公司)。

### 2.1.2 试验方法

将 Wistar 大鼠 170 只, 随机分成 17 组: 阴性组 (生理盐水)、阳性组 (利多卡因) 和给药组 (五个提取部位, 分高、中、低剂量)。连续灌胃两天, 按 15mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 给药, 阳性组每次腹腔注射利多卡因 7.5 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, 第二天给药 20 分钟后腹腔注射乌拉坦 (5mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 麻醉, 插入电极, 观察正常二导联心电图; 10 分钟后舌下静脉注射乌头碱 (2.9mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>), 后记录 2.5h 内室早、室速和室颤的开始时间 (未出现失常, 按 2.5h 算)、持续时间和室颤率、死亡率。

### 2.1.3 统计方法

数据以  $\bar{X} \pm S$  表示, 组间进行 t 检验, 检验标准  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ; 室颤率及死亡率采用  $\chi^2$  检验, 结果见表 2-1 和图 2-2、图 2-3。



表 2-1 缬草各提取部位对乌头碱引起心律失常的影响

组号	剂量 (g 生药 · mL <sup>-1</sup> )	动物 (只)	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 (%)
1		10	1.5 ± 1.5	20.0 ± 30.2	18.4 ± 28.7	56.4 ± 61.9	70.0	50.0
2		10	6.3 ± 5.4*	16.0 ± 21.0	3.5 ± 5.89	125.8 ± 49.3	30.0	30.0
3	5.0	10	97.2 ± 64.2**	6.4 ± 16.4	0.1 ± 0.1	150 ± 0.0**	0.0**	20.0
3	2.5	10	17.8 ± 22.8	6.3 ± 11.4	18.5 ± 38.3	150 ± 0.0**	0.0**	30.0
3	1.25	10	7.9 ± 11.5	36.2 ± 20.2	39.1 ± 33.8	105.5 ± 56.8	30.0	40.0
4	5.0	10	15.5 ± 14.3*	31.3 ± 21.5	11.8 ± 14.6	137.2 ± 38.4**	10.0*	10.0
4	2.5	10	17.0 ± 29.2	18.3 ± 21.9	17.0 ± 28.0	109.1 ± 62.5	30.0	0.0*
4	1.25	10	2.0 ± 1.9	14.2 ± 23.2	17.2 ± 24.6	55.9 ± 61.9	70.0	60.0
5	5.0	10	1.6 ± 1.5	46.2 ± 43.7	35.1 ± 37.5	106 ± 59.3	50.0	30.0
5	2.5	10	7.9 ± 14.2	26.1 ± 30.4	11.4 ± 20.5	61.6 ± 59.9	60.0	50.0
5	1.25	10	2.7 ± 3.8	17.9 ± 23.7	25.3 ± 41.1	53.3 ± 63.5	70.0	50.0
6	5.0	10	14.5 ± 18.7	40.6 ± 38.4	15.3 ± 20.0	79.0 ± 66.7	80.0	30.0
6	2.5	10	6.5 ± 10.0	27.7 ± 32.8	11.2 ± 15.6	80.9 ± 69.2	50.0	30.0
6	1.25	10	2.0 ± 1.6	17.3 ± 25.6	27.8 ± 37.8	84.9 ± 65.2	50.0	50.0
7	5.0	10	3.5 ± 4.4	25.2 ± 29.7	14.6 ± 27.5	90.8 ± 62.8	40.0	30.0
7	2.5	10	2.1 ± 1.6	24.8 ± 29.6	53.7 ± 34.7*	86.2 ± 64.5	50.0	30.0
7	1.25	10	1.6 ± 1.0	21.9 ± 20.5	43.4 ± 38.4	99.20 ± 62.5	40.0	20.0

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

△△P<0.01

组号：1. 阴性组；2. 阳性组；3. 缬草水液部位组；4. 缬草正丁醇部位组；5. 缬草乙酸

乙酯部位组；6. 缬草超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物部位组；7. 缬草乙醇总提部位组。

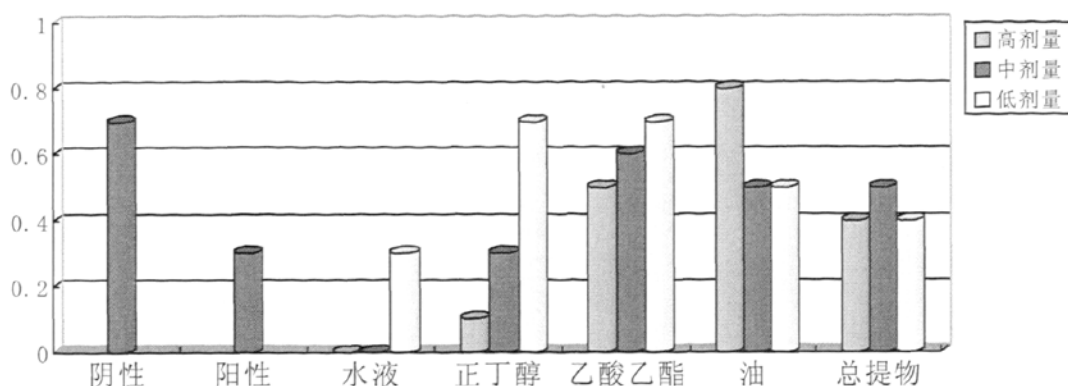


图 2-2 缬草各提取部位对抗乌头碱引起大鼠室颤发生率

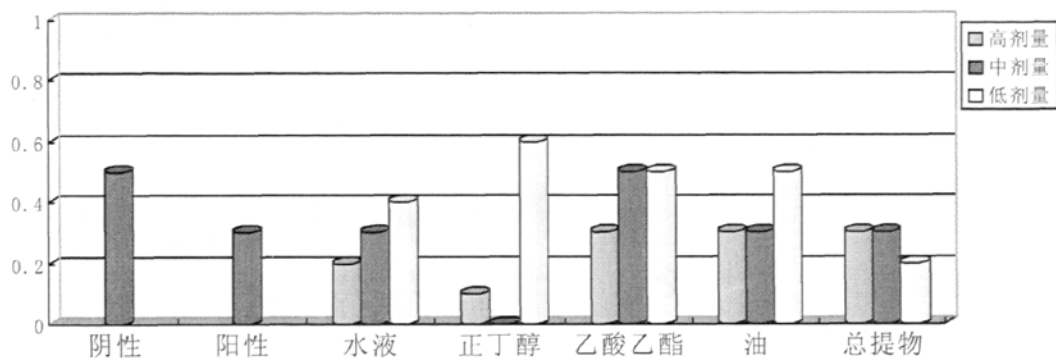


图 2-3 缬草各提取部位对抗乌头碱引起大鼠死亡率

### 2.1.4 试验结果

由表 2-1 可见: 缬草提取物中水液部位在  $5.0\text{g}$  和  $2.5\text{g}$  生药  $\text{mL}^{-1}$  能显著推迟乌头碱诱发大鼠室性早搏 (VE) 发生时间, 减少室颤发生率 ( $P<0.01$ ); 正丁醇部位在  $5.0\text{g}$  生药  $\cdot\text{mL}^{-1}$  能显著推迟乌头碱诱发大鼠室性早搏 (VE) 时间 ( $P<0.01$ ), 减少室颤发生率 ( $P<0.05$ ); 在  $2.5\text{g}$  生药  $\cdot\text{mL}^{-1}$  时显著减少死亡率 ( $P<0.05$ )。超临界  $\text{CO}_2$  萃取物和乙酸乙酯部位有相对较弱的对抗乌头碱致大鼠心律失常的作用, 但与阴性对照组和阳性对照组比较都没有显著性差异。

## 2.2 对氯仿诱发小鼠心律失常的影响

### 2.2.1 试验材料

动物：昆明种小鼠，体重  $25 \pm 2\text{g}$ ，♀♂各半，动物许可证号：SCXK（鄂）2003-2005，由湖北省疾病控制动物实验中心提供。

药品与试剂：普萘诺尔（湖北华中药业有限公司 批号：20061003）用生理盐水配成  $0.75\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液作阳性对照用药；氯仿（分析纯，天津市博迪化工有限公司）。

缬草采自湖北恩施，经湖北中医学院鉴定教研室吴和珍副教授鉴定为败酱科缬草属植物缬草（*valeriana officinalis* L.）的根及根茎。

供试品溶液：将缬草超临界  $\text{CO}_2$  萃取物部位（图表中简称缬草油）、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部位的提取物分别加入  $0.1\text{mL}$  吐温和  $\text{CMC-Na}$  少许分散，用生理盐水定容至  $100\text{mL}$ ，摇匀，作为备用液。取各部位的备用液各  $30\text{mL}$ ，分别稀释成  $5\text{g}(\text{生药}) \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $2.5\text{g}(\text{生药}) \cdot \text{mL}^{-1}$ ，作为供试品溶液。

### 2.2.2 试验方法

将体重  $25 \pm 2\text{g}$  小鼠 200 只，随机分成 10 组：即阴性组（生理盐水）、阳性组（普萘诺尔）和药物组（四个提取部位，分高、低剂量）。连续灌胃三天，按  $20\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药，第三天灌胃后 30 分钟，将小鼠放入用橡皮泥密封的倒扣烧杯中，杯内放有敞口平躺的吸附  $2\text{mL}$  氯仿（每做完一次补充  $0.5\text{mL}$ ）棉花的安剖瓶，待小鼠吸入过量的氯仿，呼吸将停止时立即取出剖胸检查，观察小鼠心室纤颤发生情况。采用  $\chi^2$  检验计算各组室颤率，各组与阴性、阳性对照组比较实验结果见表 2-2 和图 2-4。

表 2-2 缬草不同部位提取物对氯仿诱发小鼠心律失常的影响

药物	浓度(g 生药 · mL <sup>-1</sup> )	鼠数	室颤发生率(%)
NS	20mL · kg <sup>-1</sup>	20	85.0
普萘诺尔	20mL · kg <sup>-1</sup>	20	45.0 <sup>*</sup>
水液部位	5	20	30.0 <sup>**</sup>
	2.5	20	40.0 <sup>**</sup>
正丁醇部位	5	20	60.0
	2.5	20	65.0
乙酸乙酯部位	5	20	85.0
	2.5	20	50.0 <sup>*</sup>
超临界 CO <sub>2</sub>	5	20	35.0 <sup>**</sup>
萃取物部位	2.5	20	40.0 <sup>**</sup>

注：与阴性对照组比较：\* P<0.05；\*\*P<0.01

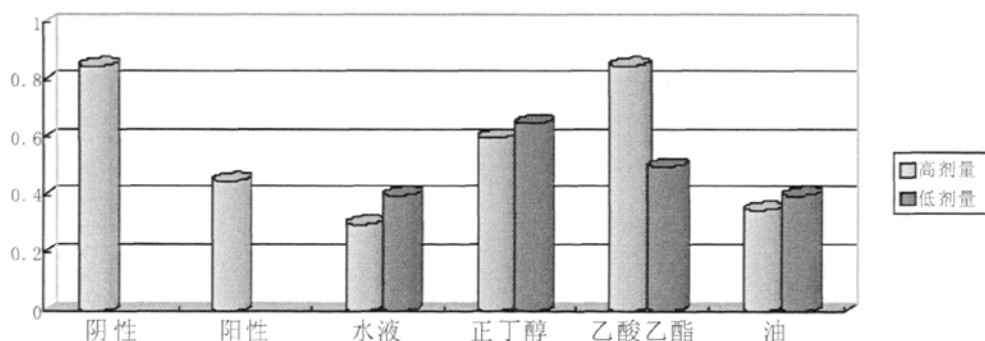


图 2-4 缬草不同部位提取物对氯仿诱发小鼠心律失常的影响

### 2.2.3 试验结果

实验表明,缬草提取物中超临界 CO<sub>2</sub>萃取物和水液部位与阴性对照组相比有显著性差异(P<0.01),但与阳性组比较没有显著性差异,乙酸乙酯部位也有一定的作用,但与阴性对照组及阳性组相比没有显著性差异,说明缬草提取物中超临界 CO<sub>2</sub>萃取物和水液部位对氯仿诱发小鼠心律失常有一定的拮抗作用。

### 3 小结

由实验结果可以看出：缬草水溶性部位有稳定的降低室颤发生率，推迟心律失常发生时间，减少死亡率的作用；超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物部位和水液部位对氯仿诱发小鼠心律失常也有较明显的拮抗作用；而其他部位也出现不等程度的抗心律失常作用。

乌头碱和氯仿诱发心律失常是常用的实验性心律失常动物模型，诱发心律失常的机制有以下几方面：（1）乌头碱直接作用于心肌细胞，促使钠通道开放，加速离子内流，使细胞膜去极化，提高心房传导组织和房室束-浦肯野氏纤维系统等快反应细胞的自律性，形成一源性或多源性异位节律。（2）乌头碱可兴奋迷走神经，抑制窦房结及传导系统，致心率减慢和传导阻滞。（3）乌头碱可明显增加钙离子内流，抑制外向钾电流，使复极时间延长，超过原有 APD 的 20%，增加后除极发生率，引起折返激动，诱发心律失常。（4）氯仿诱导的小鼠室颤可能与植物神经及递质的释放或肾上腺髓质分泌肾上腺素，激活  $\beta$  受体，以及对心肌的直接作用有关<sup>[59-60]</sup>。

本实验通过氯仿、乌头碱两种诱导剂诱导心律失常的发生，虽然其诱发的机理各不相同，缬草正丁醇部位和水溶性部位对两种诱导剂诱导的心律失常均有明显的对抗作用，而其他部位对这两种模型反映不一，说明其抗心律失常机制是多方面的，有效成分并非唯一；如进一步开发为安全、有效的抗心律失常药将有很大的社会意义。

### 第三章 缬草抗心律失常有效部位化学成分的研究

药理筛选结果表明,缬草提取物中超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物部位、正丁醇萃取部位和水液部位以及乙酸乙酯部位均具有不同程度的抗心律失常活性,本实验仅对缬草提取物中正丁醇部位的化学成分进行了系统的研究。

#### 1 仪器与试药

缬草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缬草属植物缬草(*valeriana officinalis* L.)的根及根茎。

EI-MS: VG ZAB-3F 型质谱仪 FAB-MS. EI-MS

<sup>1</sup>H-NMR: Varian Mercury VX-300 型核磁共振仪

<sup>13</sup>C-NMR: Varian INOVA-600 型核磁共振仪

显微熔点测定仪: XRC-1 型显微熔点仪(温度未校正)

元素分析仪: CARLO ERBA MOD-1106 型

红外光谱仪: Nicolet AVATAR 360 FT-IR(R<sub>s</sub>4cm<sup>-1</sup>)

显色剂: 10%硫酸茴香醛乙醇溶液, 3%FeCl<sub>3</sub> 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。

#### 2 提取与分离

取缬草粗粉(15kg), 采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取(SFE-CO<sub>2</sub>)<sup>[61-69]</sup>, 萃取温度 45℃, 分离 35℃, 压力 12MPa, 提取 1 小时, 缬草经超临界 CO<sub>2</sub> 萃取后的药渣(13 kg), 置渗漉筒中, 用 70%乙醇渗漉, 减压回收乙醇提取物, 加适量水搅匀分散, 以乙酸乙酯、正丁醇依次萃取得到乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部分。正丁醇部位经硅胶柱色谱分离, 得到不同组分; 各组分再分别经 Toyopearl HW-40C、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化, 制备液相反复分离纯化得到不同单体成分。提取分离流程图见图 3-1。

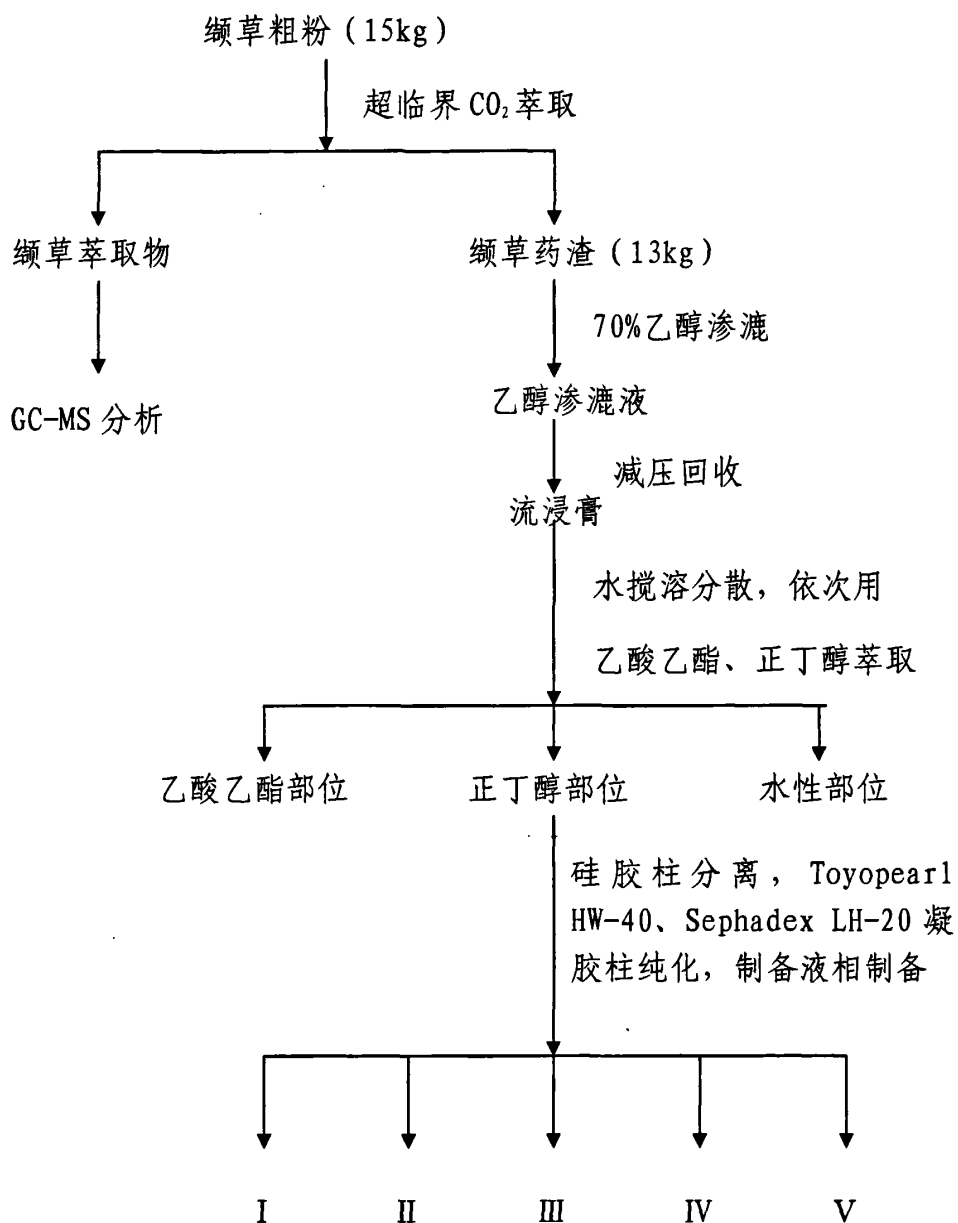


图 3-1 提取分离流程图

### 3 结构鉴定

#### 3.1 化合物 I 的鉴定

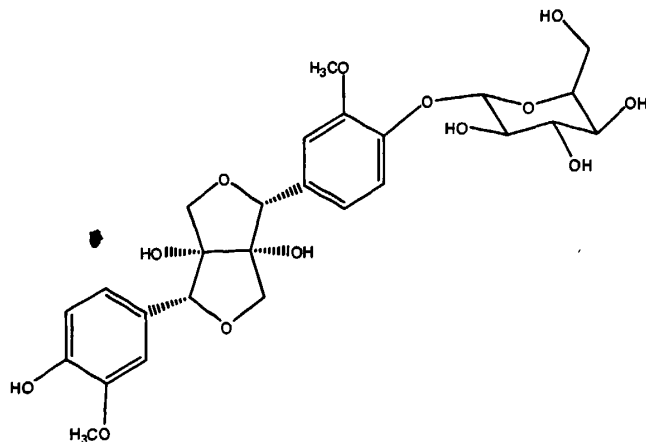
化合物 I，白色无定形粉末 (CD<sub>3</sub>OD)，由 EI-MS  $m/z$ : 552 [M<sup>+</sup>]; <sup>13</sup>C-NMR 和 <sup>1</sup>H-NMR 结合推测分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>。

$^{13}\text{C-NMR}$  显示有 26 个碳信号,  $^{13}\text{C-NMR}$  中  $\delta$ 101.7、73.7、76.6、70.2、77.0、61.3 和  $^1\text{H-NMR}$  中  $\delta$ 3.40-4.94 显示糖的信号, 提示该化合物连有 1 个 6 碳糖。

$^1\text{H-NMR}$  显示有 25 个氢信号, 有两个 ABX 系统:  $\delta$  7.16 (1H, d,  $J=1.5\text{Hz}$ , H-2), 7.20 (1H, d,  $J=8.0\text{ Hz}$ , H-5), 6.99 (1H, dd,  $J=1.5$ 、 $8.0\text{ Hz}$ , H-6);  $\delta$ 7.09 (1H, d,  $J=1.5\text{ Hz}$ , H-2'), 6.83 (1H, d,  $J=8.0\text{ Hz}$ , H-5'), 6.89 (1H, dd,  $J=1.5$ 、 $8.0\text{ Hz}$ , H-6'), 提示有两个 1, 3, 4-三取代苯环。

由不饱和度等于 11 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。3.92 (3H, s) 和 3.91 (3H, s) 为两个甲氧基信号; 5.05 (s)、5.01 (s) 分别为 7、7' 上的氢信号, 4.02 (d, 9.4), 4.17 (d, 9.4)、4.02 (d, 9.4), 4.16 (d, 9.4) 分别为 9、9' 上的氢信号, 显示 8, 8' 位为季碳; 通过剩余的氧原子个数, 推测 8, 8' 位均有羟基取代。

将以上波谱数据与文献报道<sup>[70]</sup>的青刺尖木脂醇苷的波谱数据比较, 基本一致, 故鉴定该化合物为青刺尖木脂醇 (prinsepiol-4-O- $\beta$ -D-glucoside), 其波谱图见附图 (3-2~3-4), 结构式如下:



青刺尖木脂醇苷

(prinsepiol-4-O- $\beta$ -D-glucoside)



表 3-1 化合物 I 的  $^1\text{H-NMR}$  (600MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 和  $^{13}\text{C-NMR}$  (150MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 谱的归属

position	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	position	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
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 <sub>3</sub>	3.91 (s)	55.2
9a	4.02 (d, 9.4)	75.6	Glc-1''	4.94 (d, 7.5)	101.7
9b	4.17 (d, 9.4)		Glc-2''	3.55 (dd, 9.5, 7.5)	73.7
3-OCH <sub>3</sub>	3.92 (s)	55.5	Glc-3''	3.51 (t, 9.5)	76.6
1'		128.3	Glc-4''	3.44 (t, 9.5)	70.2
2'	7.09 (d, 1.5)	112.3	Glc-5''	3.45 (m)	77.0
3'		149.2	Glc-6''	3.74 (dd, 12.1, 4.5) 3.91 (dd, 12.1, 3.5)	61.3

### 3.2 化合物 II 的鉴定

化合物 II, 白色无定形粉末 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), 由 EI-MS  $m/z$ : 536 [ $\text{M}^+$ ];  $^{13}\text{C-NMR}$  和  $^1\text{H-NMR}$  结合推测分子式为  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ 。

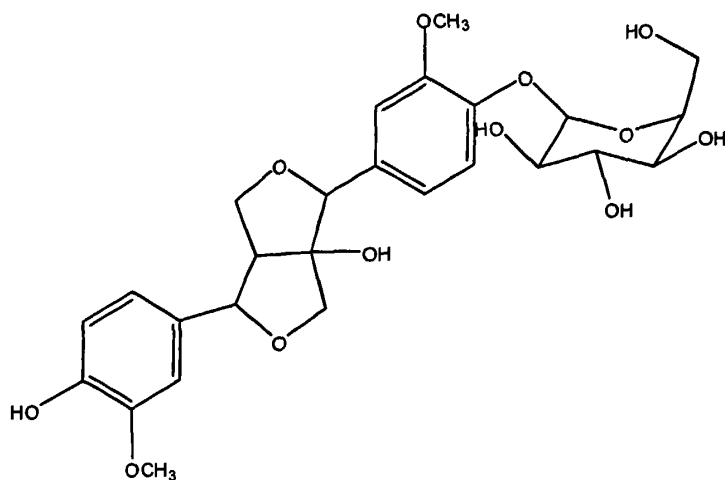
$^{13}\text{C-NMR}$  显示 26 个碳信号,  $^{13}\text{C-NMR}$  中 6 个碳  $\delta$  102.9、74.9、77.8、71.3、78.2、62.5 和  $^1\text{H-NMR}$  中  $\delta$  3.40-4.94 显示糖的信号, 提示该化合物连有 1 个 6 碳糖。

$^1\text{H-NMR}$  显示有 32 个氢信号, 有两个 ABX 系统:  $\delta$  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,  $J=1.8$ 、 $8.4\text{Hz}$ , H-6); 和  $\delta$  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,  $J=1.8$ 、 $8.4\text{Hz}$ , H-6'); 提示有两个 1, 3, 4-三取代苯环。

由不饱和度等于 11 可推测, 结构中还有两个环, 为以双环氧木脂素为母核的苷。3.92 (3H, s) 和 3.91 (3H, s) 为两个明显甲氧基信号; 同化合物 I 的  $^1\text{H-NMR}$  波谱比较不同点在于化合物 II 的 7' 位为  $\delta$  4.89 (1H, d), 8' 位为  $\delta$  3.00-3.06 (1H, m), 9' 位为  $\delta$

3.74-3.78 (1H, dd, 9.0, 6.4)、 $\delta$  4.43-4.47 (1H, dd,  $^2J = 9.0\text{Hz}$ ), 由此可见, 8' 位上的氢无取代, 而 8 位为季碳, 由剩余的氧原子个数推测 8 位应有一个羟基取代。

将以上波谱数据与文献报道<sup>[71]</sup> 的 8-羟基松脂醇苷比较, 基本一致, 故鉴定该化合物为 8-羟基松脂醇苷 (8-hydroxypinoresinol-4-o- $\beta$ -D-glucoside), 其波谱图见附图 (3-5 ~ 3-7), 结构式如下:



8-羟基松脂醇苷

(8-hydroxypinoresinol-4-o- $\beta$ -D-glucoside)

表 3-2 化合物 II 的  $^1\text{H-NMR}$  (600MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 和  $^{13}\text{C-NMR}$  (150MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 谱的归属

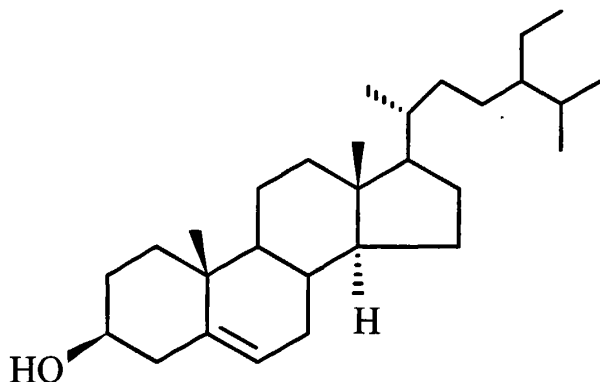
position	$\delta$ $^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (JC-H)	position	$\delta$ $^1\text{H}$ (JH-H in Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (JC-H)
1		132.7	4'		147.4
2	7.11 (d, 1.8)	113.4	5'	6.77 (d, 8.4)	116.0
3		150.5	6'	6.86 (dd, 1.8, 8.4)	120.5
4		149.1	7'	4.89 (d)	87.8
5	7.15 (d, 8.4)	117.6	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 $^2\text{J}=9.0\text{Hz}$ )	
8		93.0	3'-OCH <sub>3</sub>	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 <sub>3</sub>	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

### 3.3 化合物 III 的鉴定

无色针状结晶 ( $\text{CDCl}_3$ ), mp 137 - 138°C, Libermann-8urchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阴性。

FAB-MS  $m/z$ : 414 [ $\text{M}^+$ ], 397 [ $\text{M}^+-\text{OH}$ ], 394, 352; 分子式为  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ 。  
IR  $\nu_{\text{max}}$  KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3425 (br, 缔合-OH), 2919, 2848, 1731;  
 $^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ ): 5.34 (1H, s, -OH), 5.08 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, m, H-3)。

波谱数据与文献报道<sup>[72]</sup>的  $\beta$ -谷甾醇的波谱数据一致; 化合物与  $\beta$ -谷甾醇对照品共薄层, 显色行为完全一致, 混和熔点不下降, 故鉴定该化合物为  $\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)。化合物 IV 的波谱图见附图 (3-8 ~ 3-10)。其结构式如下。



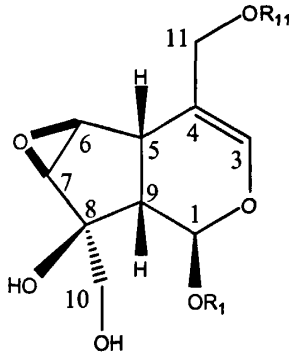
$\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)

### 3.4 化合物 IV 的鉴定

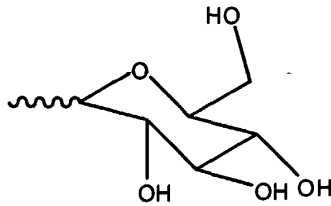
白色无定型粉末 ( $D_2O$ )，易吸潮；EI-MS  $m/z$ : 476 [ $M^+$ ], 390, 374, 194, 85, 57, 43, 由  $^{13}C$ -NMR 和  $^1H$ -NMR 推测分子式为  $C_{21}H_{32}O_{12}$ 。

$^{13}C$ -NMR 显示 21 个碳信号，且提示该化合物具有环烯醚萜苷的母核骨架， $\delta_c$ 141.4 和 108.3 为双键碳 C-3 和 C-4 的信号。

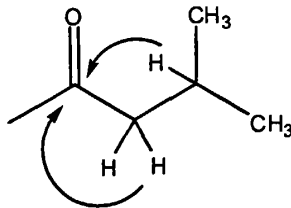
$^1H$ -NMR 显示 26 个氢信号， $\delta$ 6.46 (1H, br s)、6.30 (1H, br s) 分别为 H-3、H-1；4.36 (1H, d,  $J=12$ Hz) 和 4.31 (1H, d,  $J=12$ Hz) 为 C-11 上的偕偶质子，3.77 (1H, d,  $J=12$  Hz) 和 3.69 (1H, d,  $J=12$  Hz) 为 C-10 上的偕偶质子；4.07 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6) 和 3.53 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-7) 为相互偶合的一对质子。HSQC 显示分别对应  $\delta_c$ 59.2 和  $\delta_c$ 59.3，提示存在含氧三元环； $\delta$  3.20 (1H, dd,  $J=8.4, 1.2$ Hz)、2.12 (1H, dd,  $J=8.4, 0.6$  Hz) 则分别为 H-5 和 H-9，为邻位偶合。综合分析并参考文献，推测母核结构如下：



$^{13}\text{C-NMR}$  中 6 个碳  $\delta$  100.7、73.3、76.0、69.8、76.0、60.9 和  $^1\text{H-NMR}$  中  $\delta$  4.50 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 3.27 (1H, dd,  $J=9.6, 7.8\text{Hz}$ ), 3.46 (1H, t,  $J=9.6\text{Hz}$ ), 3.36 (1H, t,  $J=9.6\text{Hz}$ ), 3.40 (1H, ddd,  $J=9.6, 5.4, 2.4\text{Hz}$ ), 3.69 (1H, dd,  $J=12.6, 2.4\text{Hz}$ ), 3.89 (1H, dd,  $J=12, 2.4\text{Hz}$ ) 为一个葡萄糖配基的信号, 根据配糖的端基质子  $\delta$  4.50 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) 的偶合常数, 提示为  $\beta$ -构型。



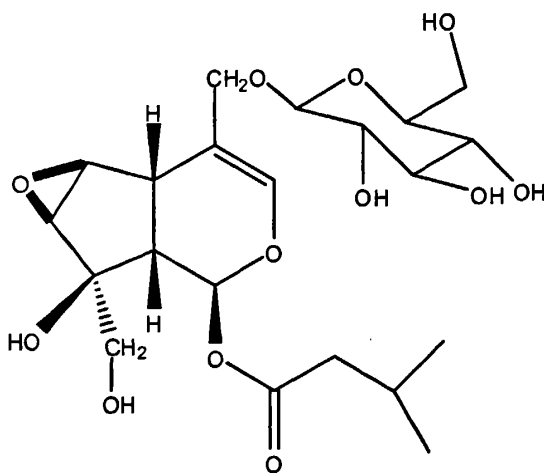
$^1\text{H-NMR}$  中  $\delta$  0.88 (6H, d,  $J=6.6\text{Hz}$ )、1.99 (1H, m,  $J=6.6\text{Hz}$ )、2.25 (1H, dd,  $J=15, 6.6\text{Hz}$ )、2.20 (1H, dd,  $J=15, 6.6\text{Hz}$ ) 为异丁基的信号。又  $\delta_{\text{c}}174.7$  为羰基 (酯键) 碳信号, HMBC 显示该羰基碳与异丁基上的亚甲基质子和次甲基质子相关, 证明存在异戊酸根取代基。



以上两个自旋系统通过 TOCSY 得到佐证。

从 HMBC 图谱中可以看出, 配糖端基碳上的质子  $\delta_{\text{H}}4.50$  (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) 与  $\delta_{\text{C}}68.9$  (C-11) 相关, 故  $R_{11}$  为  $\beta$ -D-葡萄糖; 而  $\delta_{\text{H}}6.30$  (1H, br s, H-1) 与异戊酸根上的羰基碳  $\delta_{\text{C}}174.7$  相关, 故  $R_1$  为异戊酸根取代基。

将上述结构片段进行组合, 其结构及波谱数据与文献报道<sup>[73]</sup> kanokoside A. 一致, 故鉴定该化合物名称为 kanokoside A, 该化合物的结构式如下。化合物 IV 的图谱见附图 (3-11 ~ 3-17)。化合物 IV 的 NMR 归属见表 3-6。其结构式如下。



Kanokoside A

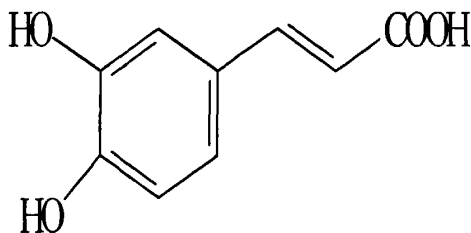
表 3-3 化合物 IV 的  $^1\text{H-NMR}$  (600MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 和  $^{13}\text{C-NMR}$  (150MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 谱的归属

position	$\delta$ $^{13}\text{C}(\text{JC-H})$	$\delta$ $^1\text{H}(\text{JH-H})$
1	89.4	6.30(1H,br s)
3	141.4	6.46(1H,br s)
4	108.3	
5	33.4	3.20(1H,dd,J=8.4,1.2Hz)
6	59.2	4.07(1H,d,J=1.8 Hz)
7	59.3	3.53(1H,d,J=1.8 Hz)
8	79.2	
9	41.2	2.12(1H,dd,J=8.4,0.6 Hz)
10	64.8	3.77(1H,d,J=12 Hz), 3.69(1H,d,J=12 Hz)
11	68.9	4.36(1H,d,J=12Hz), 4.31(1H,d,J=12Hz)
1'	100.7	4.50(1H,d,J=7.8Hz)
2'	73.3	3.27(1H,dd,J=9.6,7.8Hz)
3'	76.0	3.46(1H,t,J=9.6 Hz)
4'	69.8	3.36(1H,t,J=9.6 Hz)
5'	76.0	3.40(1H,ddd,J=9.6,5.4,2.4 Hz)
6'	60.9	3.69(1H,dd,J=12.6,2.4Hz), 3.89(1H,dd,J=12.6,2.4 Hz)
OCOCH <sub>2</sub> CHMe <sub>2</sub>		
	174.7	
	43.0	2.25(1H,dd,J=15,6.6Hz), 2.20(1H,dd,J=15,6.6 Hz)
	25.5	1.99(1H,m,J=6.6Hz)
	21.6	
	21.6	0.88(6H,d,J=6.6 Hz)

### 3.5 化合物 V 的鉴定

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

化合物 V 的波谱数据与文献报道<sup>[74]</sup>绿原酸的数据一致, 混合熔点不下降, 与绿原酸对照品共薄层,  $R_f$  值及显色行为完全一致, 因此鉴定化合物 V 为绿原酸 (Chlorogenic acid), 其核磁图谱见附图 3-18, 其结构如下:



绿原酸(Chlorogenic acid)



## 第四章 缬草抗心律失常活性成分筛选研究

为了进一步阐释缬草抗心律失常活性的物质基础,在活性部位筛选的基础上,采用色谱法,对主要活性部位的化学成分进行了初步分离,得到 5 个单体成分。以转基因 Kv1.5HEK293 细胞为受试对象,采用膜片钳全细胞记录电流的方法对分离得到的化合物进行抗心律失常作用的活性筛选,结果表明青刺尖木酯醇苷和 8-羟基松脂醇苷为缬草中抗心律失常的活性成分。

### 1 试药与仪器

仪器: 倒置显微镜 OLYMPUS IX71(日本 OLYMPUS 公司); 膜片钳放大器 (HEKA EPC-9 Gernmen); PULSE 软件 (HEKA lambrecht Gernmen); 玻璃电极 (南京六合泉水教学实验仪器厂); 微电极拉制仪 (P-97 Sutter Instrumentco, Norato, CA); 恒流泵 HL-2B(上海沪西分析仪器厂)。

试药: 缬草中分离的单体成分; 其他试剂均为分析纯。

细胞株: 转基因 Kv1.5HEK293 细胞由香港大学药理系李教授惠赠。

### 2 细胞培养

#### 2.1 细胞培养

HEK293 细胞来源于人胚胎肾上皮细胞,也是常用的人心肌细胞离子通道基因体外表达系统。研究表明,HEK293 细胞无内源性 Kv1.5 通道 mRNA 的转录,其细胞膜上无 Kv1.5 通道表达,作为 Kv1.5 钾通道体外细胞模型,可以排除内源性 Kv1.5 电流对实验的干扰,由于 HEK293 是源于人的细胞系,以其为模型取得的实验结果与人心肌细胞差异会更小。

将约  $3 \times 10^5$  细胞置培养瓶中 (25 cm), 加 5mL 含 10%FBS 高糖培养基 DMEM, 置 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养, 当细胞生长约 80%-90%融合时, 即可进行传代。

## 2.2 细胞传代

先将磷酸盐缓冲液 (PBS), 培养基, 胰酶等液体在 37 °C 水浴预热。先弃去培养基, 再用 PBS 冲洗培养瓶, 后加入约 2.5mL 胰酶消化液, 并轻柔摇动培养瓶, 使消化酶流遍所有细胞表面。在显微镜下观察到贴壁生长的转基因 kv1.5 细胞回缩, 胞体趋于变圆, 细胞间隙变大时, 立即终止消化, 加入约 2.5mL 含血清的培养基, 并用吸管反复吹打, 使细胞从培养瓶壁上脱离下来成单个悬浮细胞, 将细胞接种于培养瓶或培养皿中于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养。

## 2.3 细胞冻存与复苏

为保存细胞株和避免因反复传代引起细胞表型改变, 可将细胞冷冻保存, 需要时复苏培养。

细胞冻存时采用逐步降温, 依次在 4°C 冰箱放置 0.5h, -20°C 冰箱放置 0.5h, 然后放入 -80 °C 冰箱 24 小时, 即可转移到液氮罐 (-170°C) 中长期保存; 首先按细胞传代方法将培养瓶中的细胞消化下来, 转移到离心管中, 低速离心留取细胞沉淀。然后用预先配制的细胞冻存液重新悬起细胞, 制成细胞悬液, 分装入冻存管中, 注明细胞名称和冻存日期。

细胞复苏时, 从液氮罐中取出冻存管, 迅速放入 37°C 水浴中, 不停地轻轻摇动冻存管, 使细胞可以尽快解冻。复苏后 24 小时更换新鲜培养基。

## 3 溶液的配制

记录 K<sup>+</sup> 电流的电极内液成分 (mmol·L<sup>-1</sup>): CsCl 120; CaCl<sub>2</sub> 1.0; MgCl<sub>2</sub> 5.0; Na<sub>2</sub>ATP 5.0; EGTA 11; HEPES 10; Glucose 10; pH 用 CsOH 调至 7.40。

记录 K<sup>+</sup> 电流的电极外液成分 (mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 30; 氯化胆碱 110; CaCl<sub>2</sub> 0.1; MgCl<sub>2</sub> 1.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33; HEPES 10; pH 用 NaOH 调至 7.40。

台氏 (Tyrode' s) 液 (mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 137、KCl 5.4、MgCl 1.0、NaCl 1.8、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.33、HEPES 10、Glucose 10, pH 用 NaOH 调

至 7.4。

## 4 试验方法与结果

### 4.1 供试品溶液的配制

取适量从缬草中分离各单体成分，临用前溶于 100%DMSO 中，配成相应的浓度，备用。

### 4.2 全细胞膜片钳记录方法

吸取少许细胞悬液于细胞池中，静置 5-10 min，待细胞贴壁后，用 100% O<sub>2</sub> 饱和的细胞外液进行表面灌流约 5-10 min，流速 2mL.min<sup>-1</sup>。在倒置显微镜下选择边缘清晰，表面光滑，无收缩的细胞进行实验。采用全细胞膜片钳记录方法，在电压钳制模式下记录通道电流<sup>[75-81]</sup>。膜片钳放大器通过 A/D 和 D/A 数据转换器同计算机相连接。刺激信号及电压、电流输入信号的采集均由软件 PULSE 控制。

玻璃电极充灌电极内液后入水电阻为 1-2MΩ。由于转基因 kv1.5 细胞体积较小，记录通道电流时所用电极尖端开口较小，电极入液电阻约 3-5MΩ。调节三维操纵器使电极尖端移向细胞表面，形成高阻封接，封接电阻 1GΩ 以上。补偿快电容并吸破细胞膜形成全细胞记录模式。实验在室温(22<sup>0</sup>C-24<sup>0</sup>C)下进行，形成巨阻抗封接后，在电压钳模式下记录电流，保持电压固定于 -80mv，阶跃电压 10mv，指令电位的步阶范围由 -50mv 至 60mv，持续时间 300ms，然后电压保持在 -50mv，150 ms，可记录到超快速延迟整流钾电流 (ultrarapid delayed rectifier current I<sub>kur</sub>)，I<sub>kur</sub> 激活较快，基本不失活，呈电压依赖性，可被维拉帕米所阻断见图 4-1 ~ 4-4。

### 4.3 结果

实验结果表明：化合物 I、化合物 II 均对转基因 kv1.5 HEK293 细胞的电流有明显的抑制作用，表明化合物 I、化合物 II 对 kv1.5 钾通道有抑制作用，抑制钾离子外流。洗脱后电流均有明显恢复，但没有恢复到给药前水平，仍较给药前偏低，表明药物对离子通道复活时间有延迟作用。结果见下图。

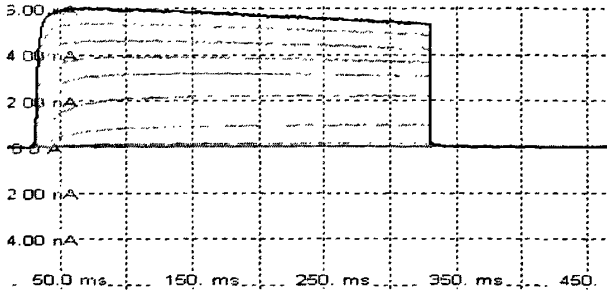


图 4-1 超快速延迟整流钾电流原始图

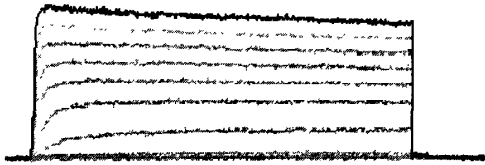
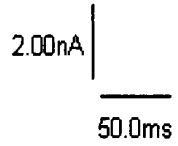


图 4-2 给维拉帕米前电流图

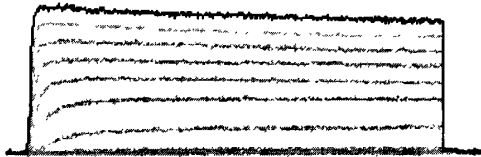
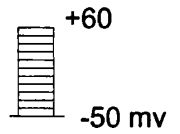
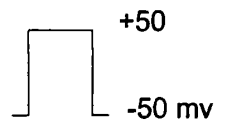


图 4-3 开始给维拉帕米电流图



刺激程序

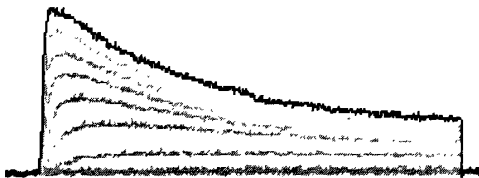


图 4-4 给维拉帕米 9min 电流图

### 化合物 I 对转基因 kv1.5 细胞电流图 (见图 4-5 ~ 图 4-9)

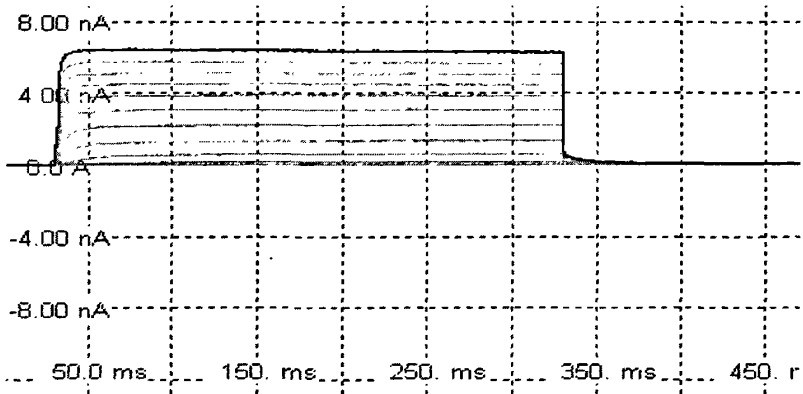


图 4-5 入水后约五分钟, 给药前转基因 kv1.5 细胞稳定的电流。

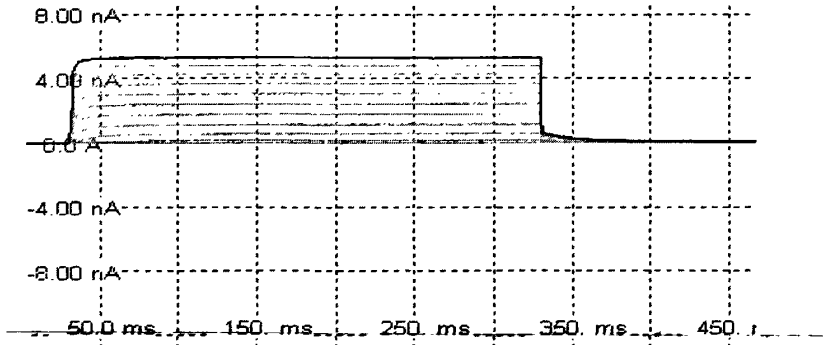


图 4-6 给药后 2 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流, 与图 4-5 相比电流明显改变, 表现为整个电流都有抑制作用。

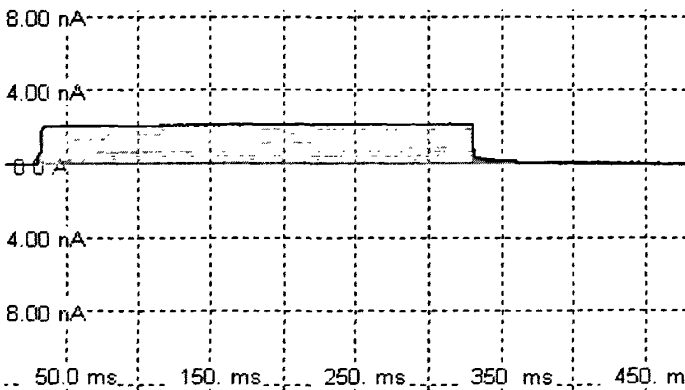


图 4-7 给药后 5 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流, 与图 4-5 相比电流抑制更明显, 表现为整个电流都有抑制作用。

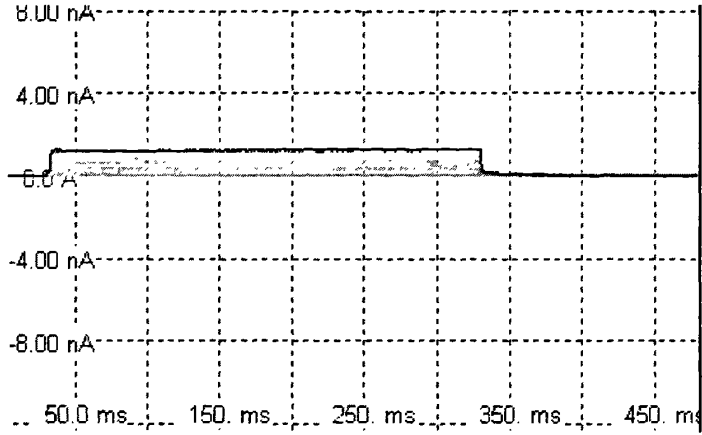


图 4-8 给药后 8 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流，与图 4-7 相比电流抑制更明显，表现为整个电流都有抑制作用，以电流开始部分抑制更明显，抑制作用达三倍以上。

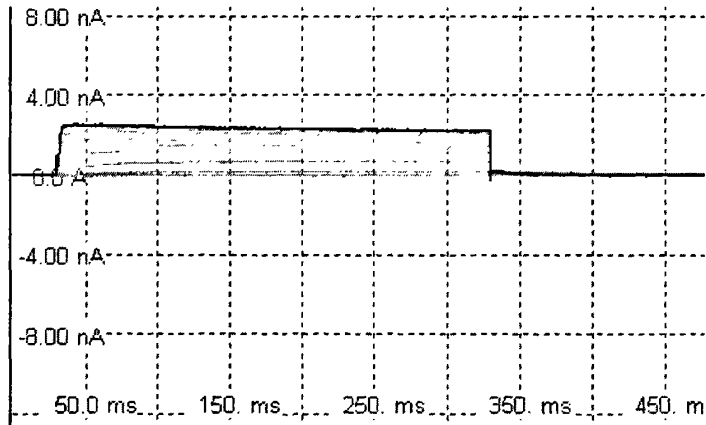


图 4-9 洗脱后 5 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流，与图 4-5 相比电流有明显恢复，表现为整个电流都有恢复，以电流开始部分恢复更明显。开始部分电流恢复达给药前 1/2 左右，而后部分电流没有恢复到给药前 1/2。表明此药对 kv1.5 细胞的电流后面部分作用更明显。

化合物 II 对转基因 kv1.5 细胞电流图 (见图 4-10~图 4-13)

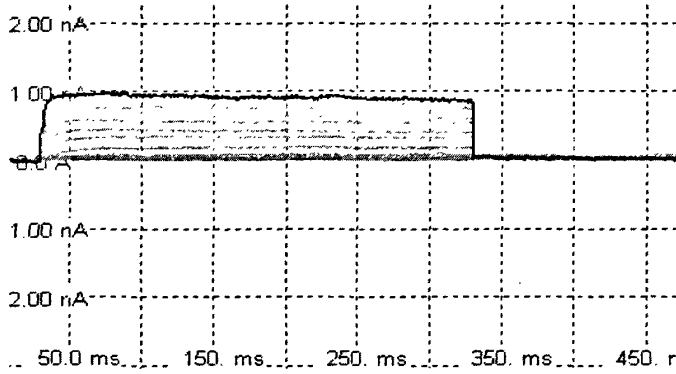


图 4-10 入水后约五分钟, 给药前转基因 kv1.5 细胞稳定的电流

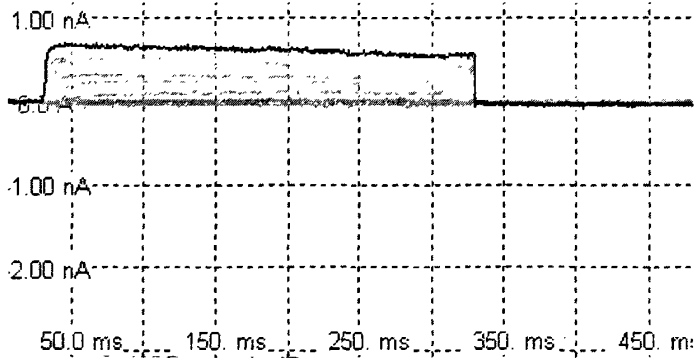


图 4-11 给药后 2 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流, 与图 4-10 相比电流明显改变, 表现为整个电流都有抑制作用, 以电流后面部分抑制更明显。

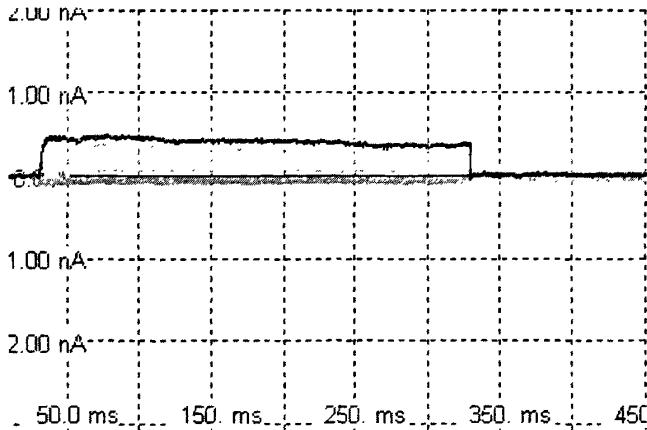


图 4-12 给药后 5 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流, 与前面的图相比电流抑制更明显, 表现为整个电流都有抑制作用, 以电流后面部分抑制更明显。表明药物此时作用最强。

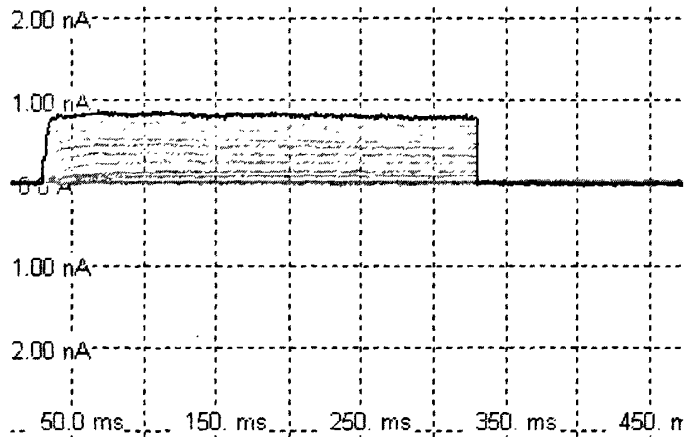


图 4-13 洗脱后 5 分钟记录转基因 kv1.5 细胞的电流

## 5 小结

本项研究对缬草主要有效部位正丁醇部位进行了化学成分分析，采用色谱和波谱技术，从中分离鉴定了 5 个化合物；通过全细胞膜片钳技术对 5 个化合物进行活性筛选，筛选出 2 个化合物对 kv1.5 钾通道有明显抑制作用，洗脱后电流有恢复，但没有恢复到给药前水平，仍较给药前偏低，表明药物对离子通道复活时间可能有延迟作用，说明化合物 I、II 均有抑制钾离子外流，延长有效不应期，具有明显的抗心律失常的作用。经结构鉴定化合物 I 为青刺尖木脂醇苷，化合物 II 为 8-羟基松脂醇苷，试验结果与有效部位的试验结果相符合，进一步证实了缬草抗心律失常活性，为缬草进一步开发奠定了基础。



## 第五章 缬草抗心律失常活性成分作用机理研究

为了进一步阐述缬草抗心律失常的物质基础,在活性部位筛选的基础上,对主要活性部位的化学成分进行了分离,初步得到 5 个单体化合物,以转基因 kv1.5 细胞为受试对象,采用全细胞膜片钳实验记录法对分离得到的主要化合物进行了抗心律失常的活性筛选,根据筛选结果,对缬草中抗心律失常的主要活性成分青刺尖木脂醇苷进行作用机理研究。

### 1 仪器与试药

仪器:倒置显微镜 OLYMPUS IX71(日本 OLYMPUS 公司);膜片钳放大器(HEKA EPC-9 Gernmen);PULSE 软件(HEKA lambrecht Gernmen);玻璃电极(南京六合泉水教学实验仪器厂);微电极拉制仪(P-97 Sutter Instrumentco,Norato,CA);恒流泵 HL-2B(上海沪西分析仪器厂)。

- 试药:取适量从缬草中分离的青刺尖木脂醇苷。

### 2 试验方法

#### 2.1 供试品溶液的配制

取适量青刺尖木脂醇苷,临用前溶于 100% DMSO 中,配成相应的浓度,备用。

#### 2.2 溶液的配制

记录  $K^+$  电流的电极内液成分 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): CsCl 120;  $\text{CaCl}_2$  1.0;  $\text{MgCl}_2$  5.0;  $\text{Na}_2\text{AT P}$  5.0; EGTA 11; HEPES 10; Glucose 10; pH 用 CsOH 调至 7.40。

记录  $K^+$  电流的电极外液成分 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): NaCl 30; 氯化胆碱 110;  $\text{CaCl}_2$  0.1;  $\text{MgCl}_2$  1.0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.33; HEPES 10; pH 用 NaOH 调至 7.40。

台氏(Tyrode's)液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): NaCl 137、KCl 5.4、 $\text{MgCl}_2$  1.0、NaCl 1.8、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.33、HEPES 10、Glucose 10,用 NaOH 调 pH 至 7.4。

## 2.3 细胞的培养

转基因 kv1.5 细胞香港大学药理系李教授惠赠,细胞的培养同第四章筛选部分。

## 2.4 膜片钳全细胞记录

选取表面光滑,边缘清晰,无收缩的细胞在室温下进行实验,将细胞加入平放于倒置显微镜下的细胞池中,贴壁后开始实验,灌流速度约  $2-3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。玻璃电极灌电极液后电阻为  $1\sim 2\text{M}\Omega$ ,使电极与细胞表面形成高阻封接后破膜形成全细胞记录。电流信号经电极 Ag/AgCl 引导由膜片钳放大器放大通过 A/D 转换器转换为数字信号,并存储于计算机硬盘中。实验过程由 PULSE 软件程序刺激发放和信号采集。

## 2.5 数据处理

实验资料采用“PULSE+ PULSEFII”软件包测定,资料分析和图表处理采用 Excel 和 Sigma Plot 软件。试验数据  $\bar{X}\pm S$  表示,采用  $t$  检验进行统计。检验标准  $P<0.01$  和  $P<0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 转基因 KV1.5 细胞 $I_{Kr}$ 随时间变化的特点

形成全细胞模式后,在电压钳模式下<sup>[82-90]</sup>,保持电位  $-50\text{mv}$  至  $60\text{mv}$  的刺激程序,连续观察 50 分钟内转基因 kv1.5 细胞电流 ( $n=6$ ) 的变化,可见从破膜后电流处于稳定状态,给药及洗脱均在这段时间完成。结果见图 5-1、5-2。

### 3.2 青刺尖木脂醇苷对转基因 KV1.5 细胞 $I_{Kr}$ 电流-电压 (I-V) 的影响

保持电位  $-80\text{mv}$ ,以  $10\text{mv}$  的阶跃,给予  $-50\text{mv}$  至  $60\text{mv}$  的刺激,观察加入青刺尖木脂醇苷  $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  后及洗脱后的电流变化。结果见图 5-3、5-4。

### KV1.5 Time dependent effect

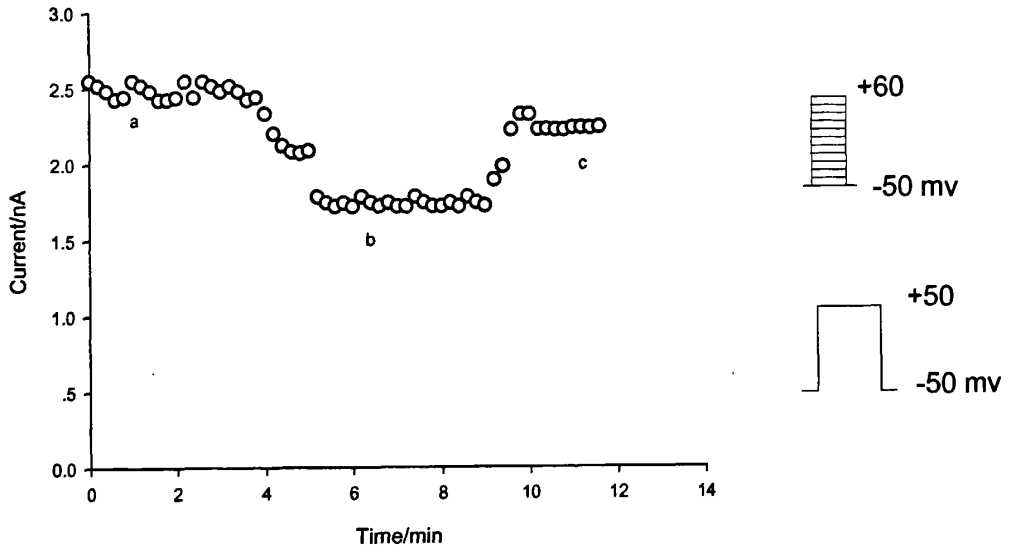


图 5-1 用药前、用药后、洗脱电流随时间变化影响图

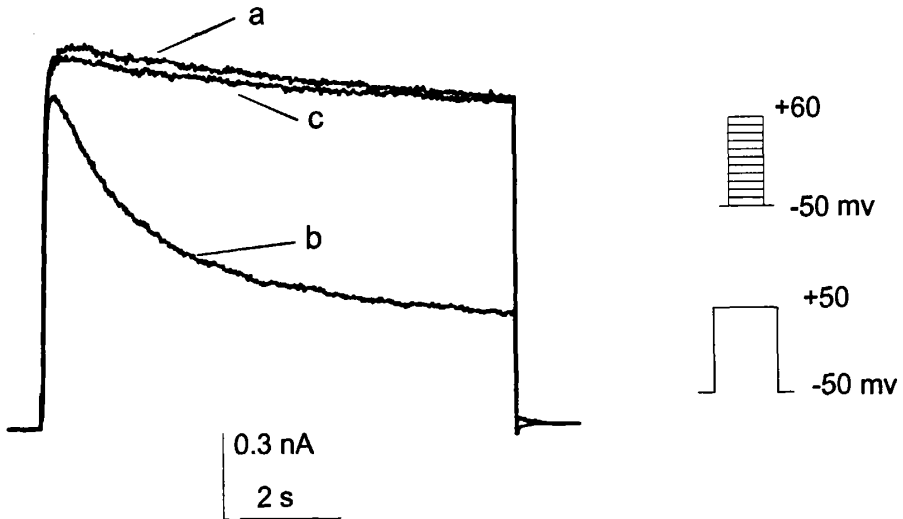


图 5-2 用药前(a)、用药后(b)、洗脱(c)电流随时间变化曲线图

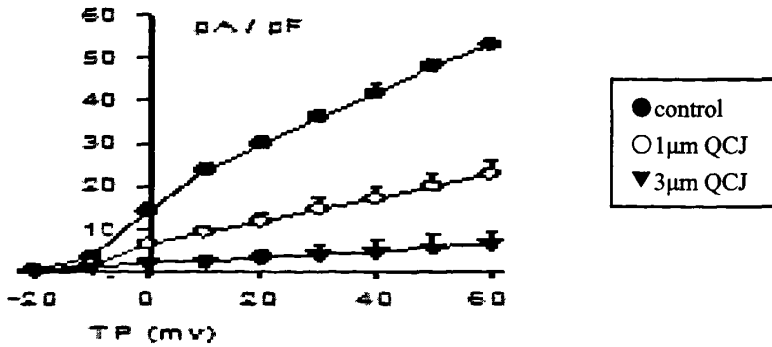


图 5-3 青刺尖木脂醇苷对转基因 kv1.5 细胞电流与电压关系曲线图

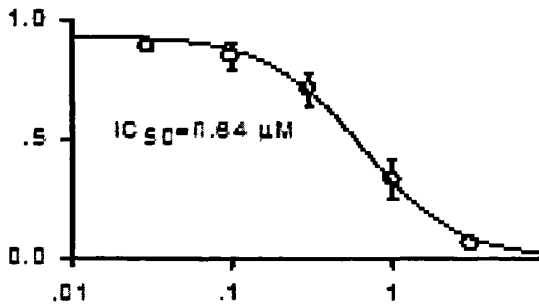


图 5-4 青刺尖木脂醇苷 IC50 图

### 3.3 实验结果

研究表明,青刺尖木脂醇苷对 kv1.5 细胞  $I_{Kur}$  电流有明显抑制作用(图 5-1),洗脱后电流  $I_{Kur}$  基本恢复正常(略较用药前偏低)有统计学意义;用药后(b)电流随时间逐渐减低、洗脱后(c)电流明显恢复,可见  $I_{Kur}$  的变化与时间呈现相关性(图 5-2);不同浓度的青刺尖木脂醇苷对 kv1.5 细胞  $I_{Kur}$  电流影响不同,浓度越高抑制越明显,说明电流与浓度也呈现一定的依赖性(图 5-3、5-4),可能在一定范围内,药物浓度越高,抗心律失常作用越强。

## 4 讨论

心律失常的发生与心肌电生理特性异常有关,而心肌电生理特性又与心肌细胞上的离子通道密切相关。动作电位是心肌细胞膜受到刺激后,引起特定离子通道的开放及带电离子的跨膜运动,从而引起膜电位的波动,使膜电位由负变正又变负的电位逆转过程。动作电位时程的长短与 QT 间期密切相关。由于动作电位时程是各种电流变化的综合结果,既然动作电位时程有变化,必然存在离子电流的改变。目前临床上使用的抗快速性心律失常西药有四类,除 II 类属于  $\beta$  受体阻断剂以外,其余三类均作用于不同的离子通道产生抗心律失常的作用。

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床上最为常见的快速性心律失常。近年来,在 AF 的基础及临床研究发现,AF 可引起心房动作电位(action potential duration, APD)、有效不应期(ERP)及有效不应期频率适应性(ERP RA)和心房传导速度的变化,即心房电重构 (electrical remodeling),后者反过来又促进 AF 的发作和维持。治疗 AF 的理想药物应是只影响心房的 ERP,不至于引起严重的室性心律失常。

有文献报道缬草提取物(V3d)能明显对抗乙酰胆碱-氯化钙诱发的小鼠房颤<sup>[29]</sup>,因此本实验选取转基因 kv1.5HEK293 细胞进行 kv1.5 钾通道观察研究.kv1.5 通道主要参与心房复极的 1 相和 2 相,阻断  $I_{kur}$ ,可明显延长有效不应期和动作电位时程,所以心房颤动时  $I_{kur}$  的变化非常重要,是潜在的心房选择性抗房颤药物的高敏靶点。而 HEK293 细胞来源于人胚胎肾上皮细胞,也是常用的人心肌细胞离子通道基因体外表达系统,研究表明 HEK293 细胞无内源性 kv1.5 通道 mRNA 的转录,其细胞膜上无 kv1.5 通道表达,作为 kv1.5 钾通道体外细胞模型,可以排除内源性 kv1.5 电流对实验的干扰,由于 HEK293 是源于人的细胞系,以其为模型取得的实验结果与人心肌细胞差异会更小。

转基因 kv1.5 细胞主要是电压门控钾通道 (kv1.5 钾通道),其

培养的细胞均为单钾通道，阻止该通道会影响钾电流，从而与心律失常密切相关。所以本实验选取 kv1.5 钾通道进行观察研究。kv1.5 钾通道电流是引起心肌细胞动作电位复极的主要电流及 Ⅲ 类抗心律失常药的主要靶点。超快速延迟整流钾电流 (ultrarapid delayed rectifier current,  $I_{kur}$ ) 是仅在心房肌发现的钾通道电流，其离子通道的分子基础是 kv1.5 钾通道<sup>[91]</sup>。研究发现一种特有的复极化钾离子电流  $I_{kur}$  仅表达于人的心房肌细胞上， $I_{kur}$  是构成心房肌细胞复极化电流的主要成分之一，对心房的复极以及 APD 时程起重要作用， $I_{kur}$  激活非常快，生理温度下相对不失活，它主要参与心房复极的 1 相和 2 相， $I_{kur}$  的减弱会引起 APD 和 ERP 的延长。阻断  $I_{kur}$ ，可明显延长 ERP 和动作电位时程 APD，所以心房颤动时  $I_{kur}$  的变化非常重要，是潜在的心房选择性抗房颤药物的高敏靶点。其生物物理学和药理学特性与人的 kv1.5 通道相似，二者具有分子相关性。因此，若观察到药物对转基因 Kv1.5 钾通道 HEK293 的电流有抑制作用，那么它可能有抗心律失常作用，这也可能是该药物的抗心律失常作用机制。kv1.5 钾通道阻断药对受到电重构影响的心房肌具有延长 APD 时程的作用，作为治疗 AF 新的第 Ⅲ 类抗心律失常药物而被瞩目<sup>[92]</sup>。

抗心律失常药物都是通过阻滞心肌细胞膜上的离子通道或泵而发挥作用的，理想的治疗心房颤动的药物应是具有高度的心房肌细胞选择性，可以终止或延缓心房颤动的发生，而没有延长 QT 间期或负性肌力的作用。kv1.5 钾通道被认为是实现心房高度选择性理想的药物作用靶点。临床及动物研究证实，kv1.5 钾通道是心房电重构的基础，其阻滞剂可以选择性延长心房有效不应期而终止心房颤动。

研究发现<sup>[93]</sup>，超过 3 个月的慢性房颤患者，kv1.5 通道基因的表达明显减少。慢性心房颤动 kv1.5 通道基因表达在不同阶段均有下降。有研究结果<sup>[94]</sup>显示决定  $I_{kur}$  在复极中作用的主要因素是动作电位形状，心房颤动时尽管 kv1.5 通道的表达减低，但是  $I_{kur}$  在心房复极中的作用比在窦性心律时大得多，此结果反映了 kv1.5 通道特

异阻滞剂的巨大临床应用前景，为药物治疗心房颤动提供理论支持。

从本实验结果可以看出，青刺尖木脂醇苷对 kv1.5 钾通道的抑制，说明青刺尖木脂醇苷的抗心律失常可能主要是通过抑制钾通道，延长有效不应期而达到治疗目的，所以青刺尖木脂醇苷有望成为治疗抗心律失常药。当然人的心肌细胞有多个离子通道，不同于本实验只选用转基因 kv1.5 细胞单个钾通道作研究，该药对人体心肌细胞多个通道作用机制及其研究还有待于进一步进行。

## 第六章 缬草抗心律失常有效部位的指纹图谱研究

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 系败酱科缬草属植物, 具有镇静安神、解痉止痛之功效, 主治心神不安, 心悸失眠, 癫狂, 风湿痹痛, 痛经等<sup>[95]</sup>。前期药理研究表明, 缬草正丁醇和水液部位提取物及从中分离鉴定的一些化合物具有明显的抗心律失常作用。为了进一步探讨缬草抗心律失常的物质基础, 并比较其不同产地, 不同品种来源的品质差异, 采用高效液相色谱法, 对缬草抗心律失常有效部位进行了指纹图谱研究; 从而为其进一步研究和开发利用奠定了一定基础。

### 1 缬草抗心律失常有效部位的指纹图谱研究

#### 1.1 试验材料与仪器

##### 1.1.1 仪器

Waters 600 E 高效液相色谱仪, 2996PDA 检测器, Empower 色谱工作站; Agilent 1100 series 高效液相色谱仪, Sedex75(sedere-France)ELSD 检测器, Agilent 色谱工作站; Mettler Toledo AT20 型分析天平 (万分之一); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HH-S 型水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司); D101 型大孔吸附树脂 (天津市海光化工有限公司)。

##### 1.1.2 试药

乙腈为美国 Baker 公司色谱纯; 95%乙醇 (上海振兴化工一厂)、乙酸乙酯 (天津市化学试剂三厂)、甲醇 (上海振兴化工一厂) 均为分析纯, 水为双蒸水。

##### 1.1.3 样品来源

实验用缬草属植物样品共计 14 批, 均由课题组成员亲自采集, 经湖北中医学院中药鉴定教研室吴和珍副教授鉴定。全部 14 批样品的来源和采集日期见表 6-1。



表 6-1 样品来源和采集日期一览表

样品编号	品种	产地	采收期
S1	缬草	湖北恩施	2007.10
S2	缬草	湖北恩施	2007.09
S3	缬草	湖北恩施	2007.08
S4	缬草	湖北恩施	2006.01
S5	缬草	湖北恩施	2007.12
S6	缬草	湖南湘西吉首	2007.10
S7	缬草	湖南湘西吉首	2007.08
S8	缬草	贵州剑河	2007.10
S9	缬草	湖北恩施	2007.03
S10	缬草	湖北恩施	2005.08
S11	宽叶缬草	湖北恩施	2007.10
S13	蜘蛛香	湖南湘西花县	2007.10
S13	蜘蛛香	湖北恩施巴东	2007.10
S14	黑水缬草	湖南湘西花县	2007.10

## 1.2 指纹图谱研究方法的考察

### 1.2.1 样品提取方法的考察

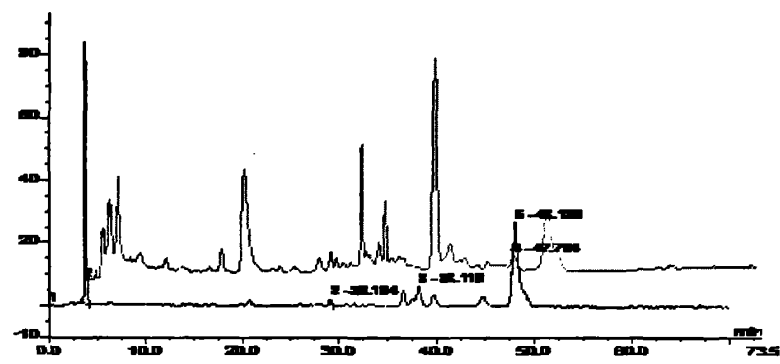
精密称取缬草超临界 CO<sub>2</sub> 萃取后样品 2.0g 两份, 分别采用 30mL70%乙醇回流 1 小时、30mL70%乙醇超声 (250W, 频率 40KHZ) 30 分钟两次两种方法提取, 将各提取液于室温下静置 30 分钟, 以各自提取溶剂补足减失的重量, 滤过, 取续滤液 40mL, 转移至蒸发皿中, 水浴挥去乙醇, 将流浸膏加水适量分散, 转移至分液漏斗中, 以乙酸乙酯分别萃取三次 (50mL/40mL/40mL), 弃去乙酸乙酯液; 水液置蒸发皿中, 水浴挥去溶剂, 残渣用甲醇溶解, 定容至 10mL, 以一次性微孔滤膜 (0.45 $\mu$ m) 滤过, 依次得到供试品溶液 A 和 B。

分别吸取供试品溶液 A 和 B 各 10 $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪 (PDA 检测器), 记录各供试品溶液在 200nm ~ 400nm 波长范围内的色谱图; 比较各供试品溶液的色谱图, 发现在紫外检测波长 218nm 处的色谱峰多, 基线也比较平稳。在相同色谱条件下, 主要色谱峰的峰面积差别不明显, 但前者的干扰峰稍多, 在突出主要峰, 减少干扰峰的原则下, 并考虑到不同提取方法的提取效率, 最终选择以超声提取作为指纹图谱供试品的提取方法<sup>[96-98]</sup>。

在确定供试品提取方法的基础上, 比较了乙醇浓度和提取时间对色谱峰的影响。结果表明, 缬草样品分别用 70%、80%、90%乙醇超声提取后的供试品溶液对色谱峰的影响较小, 故选择用 70%乙醇超声提取。比较缬草样品超声时间 30 分钟、40 分钟、1 小时供试品溶液对色谱峰的影响, 差别较小, 故选择超声提取时间为 30 分钟。

### 1.2.2 检测条件的考察

分别吸取供试品溶液 A 和 B 各 10 $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪 (ELSD-检测器), 检测条件: 漂移管温度为 40 $^{\circ}$ C, 压力为 3.5bar, 记录各供试品溶液的色谱图, 与样品的 HPLC-UV 色谱图比较发现吸收峰较少, 难以描述缬草样品的指纹特征, 结果见图 6-1; 故选择紫外检测器作为指纹图谱的检测方法。



1: HPLC-UV 图谱, 2: HPLC-ELSD 图谱

图 6-1 缬草提取物的 HPLC-ELSD 和 HPLC-UV 比较图

### 1.2.3 干扰峰处理方法的考察

缬草中化学成分复杂繁多, 各种类型化合物的相对含量差异不明显, 因此有必要对缬草样品提取溶液进行处理, 以达到去除干扰峰的目的。

对缬草样品 70%乙醇超声提取后的溶液, 分别考察了用 D-101 大孔吸附树脂和聚酰胺树脂纯化的处理方法。结果表明, 聚酰胺树脂纯化造成主要色谱峰的损失较大, 而 D-101 大孔吸附树脂能较好

的除去极性较大的亲水性杂质, 且对主要色谱峰的影响较小, 故选择 D-101 大孔树脂吸附作为处理干扰峰的方法。

#### 1.2.4 色谱流动相的考察

在紫外检测器 218nm 波长下, 比较乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%醋酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.2%醋酸水六种流动相的多种梯度洗脱方式, 结果表明乙腈-水洗脱系统的效果最佳, 采用该系统各个色谱峰的峰形和分离度均较好, 因此选定该系统作为缬草抗心律失常有效部位指纹图谱色谱分离的流动相。

#### 1.2.5 色谱柱的考察

取供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 在紫外检测器条件下, 选取乙腈-水洗脱系统, 比较 Alltima $C_{18}$  色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m)、Chromasil  $C_{18}$  色谱柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m) 和 Agilent  $C_{18}$  色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m) 三种色谱柱的分离效果。试验结果表明, Agilent $C_{18}$  色谱柱的分离效果最佳, 故选用该色谱柱作为缬草抗心律失常有效部位指纹图谱研究用色谱柱。

#### 1.3 供试品溶液的制备

取缬草药材超临界  $CO_2$  萃取后粉末约 2.0g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 30mL, 轻轻震荡, 超声处理 (250W, 频率 40KHz) 30 分钟两次, 静置 30 分钟后, 以 70%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 静置后滤过, 合并滤液, 取续滤液 40mL 置于蒸发皿中, 水浴加热挥去乙醇, 用适量蒸馏水溶解, 以乙酸乙酯萃取三次 (50mL/40mL/40mL), 弃去乙酸乙酯液; 水液水浴挥尽乙酸乙酯, 上样于 D-101 大孔树脂 (8g, 内径 2.5cm) 柱上, 用 100mL 蒸馏水洗脱, 弃去水液, 再用 90%乙醇 130mL 洗脱, 收集乙醇洗脱液, 挥干乙醇, 残渣用甲醇溶解, 定容至 10mL, 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 备用。

#### 1.4 色谱条件

Agilent  $C_{18}$  色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m), 柱温为 38 $^{\circ}C$ ; 进样量为 10 $\mu$ L; 检测波长 218nm; 流动相为乙腈 (A) -水 (B) 溶液非

线性梯度洗脱（洗脱程序表见表 6-2），体积流量为  $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

表 6-2 流动相洗脱程序表

时间 (min)	乙腈 (A%)	水 (B%)
0	4	96
20	11	89
25	15	85
50	17	83
60	22	78
70	25	75

## 1.5 方法学考察及相似度计算

### 1.5.1 精密度试验

取缬草样品 S3 供试品溶液连续进样 5 次,记录 HPLC 图谱。以第 7 号峰为参照峰,15 个共有峰的相对保留时间(见表 6-3)和相对峰面积(见表 6-4)的 RSD 值分别在 0.043%~1.352%和 0.0534%~2.804%之间,均小于 3%,符合指纹图谱要求。

### 1.5.2 重现性试验

取缬草样品 S3 粉末 5 份,分别制备成供试品溶液,注入液相色谱仪测定,并记录 HPLC 图谱。结果显示,以第 7 号峰为参照峰,15 个共有峰的相对保留时间(见表 6-5)和相对峰面积(见表 6-6)的 RSD 值分别在 0.036%~1.522%和 0.852%~2.764%之间,均小于 3%。符合指纹图谱要求。

### 1.5.3 稳定性试验

取缬草样品 S3 供试品溶液分别于制备后 0、3、6、9、12h 进样分析,记录色谱图,以第 7 号峰为参照峰,15 个共有峰相对保留时间(见表 6-3)和相对峰面积(见表 6-4)的 RSD 值分别在 0.043%~1.352%和 0.0534%~2.804%之间,表明供试品溶液在 12h 内基本稳定。

表 6-3 精密性/稳定性试验结果 (相对保留时间)

色谱峰号	试 验 号					平均值	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
1	0.2372	0.2372	0.2371	0.2360	0.2361	0.2367	0.254
2	0.3007	0.3013	0.3015	0.3008	0.3009	0.3011	0.109
3	0.6424	0.6405	0.6400	0.6370	0.6374	0.6394	1.352
4	0.8106	0.8103	0.8008	0.8071	0.8079	0.8090	0.189
5	0.8555	0.8557	0.8555	0.8547	0.8560	0.8555	0.058
6	0.8998	0.9008	0.9012	0.9015	0.9022	0.9011	0.100
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.000
8	1.0392	1.0389	1.0384	1.0381	1.0384	1.0386	0.043
9	1.0837	1.0834	1.0824	1.0811	1.0812	1.0824	0.111
10	1.2150	1.2138	1.2122	1.2106	1.2100	1.2123	0.171
11	1.2733	1.2720	1.2703	1.2682	1.2675	1.2703	0.192
12	1.3004	1.2992	1.2971	1.2954	1.2943	1.2973	0.198
13	1.5091	1.5068	1.5031	1.5009	1.4993	1.5038	0.272
14	1.5961	1.5940	1.5880	1.5855	1.5839	1.5895	0.335
15	1.8004	1.8028	1.8024	1.8039	1.8034	1.8026	0.074

表 6-4 精密度/稳定性试验结果 (相对峰面积)

色谱峰号	试 验 号					平均值	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
1	0.2279	0.2293	0.2267	0.2230	0.2250	0.2264	1.082
2	0.3167	0.3135	0.3049	0.3152	0.3102	0.3121	1.505
3	0.0812	0.0835	0.0819	0.0835	0.0820	0.0824	1.211
4	0.2458	0.2346	0.2283	0.2377	0.2379	0.2368	2.664
5	0.1323	0.1377	0.1310	0.1333	0.1398	0.1348	2.784
6	0.2794	0.2701	0.2700	0.2685	0.2758	0.2728	1.701
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.000
8	0.3323	0.3169	0.3315	0.3326	0.3320	0.3291	2.071
9	0.1965	0.1959	0.1921	0.2009	0.1943	0.1959	1.659
10	0.2258	0.2331	0.2375	0.2365	0.2314	0.2329	1.996
11	1.1608	1.1534	1.1473	1.1470	1.1467	1.1510	0.053
12	0.2192	0.2231	0.2157	0.2298	0.2296	0.2235	2.804
13	0.0951	0.0921	0.0945	0.0919	0.0929	0.0933	1.546
14	0.0940	0.0965	0.0942	0.0987	0.0984	0.0964	2.314
15	0.1143	0.1188	0.1159	0.1126	0.1183	0.1160	2.166

表 6-5 重现性试验结果 (相对保留时间)

色谱峰号	试 验 号					平均值	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
1	0.2372	0.2343	0.2302	0.2282	0.2314	0.2323	1.522
2	0.3007	0.2999	0.2967	0.2951	0.2977	0.2980	0.770
3	0.6424	0.6350	0.6280	0.6250	0.6263	0.6313	1.154
4	0.8106	0.8060	0.8018	0.7990	0.8004	0.8036	0.588
5	0.8555	0.8540	0.8690	0.8670	0.8680	0.8627	0.847
6	0.8997	0.9013	0.9027	0.9016	0.9025	0.9016	0.133
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.000
8	1.0392	1.0442	1.0374	1.0374	1.0377	1.0392	0.279
9	1.0837	1.0815	1.0820	1.0793	1.0791	1.0811	0.179
10	1.2150	1.2101	1.2095	1.2073	1.2056	1.2095	0.294
11	1.2733	1.2675	1.2662	1.2629	1.2622	1.2664	0.354
12	1.3004	1.2943	1.2929	1.2900	1.2885	1.2932	0.036
13	1.5092	1.4994	1.4958	1.4911	1.4889	1.4969	0.535
14	1.5961	1.5843	1.5796	1.5733	1.5716	1.5809	0.623
15	1.8004	1.8052	1.8073	1.8045	1.8047	1.8044	0.139

表 6-6 重现性试验结果 (相对峰面积)

色谱峰号	试 验 号					平均值	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
1	0.2278	0.2356	0.2389	0.2458	0.2358	0.2390	2.751
2	0.3298	0.3225	0.3219	0.3312	0.3285	0.3270	1.316
3	0.0521	0.0542	0.0533	0.0523	0.0542	0.0532	1.865
4	0.3221	0.3137	0.3211	0.3185	0.3008	0.3152	2.751
5	0.2629	0.2729	0.2724	0.2789	0.2698	0.2714	2.143
6	0.2832	0.2768	0.2724	0.2875	0.2687	0.2777	2.764
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.000
8	0.3323	0.3155	0.3381	0.3255	0.3288	0.3280	2.556
9	0.2196	0.2256	0.2218	0.2143	0.2244	0.2211	2.023
10	0.2510	0.2566	0.2501	0.2436	0.2588	0.2520	2.371
11	1.2066	1.2178	1.2202	1.2400	1.2306	1.2230	1.045
12	0.2189	0.2252	0.2156	0.2284	0.2254	0.2227	2.361
13	0.1056	0.1028	0.1097	0.1096	0.1078	0.1071	2.746
14	0.2940	0.3048	0.2875	0.2997	0.3033	0.2979	2.384
15	0.1142	0.1146	0.1141	0.1146	0.1165	0.1148	0.852



## 2 指纹图谱的测定及技术参数

### 2.1 指纹图谱的测定

将 10 批样品依据 1.3 项下供试品溶液的制备方法制备, 分别精密吸取 10  $\mu$ L 注入高效液相色谱仪, 按照 1.4 项下的色谱条件, 考察 120 分钟内各供试品溶液的分离情况, 截取 0~70 分钟的色谱图, 见图 6-2。

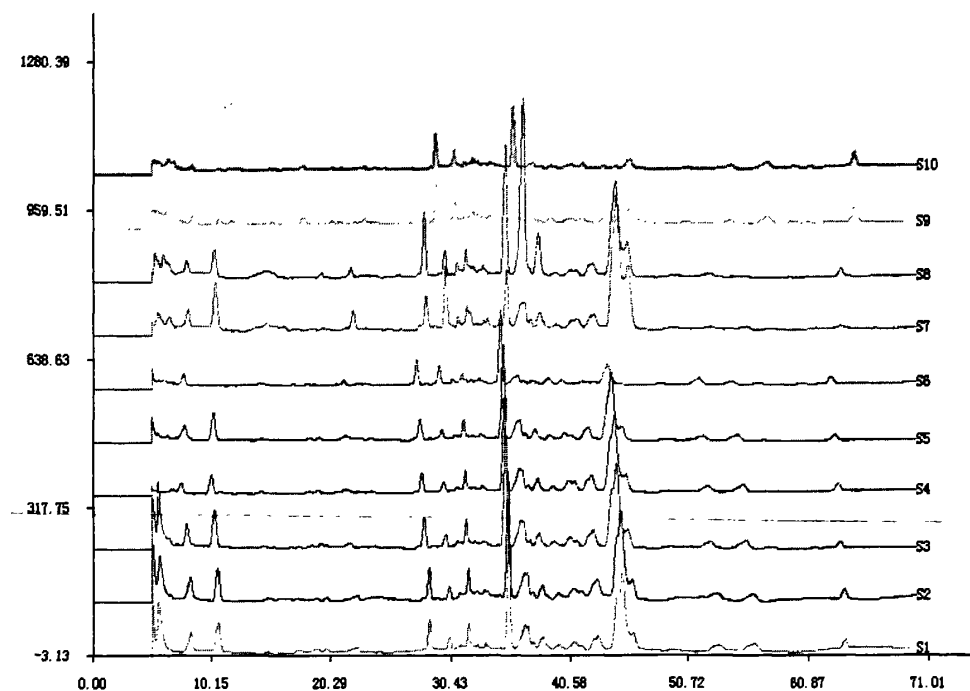


图 6-2 不同产地缬草抗心律失常有效部位指纹图谱

### 2.2 共有峰的标定

根据 10 批样品的测试结果, 比较其色谱图, 以相对保留时间标定 15 个共有色谱峰, 记录各共有峰的保留时间 (见表 6-7) 和峰面积 (见表 6-8)。在 15 个共有峰中, 第 7 号峰为主要峰, 选择此峰为参照峰 (S 峰), 计算各共有峰的相对保留时间 (见表 6-9) 和相对峰面积 (见表 6-10)。结果显示, 各样品共有峰的相对保留时间能够很好地反映缬草药材的指纹特征, 能够作为品种鉴别的依据。

表 6-7 共有峰的保留时间

样品 编号	峰 号														
	1	2	3	4	5	6	7 (S)	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	8.37	10.67	22.59	28.62	30.30	31.96	35.46	36.81	38.34	42.93	44.97	45.93	53.22	56.22	63.96
S2	8.36	10.66	22.57	28.61	30.31	31.95	35.41	36.77	38.29	42.85	44.88	45.83	53.09	56.09	63.86
S3	8.08	10.41	22.04	28.21	30.01	31.77	35.20	36.51	38.02	42.54	44.51	45.46	52.58	55.48	0.00
S4	7.60	10.14	21.52	28.02	30.46	31.69	35.11	36.41	37.90	42.41	44.35	45.30	52.37	55.28	63.38
S5	7.93	10.32	21.58	27.89	29.72	30.29	34.97	36.44	37.71	42.13	44.06	44.97	51.94	54.77	63.05
S6	7.78	0.00	21.43	27.55	29.47	31.39	34.74	36.22	37.49	41.53	43.79	44.68	51.58	54.33	62.74
S7	8.16	10.48	22.27	28.35	30.07	31.83	35.25	36.63	38.09	42.58	44.54	45.48	52.59	55.57	63.57
S8	8.07	10.40	22.09	28.21	30.55	31.74	35.15	36.68	37.98	42.48	44.45	45.41	52.57	55.53	63.55
S9	8.54	10.80	0.00	29.23	30.80	31.33	35.88	37.20	38.15	43.37	45.69	46.66	54.19	57.29	64.71
S10	8.48	10.74	22.73	29.17	30.74	31.24	35.87	36.87	38.10	43.34	44.46	45.62	54.18	57.26	64.70

表 6-8 共有峰的峰面积

样品 编号	峰 号														
	1	2	3	4	5	6	7 (S)	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	1088.6	1539.9	241.3	1254.0	689.5	1329.8	5039.9	1783.7	1151.1	1432.3	6090.2	1239.9	612.6	601.8	610.6
S2	1364.0	1570.5	426.8	1241.8	595.9	1732.4	5496.8	1803.6	1225.9	2700.7	9872.6	1448.8	482.9	819.1	601.2
S3	1016.2	1809.1	198.9	1299.8	677.9	1317.6	5485.7	1809.8	1217.0	1956.8	9305.2	1242.4	810.8	940.8	0.00
S4	550.2	965.4	210.8	894.5	136.7	1026.1	449.2	1517.9	1070.1	1786.6	8178.8	1169.8	661.4	878.3	510.7
S5	990.9	1329.3	436.9	1045.6	620.2	129.9	3894.1	1922.3	868.2	1271.4	6384.6	1002.2	468.9	635.8	398.2
S6	496.7	0.00	277.5	1089.0	953.5	515.1	3218.6	943.3	484.2	437.7	2052.5	148.2	652.0	351.0	514.3
S7	1007.7	2556.1	1045.0	1395.0	2809.4	872.4	2858.8	1850.7	1423.9	1752.3	13333.1	5677.1	107.3	382.6	347.6
S8	657.7	320.8	509.7	2531.0	114.6	1322.6	5954.9	10987.9	2701.7	1450.1	9732.0	2545.1	439.9	851.8	592.9
S9	365.6	260.1	0.00	1364.7	1108.9	159.9	3206.1	787.7	200.7	419.4	1672.5	293.9	302.4	7387.9	881.5
S10	215.0	76.4	52.4	1212.1	903.1	120.2	2703.7	118.9	150.8	173.2	62.9	809.6	329.8	6867.0	842.8

表 6-9 共有峰的相对保留时间

样品 编号	峰 号														
	1	2	3	4	5	6	7 (S)	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	0.23	0.30	0.64	0.81	0.85	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.27	1.30	1.50	1.59	1.80
S2	0.23	0.30	0.64	0.81	0.86	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.27	1.29	1.50	1.58	1.80
S3	0.23	0.30	0.63	0.80	0.85	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.26	1.29	1.49	1.58	0.00
S4	0.23	0.29	0.61	0.80	0.87	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.26	1.29	1.49	1.57	1.81
S5	0.23	0.30	0.62	0.80	0.85	0.87	1.00	1.04	1.08	1.20	1.26	1.29	1.49	1.57	1.80
S6	0.23	0.00	0.62	0.79	0.85	0.90	1.00	1.04	1.08	1.20	1.26	1.29	1.49	1.56	1.81
S7	0.23	0.30	0.63	0.80	0.85	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.26	1.29	1.49	1.58	1.80
S8	0.23	0.30	0.63	0.80	0.87	0.90	1.00	1.04	1.08	1.21	1.26	1.29	1.50	1.58	1.81
S9	0.24	0.30	0.00	0.81	0.86	0.87	1.00	1.04	1.06	1.21	1.27	1.30	1.51	1.60	1.80
S10	0.24	0.30	0.63	0.81	0.86	0.87	1.00	1.03	1.06	1.21	1.24	1.27	1.51	1.60	1.80
均值	0.23	0.30	0.63	0.80	0.86	0.89	1.00	1.04	1.08	1.21	1.26	1.29	1.50	1.58	1.80
RSD%	1.82	1.06	1.46	0.84	0.96	1.63	0.00	0.30	0.78	0.35	0.69	0.63	0.55	0.81	0.27

表 6-10 共有峰的相对峰面积

样品 编号	峰 号														
	1	2	3	4	5	6	7 (S)	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	0.22	0.31	0.05	0.25	0.14	0.26	1.00	0.35	0.23	0.28	1.21	0.25	0.12	0.12	0.12
S2	0.25	0.29	0.08	0.23	0.11	0.32	1.00	0.33	0.22	0.49	1.78	0.26	0.09	0.15	0.11
S3	0.19	0.33	0.04	0.24	0.12	0.24	1.00	0.33	0.22	0.36	1.70	0.23	0.15	0.17	0.00
S4	0.12	0.21	0.05	0.20	0.03	0.23	1.00	0.34	0.24	0.40	1.82	0.26	0.15	0.20	0.11
S5	0.25	0.34	0.11	0.27	0.16	0.03	1.00	0.49	0.22	0.33	1.64	0.26	0.12	0.16	0.10
S6	0.15	0.00	0.09	0.34	0.30	0.16	1.00	0.29	0.15	0.14	0.64	0.05	0.20	0.11	0.16
S7	0.35	0.89	0.37	0.49	0.98	0.31	1.00	0.65	0.50	0.61	4.66	1.99	0.04	0.13	0.12
S8	0.11	0.22	0.09	0.43	0.02	0.22	1.00	1.85	0.45	0.24	1.63	0.43	0.07	0.01	0.10
S9	0.12	0.09	0.00	0.45	0.37	0.05	1.00	0.26	0.07	0.14	0.55	0.10	0.10	0.24	0.29
S10	0.08	0.03	0.02	0.45	0.33	0.04	1.00	0.04	0.06	0.06	0.02	0.30	0.12	0.25	0.31

### 2.3 主要指纹峰峰面积的相对含量

对各样品共有峰的相对峰面积进行分析,结果显示,在所有的共有峰当中,第2、4、8号峰的峰面积接近或大于总峰面积的10%,7、11号峰的峰面积接近或大于总峰面积的20%,具有指纹意义,能够作为控制缬草质量的依据。

表 6-11 各样品主要指纹峰峰面积的相对百分含量 (%)

样 品	共 有 峰 号				
	2	4	7	8	11
S1	6.23	5.08	20.40	7.22	24.65
S2	5.02	3.97	17.57	5.76	31.26
S3	7.52	5.40	22.81	7.53	38.69
S4	4.01	3.72	18.68	6.31	34.01
S5	6.21	4.89	18.20	8.98	29.84
S6	0.00	8.98	26.53	7.77	16.92
S7	6.83	3.73	7.64	4.95	35.63
S8	3.23	6.18	14.54	26.83	23.77
S9	2.25	11.78	26.13	6.80	14.44
S10	0.90	14.33	31.93	1.41	0.74

### 2.4 共有峰总面积占总峰面积的比例

对各样品的峰面积进行统计,计算各样品的15个共有峰的总面积占总峰面积的比值(见表6-12)。结果显示几乎所有样品的共有峰总面积占总峰面积的比值均大于90%,即非共有峰总面积占总峰面积的比例小于10%,符合指纹图谱的技术要求。

表 6-12 各样品共有峰总面积占总峰面积的比例

样品	共有峰总面积	总峰面积	相对含量 (%)
S1	24705.44	26205.10	94.27
S2	31293.01	33410.77	93.66
S3	29088.24	32134.60	90.52
S4	24048.72	26300.02	91.44
S5	21398.48	23251.63	92.03
S6	12133.50	13401.25	90.54
S7	37418.90	42140.66	96.10
S8	40947.18	41714.70	98.16
S9	11582.38	12829.39	90.28
S10	8458.20	9505.73	88.98

## 2.5 参照图谱生成及相似度计算

用国家药典委员会主持开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A), 生成参照图谱 (中位数)<sup>[99]</sup>, 如图 6-3。计算各供试品的指纹图谱与参照图谱的相似度, 结果见表 6-13。

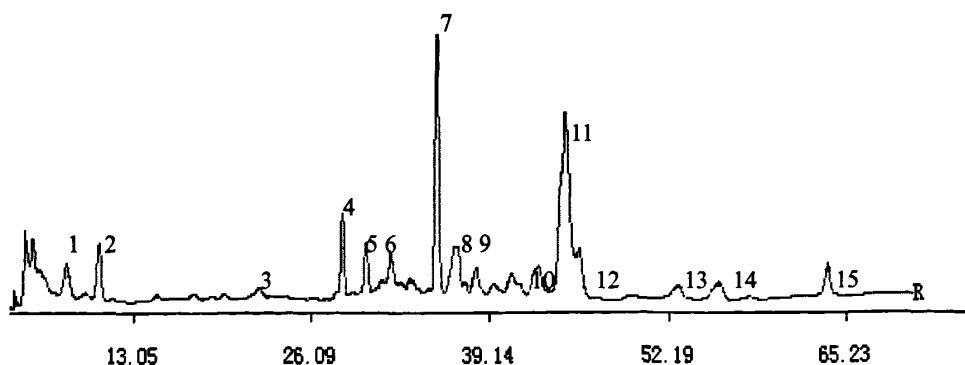


图 6-3 缬草抗心律失常有效部位参照图谱

表 6-13 各供试品指纹图谱与参照图谱的相似度比较

样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.891	S6	0.973
S2	0.964	S7	0.805
S3	0.980	S8	0.955
S4	0.975	S9	0.919
S5	0.975	S10	0.791

## 2.6 指纹图谱主要色谱峰的归属

精密称取绿原酸、橙皮苷对照品以及分离得到的各单体成分适量，以甲醇溶解，制成对照品溶液，注入高效液相色谱仪，采用指纹图谱的色谱条件，记录色谱图。通过各化合物色谱峰与缬草样品的色谱图比对，标定 2 号峰为绿原酸；15 号峰为橙皮苷；7 号峰为青刺尖木酯醇苷；8 号峰为 8-羟基松脂醇苷；其他的单体成分在图谱中未找到相对应的色谱峰。

## 2.7 缬草近缘品种有效部位指纹图谱的比较

采用缬草抗心律失常有效部位指纹图谱的色谱条件，对几种不同植物来源的缬草属植物样品进行测定（表 6-1 中的 S11 ~ S14 号样品），见图 6-4。各样品的抗心律失常有效部位图谱与所建立的缬草抗心律失常有效部位指纹图谱比较结果见表 6-14。结果表明，其他植物来源的各缬草属药用植物的图谱与缬草抗心律失常有效部位指纹图谱的差别明显，对缬草药用来源的考察有重要参考价值。



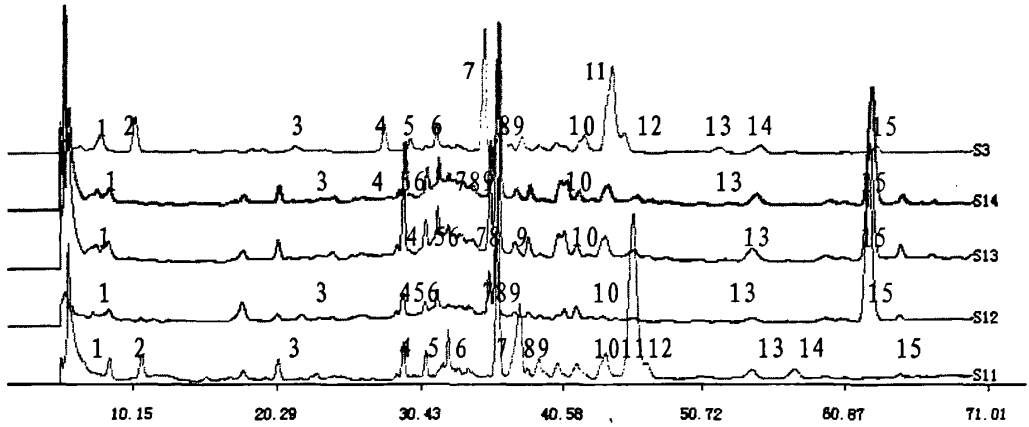


图 6-4 缬草近缘品种有效部位指纹图谱

S11 宽叶缬草 S12 蜘蛛香 (湖南) S13 蜘蛛香 (湖北) S14 黑水缬草 S3 缬草参照指纹图谱

表 6-14 缬草近缘品种有效部位指纹图谱的比较

样品	峰 号														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
宽叶缬草	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
蜘蛛香(湖南)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
蜘蛛香(湖北)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
黑水缬草	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

注：“+”表示有该共有峰，“-”表明没有该共有峰。

### 3 讨论

3.1 采用高效液相色谱法，通过对供试品制备方法、色谱条件、检测方法等进行比较全面的考察，对 10 个不同样品进行缬草抗心律失常有效部位指纹图谱的研究，建立了缬草抗心律失常有效部位的指纹图谱，并确定了 15 个共有峰。从统计数据可以看出，不同产地和不同采集时间以及不同保存时间的样品在峰数目上存在明显差异，6、9、10 号样品 2 号峰缺失，9、10 号样品 8、9 号峰缺失，而 7、8 号样品 8、9、11、12 号峰在峰面

积上明显高于其他样品；将 10 批样品与参照图谱比较，相似度均大于 0.79，从相似度可以发现我国不同地区样品存在较大的差异，不同产地及相同产地不同采收期的缬草在化学成分种类和量方面有一定的差异，因此建议采集样品应选择优质产地、且在最佳采收期采收，新鲜入药，不宜存放时间过久。

3.2 通过对缬草近缘品种有效部位指纹图谱的比较发现，缬草、蜘蛛香、宽叶缬草、黑水缬草这几种植物指纹图谱之间存在较大差别，而同一植物来源不同样品之间的差别明显小于不同植物来源的样品；说明缬草近缘品种之间化学成分的种类及含量存在一定的差异，应规范缬草药用植物的来源，保证临床用药安全有效。

3.3 由于缬草抗心律失常的活性化合物（或化合物群）仍未完全明确，其化学成分研究仍然在进行中，目前还不能对指纹图谱中的色谱峰进行全面指认，因此，明确缬草抗心律失常活性化合物（或化合物群），并指认图谱中各指纹峰的归属，有针对性的对指纹图谱研究方法进行进一步优化，是今后待解决的问题。

## 第七章 缬草活性成分的含量分析

缬草属药用植物,目前应用较多的有缬草 (*Valeriana offeinalis* L.), 蜘蛛香 (*Valeriana jatamansi* Jones) 等,1977 年版中国药典曾收载马蹄香 (*V. jatamansi* Jones)<sup>[3]</sup>;但关于缬草的质控标准多以镇静安神方面的活性成分为主,如挥发油、缬草烯酸、缬草酯<sup>[100-107]</sup>等;而缬草抗心律失常方面的活性成分质控标准未见报道,本论文在缬草抗心律失常活性成分研究的基础上,对其中的主要活性成分青刺尖木脂醇苷采用高效液相色谱法进行了含量测定分析。

### 1 仪器与试药

Waters 600 E 高效液相色谱仪,2996PDA 检测器,Empower 色谱工作站。Mettler Toledo AT20 型分析天平(万分之一);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。乙腈为美国 Baker 公司色谱纯;其他试剂均为分析纯;D-101 大孔树脂(天津市海光化工有限公司);水为双蒸水。

对照品:青刺尖木脂醇苷为本实验室分离纯化得到,按面积归一化法计算含量大于 98%,符合含量测定用对照品的要求,使用前置五氧化二磷中减压干燥至恒重。

缬草样品经湖北中医学院中药鉴定教研室吴和珍副教授鉴定为缬草属植物缬草 (*Valeriana offeinalis* L.)。

### 2 试验方法与结果<sup>[108]</sup>

#### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5μm);柱温为 30℃;进样量为 10μL;流速为 1.0mL·min<sup>-1</sup>;流动相为乙腈-水(16:84)。

检测波长的选择:以青刺尖木脂醇苷对照品溶液,在 200nm~400nm 范围内扫描,最大吸收在 228nm 左右,故确定检测波长为 228nm。

在以上选定条件下,取对照品溶液,供试品溶液进样,结果表明,青刺尖木脂醇苷和样品中其他组分色谱峰可达到基线分离,保留时间适当,

分离度较好。

## 2.2 对照品溶液的制备

精密称取五氧化二磷中减压干燥至恒重的青刺尖木脂醇苷对照品适量，置 25mL 量瓶中，以流动相溶解并稀释成  $0.152\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液，作为对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备

取缬草药材粉末约 1.0g，精密称定，置具塞锥形瓶中，用 70%乙醇 30mL，超声（250W，频率 40KHZ）提取两次，每次 30 分钟，滤过，合并滤液，减压回收溶剂至近干，用适量水溶解，以乙酸乙酯萃取三次（30mL/20mL/20mL），弃去乙酸乙酯液；水液水浴挥尽乙酸乙酯上样于 D-101 大孔树脂（8g，内径 2.5cm）柱，用 50mL 蒸馏水洗脱，弃去水液，再用 90%乙醇 70mL 洗脱，收集乙醇洗脱液，挥干乙醇，残渣用流动相溶解，定容至 10mL，摇匀， $0.45\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

## 2.4 标准曲线及线性范围

分别精密吸取上述对照品溶液 2、4、6、8 于 4 个 10mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，分别精密吸取稀释后各浓度对照品液及原对照品溶液  $10\mu\text{L}$ ，按上述色谱条件依次进样，测定，以峰面积(Y)为纵坐标，进样量(X)为横坐标绘制标准曲线，得回归方程  $Y=9207.5X - 41665$ ， $r=0.9999$ ，表明青刺尖木脂醇苷在  $0.304 \sim 1.520\mu\text{g}$  的范围内线性关系良好。

表 7-1 对照品线性范围测定结果

进样量( $\mu\text{g}$ )	0.304	0.608	0.912	1.216	1.520
峰面积	235892	521161	802256	1069945	1361039

## 2.5 精密度试验

精密吸取上述对照品溶液（ $0.152\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ） $10\mu\text{L}$ ，重复进样 5 次，测定峰面积，计算 RSD 为 0.80%，结果表明仪器精密度良好，试验结果见表 7-2。

表 7-2 精密度试验结果

试验号	1	2	3	4	5
峰面积	1357031	1370590	1376824	1374329	1387536
平均值	1373262				
RSD (%)	0.80				

## 2.6 稳定性试验

取同一批号供试品溶液，于制备后 0、2、4、6、8 小时，分别精密吸取 10 $\mu$ L，进样，测定峰面积，计算 RSD 为 1.13%，结果表明供试品溶液在 8 小时内基本稳定，试验结果见表 7-3。

表 7-3 稳定性试验结果

放置时间 (h)	0	2	4	6	8
峰面积	1241998	1269542	1244563	1239951	1232472
平均值	1245705				
RSD (%)	1.13				

## 2.7 重现性试验

取同一批号样品 5 份，每份 1.0g，精密称定，按上述条件，制备成供试品溶液，并测定含量，计算 RSD 为 0.58%，结果表明方法重复性良好，试验结果见表 7-4。

表 7-4 重现性试验结果

试验号	1	2	3	4	5
样品重	1.0516	1.0024	1.0086	1.0925	1.0003
含量 (mg.g <sup>-1</sup> )	1.4020	1.3892	1.3805	1.3867	1.3860
RSD (%)	0.58				

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品 5 份，每份 0.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，

分别精密加入一定量的青刺尖木脂醇苷对照品（70%乙醇溶解），照供试品溶液制备方法制备，并测定含量，计算加样平均回收率为 99.89%，RSD 为 1.08%。结果见表 7-5。

表 7-5 回收率试验结果

样品号	样品重 (g)	含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	均值 (%)	RSD (%)
1	0.499	0.6995	0.6080	1.3025	99.18		
2	0.502	0.7038	0.6080	1.3132	100.23		
3	0.498	0.6982	0.6080	1.2981	98.67	99.89	1.08
4	0.503	0.7052	0.6080	1.3223	101.50		
5	0.503	0.7052	0.6080	1.3124	99.87		

## 2.9 样品含量测定

精密称取本品，按供试品溶液制备方法制成供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 10 $\mu$ L，注入高效液相色谱仪，按上述条件测定，采用外标法计算含量。结果见表 7-6。结果表明：不同产地缬草中青刺尖木脂醇苷的含量有明显差异性，以湖北恩施和贵州剑河含量较高，还与采收季节和贮存时间有一定的关系，以当年 9-10 月份采收含量较高。

表 7-6 不同产地和不同采收时间缬草中青刺尖木脂醇苷的含量

样品编号	产地	采收季节	含量(mg.g <sup>-1</sup> )
1	湖北恩施	2007.10	1.3506
2	湖北恩施	2007.09	1.3439
3	湖北恩施	2007.08	1.3760
4	湖北恩施	2006.01	1.2154
5	湖南湘西吉首	2007.10	1.0471
6	湖南湘西吉首	2007.08	0.8856
7	贵州剑河	2007.10	1.3641
8	湖北恩施	2007.03	0.8462
9	湖北恩施	2005.08	0.7922

### 3 小结

3.1 实验过程中考察了不同的提取方法(超声,回流)、不同的溶剂(氯仿、甲醇)、以及不同的提取时间(20、30、40分钟)对青刺尖木脂醇苷含量的影响,最终确定用70%乙醇30mL超声两次,每次30分钟的提取方法;还考察到用D-101大孔树脂除杂质的方法分离效果较好。

3.2 考察了不同的流动相(乙腈-水,甲醇-水,甲醇-0.1%磷酸溶液)对青刺尖木脂醇苷的分离的影响,流动相为乙腈-水(16:84)时分离效果较佳。本方法能实现青刺尖木脂醇苷与有关物质的有效分离,保留时间适中。

3.3 本实验采用高效液相色谱法测定青刺尖木脂醇苷的含量,方法学验证表明,其精密度、稳定性、加样回收率和重复性均能满足定量要求,故本方法可用于缬草中青刺尖木脂醇苷的含量测定,为缬草药材质量控制提供参考。

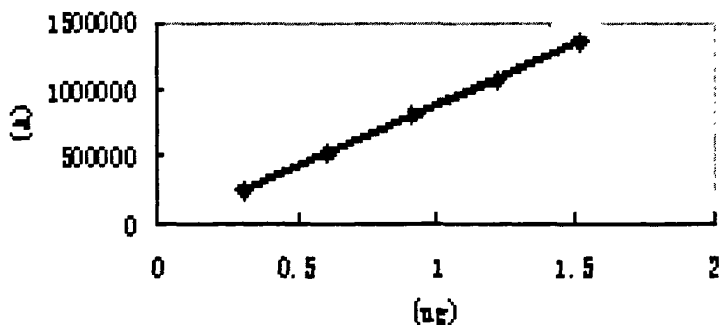


图 7-1 青刺尖木脂醇苷标准曲线图

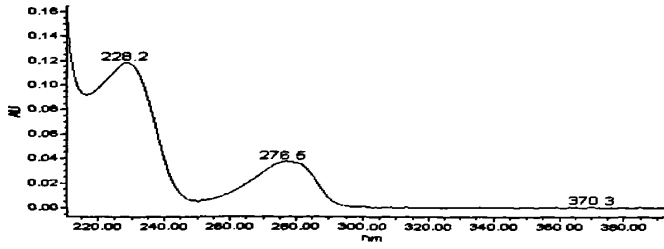


图 7-2 青刺尖木脂醇苷紫外吸收图

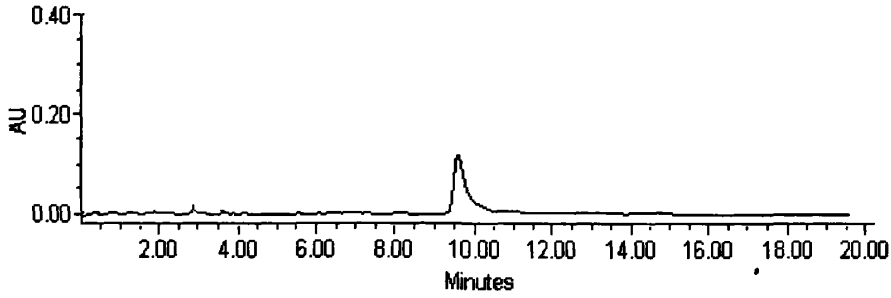


图 7-3 青刺尖木脂醇苷对照品 HPLC 色谱图

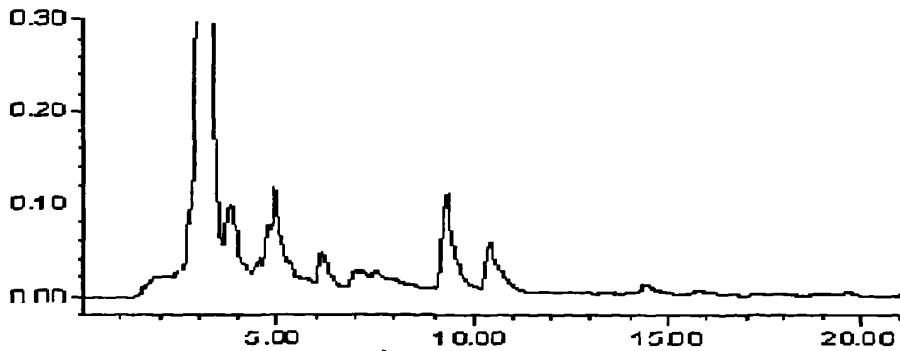


图 7-4 样品中青刺尖木脂醇苷 HPLC 色谱图



## 结语与创新

本论文在中医药理论指导下,采用中药化学、药理学、分析化学、电生理学等多学科交叉的研究方法,对中药缬草的抗心律失常作用的物质基础和质量分析进行了较系统的研究,取得了预期的研究结果。

本论文的创新性体现在以下几个方面:

1.在现代药理学跟踪下,确定了缬草抗心律失常有效部位;并从缬草抗心律失常有效部位中分离和鉴定了 5 种化合物;首次对缬草中分离出的化合物进行抗心律失常的活性筛选,从中筛选出两种化合物具有显著抗心律失常的生物活性,从而为阐释缬草抗心律失常的物质基础提供了科学依据。

2.首次对缬草抗心律失常主要活性成分青刺尖木脂醇苷进行了作用机理研究,取得了满意的研究结果。这对于释凝中药现代化的关键问题“什么物质有效和为什么有效”具有重要的示范意义;若以该抗心律失常有效成分作为先导化合物,进行化学合成或结构修饰研究,可望优选出抗心律失常最佳活性化合物,为开发有效抗心律失常药物提供依据。

3.采用现代分析技术,对缬草抗心律失常有效部位指纹图谱进行了研究,建立了缬草抗心律失常活性部位的指纹图谱;并对缬草不同产地和不同采收季节,以及缬草近缘品种间进行了对比研究,能有效控制缬草药材的质量。从而为该药材构建与国际接轨的质量评价体系奠定了一定基础。

4.采用现代分析技术,对缬草抗心律失常主要有效成分青刺尖木酯醇苷进行了含量分析,为完善缬草药材现行国家标准,以及为再版《中国药典》修订缬草药材质量标准提供了参考依据。

## 参考文献

- [1] 陈虎彪, 朱建民, 赵玉英等. 药用缬草及其中国产近缘种的化学分类学研究. 中成药, 1999; 21 (12): 652-654
- [2] 李时珍. 《本草纲目》(校对本)第2册, 北京: 人民卫生出版社, 1979, 845.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 1977年版, 一部, 北京: 人民卫生出版社, 1978, 633.
- [4] 石晋丽. 国产缬草属药用植物资源的研究. 北京中医药大学博士学位论文, 2004.
- [5] 黄宝康. 中国缬草属植物的生药学及缬草的种内变异研究. 第二军医大学博士学位论文, 2005.
- [6] 黄宝康, 郑汉臣, 秦路平, 等. 国产缬草属药用植物资源调查. 中药材, 2004; 27(9): 632-634.
- [7] 陈磊. 中国缬草属药用植物的生药鉴定和资源利用研究. 第二军医大学硕士学位论文, 2002.
- [8] 兰茂著, 《滇南本草》整理组整理. 滇南本草. 第2卷, 昆明: 云南人民出版社, 1977, 273.
- [9] 郭济贤. 中国缬草属植物叶毛茸的显微观察. 上海第一医学院学报, 1985; 12(4): 260-262.
- [10] 江泽荣. 毛节缬草的生药学研究. 药学学报, 1964; 11(11): 778.
- [11] 明东升. 中药蜘蛛香和缬草类的形态组织学研究. 上海医科大学学报, 1993; 20(3): 205-207.
- [12] 石晋丽, 刘勇, 肖培根. 缬草属植物化学成分与药理作用. 国外医药·植物药分册, 2003; 18(6): 231-239.
- [13] Picinell A L, arena S new lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with an antioxdative and vasorelaxant activities. Nat Prod, 2004; 67(7): 1135-1140.

- [14] Britta Schumacher, Silke Scholle, Josef Holzl, et al. Lignans Isolated from Valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors. *Nat. Prod*, 2002; 65: 1479-1485.
- [15] Femandez S, Wasowski C. sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Phamaool Biochen Behav*, 2004; 77(2): 399-404.
- [16] 徐红, 袁惠南, 潘丽华, 等. 缬草挥发油对中枢神经系统药理作用研究. *药物分析杂志*, 1997; 17(6): 399-401.
- [17] hillier K O. *Phytother Res*. 1996; 10(2): 145-151.
- [18] Malva J O. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extrats. *Neurotox Res*, 2004; 6(2): 131-140.
- [19] 吉富史郎. *Natural Medicines*. 2000; 54(2): 55- 60.
- [20] 曹斌, 洪庚辛, 等. 蜘蛛香的中枢抑制作用. *中国中药杂志*, 1994; 19(1): 40-42.
- [21] Oshima Y. *Chem Pharm Bull*. 1995; 43(1): 169-170.
- [22] 张宝恒, 孟和平, 王彤, 等. 缬草乙醇提取物(VES)对心血管的作用. *药学学报*, 1982; 17(5): 382.
- [23] 杨晶, 薛存宽, 朱咸中, 等. <sup>86</sup>Rb摄取示踪法评定几种中药提取物对心、肾组织微循环灌注量的影响. *微循环学杂志*, 1998; 8(1): 15-17.
- [24] 杨晶. 神农缬草挥发油的平喘作用. *中西医结合杂志*, 1988; 8: 28.
- [25] 陈灼芳. 墨香挥发油抗心律失常作用的研究. *中西医结合杂志*, 1990; 10(10): 614.
- [26] 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. *中华心血管病杂志*, 1979; 7(4): 275-282.
- [27] 袁韶华, 张宝恒, 吴凤筒. 缬草提取物(V3d)抗心律失常的实验研究. *中药药理与临床*, 1989 ; 5(6): 15-18.
- [28] 贾健宁, 张宝恒. 缬草提取物(V3d)对心血管系统的作用. *广西中医学*

院学报, 1999; 16(1): 40-42.

[29] 黄嵘嵘. 缬草提取物对兔心室肌细胞离子通道的影响. 武汉大学硕士学位论文. 2004. 5: 22.

[30] 薛存宽, 杨静, 等. 缬草提取物药效学研究及工艺探讨. 中药新药与临床药理, 1996; 7(3): 15-19.

[31] 胡昌兴. 宽叶缬草对高脂血症家兔血脂代谢的影响. 海军医高专学报, 1999; 21(2): 65-68.

[32] Keochanthai a- Bounthanh C. Phytotherapy Resear ch. 1993; 7: 124-127.

[33] Bos R. Phytomedicine. 1998; 5(3): 219-225.

[34] Fursa N S. Farmatsiva (Moscow). 1993; 42(6): 76.

[35] 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. 中华肾脏病杂志, 2003; 19(3): 168-172.

[36] 唐久余, 曾园山, 陈巧格, 等. 缬草对慢性应激导致的抑郁大鼠大脑海马 5-羟色胺水平、细胞增殖及神经元数量的影响. 中西医结合学报, 2008; 6(3): 283-288.

[37] 吴波, 付玉梅, 黄爱华, 等. 缬草挥发油对戊四氮致癫痫大鼠海马内  $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸含量的影响. 中华中医药学刊, 2008; 26(11): 2476-2477.

[38] 陈素美, 杨荣时, 曾玉兰, 等. 缬草提取物对大鼠实验性肺纤维化的干预作用. 医药导报, 2008; 27(11): 1295-1297.

[39] Kastke, Floyd A (USA). U.S pat Appl. Publ. US 20010025059 A127 Sep 2001; 9pp.; Cont-in-part of U.S. Ser.No. 175, 286 (English).

[40] Muraveva D A. Farmatsiya (Moscow), 1994; 43(3): 62.

[41] Fursa N S. Farmatsiya (Moscow), 1993; 43(1): 69.

[42] Aleksandrov S E. Farmatsiya (Moscow), 1994; 43(2): 65.

[43] Bolshakowa, I .V. Biofizika (Russian), 1997; 42(2): 480-483.

- [44] Inatle, D J. Et hnophar rracol, 2000; 72(1, 2): 47-51.
- [45] Mizumoto, Daigo. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001131026 A2 15 May, 2001; 1 Opp. (Japan).
- [46] 詹国瑛, 孙建琴, 孙晓红. 缬草的毒性及致突变性测试. 癌变·畸变·突变, 1996; 8(3): 180.
- [47] Tufik Sergio. Journal of thnopharmacology, 1994; 41(1-2): 39.
- [48] Monograph Valeriana officinalis. Alfem Med Rev, 2004; 9(4): 438-441.
- [49] Kohnen R, Oswald W D. The effects of Valerian, propranolol and their combination oactivation, performance, and mood of healthy volunteers under social stress conditions. Pharmcopsychiatry, 1988; 21: 447-448.
- [50] Eadie M J Could Valerian have been the first anticonvulsant. Epilepsia, 2004; 45(11): 1338-1343.
- [51] Herbalgram. 1996; (36): 16.
- [52] 都晓伟, 吴军凯. 缬草属植物化学成分及药理活性研究进展. 国外医药·植物药分册, 2006; 21(1): 10-14.
- [53] 杨桂元, 王玮. 宽叶缬草治疗冠心病的临床研究. 中国中西医结合杂志, 1994; 14(9): 540-542.
- [54] 黄峥嵘, 唐其柱, 史锡腾, 等. 非缬草单萜氧化物对单个兔心室肌细胞钠通道的影响. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2004; 18(3): 214-217.
- [55] 黄峥嵘, 唐其柱, 张丽娟等. 缬草单萜氧化物对兔心室肌线粒体ATP敏感性钾通道的影响. 中国中医与微循环杂志, 2005; 15(1): 69-71.
- [56] 徐淑云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法, 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 1172.
- [57] 汪晖, 吴基良. 药理学实验, 武汉: 湖北科技出版社, 2002, 63.
- [58] 张建超, 方颖, 刘焱文, 等. 正交法优化缬草挥发油超临界CO<sub>2</sub>流体提取工艺. 中成药, 2008; 30(2): 201-203.

- [59] 王辉, 罗顺德. 二乙酰基莲心碱抗实验性心律失常的作用. 中国医院药学杂志, 2001; 21 (6): 328.
- [60] 龚冬梅, 单宏丽, 周宇宏, 等. 哇巴因和乌头碱诱发豚鼠和大鼠心律失常的离子作用靶点. 药学学报, 2004; 39 (5): 328-332.
- [61] 马亮, 杨娇, 傅善权, 等. 野生与家种缬草挥发油GC-MS分析. 重庆工学院学报(自然科学版), 2007; 21 (5): 119-123.
- [62] 吴筑平, 刘密新, 姚焕新, 等. 缬草挥发油化学成分的研究. 中国中药学杂志, 1999; 34 (11): 733-735.
- [63] 陈虎彪, 徐学明, 赵玉英. 毛节缬草挥发油化学成分的研究. 中国中药杂志, 1998; 23 (7): 418-421.
- [64] 王立群, 熊义涛, 陶福华, 等. 宽叶缬草挥发油成分分析. 中药材, 1999; 22 (6): 298-301.
- [65] 周琳, 张悦. 野生黑水缬草和北缬草根精油的分析. 国土与自然资源研究, 2006; 2: 92-93.
- [66] Safaralie A, Fatam iS, Sefidkon F. E ssential oil composition of *Valerin and officinalis* L. roots cultivated in Iran comparative analysis between supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydrodistillation. J Chrom atogrA, 2008; 1180(1-2): 159-162.
- [67] 明东升, 郭济贤, 顺庆生, 等. 四种缬草生药挥发油化学成分的气相层析-质谱联用鉴定. 中成药, 1994; 16 (1): 41-43.
- [68] 谷臣华, 吕盛槐, 谷力. 缬草花油的提取与GC-MS测定. 林产化学与工业, 1999; 19 (3): 75-78.
- [69] 周霆, 黄宝康. 缬草挥发油的化学成分及药理活性研究进展. 时珍国医国药, 2008; 19 (11): 2663-2664.
- [70] Anna Lisa Piccinelli, Swizly Arana, Armando Caceres, et. New Lignans from the Roots of *Valeriana prionophylla* with Antioxidative and Vasorelaxant Activities. Nat. Prod. 2004; 67: 1135-1140.
- [71] Britta Schumacher, Silke Scholle, Josef Ho · lzl, Lignans

Isolated from Valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors. *Nat. Prod.* 2002; 65: 479-1485.

[72] Sun LN, Hong YF. Chemical Constituents of *Chaenomeles sinensis* (Thouin.) Koehne. *China Pharm*, 2000; 9(1):6-9.

[73] Ays, e Kuruu·· zu·· m-Uz, Zuhai Gu·· venalp, L. O·· mu·· r Demirezer, et. al. 40-Deoxy iridoid glycosides from *Centranthus longiflorus*. *Phytochemistry* 2002 ; 6(1): 937 - 941.

[74] 张赞彬, 谈毅婷. 甘薯渣中多酚类化合物的分离与结构鉴定. *食品研究与开发*, 2007; 28(12):120-122.

[75] Hamill OP, Many A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 1981; 391(2): 85-100.

[76] xiao Gs, zhou JJ, Wang Gy, et al. In vitro Electrophysiological effects of morphine in Rabbit. Ventricular myocytes. *Anesthesiology*, 2005; 103(2):280-286.

[77] 李泱. 离子通道与膜片钳技术. 甘肃: 甘肃文化出版社, 2001, 151

[78] 杜景霞, 张晓华, 胡燕, 等. 白藜芦醇对豚鼠心室肌细胞钠电流的影响. *中国现代应用药学杂志*, 2008; 25(4): 290 - 293.

[79] 王赫, 周宇宏, 单宏丽, 等. 冬虫夏草水提液对豚鼠及人鼠心室肌细胞钾通道的作用. *中国药理学通报*, 2004; 20(5) : 536-539.

[80] 张绪国, 王家宁, 李建军, 等. 银杏叶提取物对豚鼠心室肌细胞动作电位及 L 型钙离子通道的影响. *中国临床药理学与治疗学*, 2004; 9(3): 345-349.

[81] Deng C Y, Lin S G, Yang M, et al. Effect of carvedilol on sodium channel current in isolated ventricular myocytes of rats. *Chin Pharmacol Bull*, 2005; 21(5): 568-572.

- [82] 邝素娟, 邓春玉, 钱卫民, 等. 醋柳黄酮对大鼠心室肌细胞瞬间外向整流钾电流的影响. 国药理学通报, 2007; 23(9): 1237-1240.
- [83] 聂宏光, 陈磊, 王岩, 等. 羧甲基壳聚糖对大鼠单一心室肌细胞 ATP 敏感钾电流的作用. 中国海洋药物杂志, 2008; 27(1): 26-27.
- [84] 邓春玉, 唐承静, 邝素娟, 等. 灯盏花素对大鼠心室肌细胞瞬间外向和内向整流钾电流的影响. 中国病理生理杂志, 2008; 24(1): 84-88.
- [85] 李红, 张爽, 石卓, 等. 蒺藜皂苷对成年豚鼠心室肌细胞钾电流的影响. 吉林大学学报 (医学版), 2008; 34(6): 927-930.
- [86] 张华. 内向整流钾通道—葛根素防治心律失常及其机制的实验研究. 第四军医大学博士学位论文; 2002. 5.
- [87] 李晓光, 张文杰, 孙莹, 等. 黄芪总黄酮对豚鼠心室肌细胞动作电位和延迟整流钾电流的作用. 心肺血管病杂志, 2008; 27(1): 49-51.
- [88] 孙宏丽, 董德利, 李磊, 等. 三氧化二砷对豚鼠心室肌细胞钾电流的影响. 中国药学杂志, 2008; 43(24): 1867-1870.
- [89] 高分飞, 黄展勤, 周燕琼, 等. 心肌细胞分离方法的改进及其钾电流的观察. 广西医科大学学报, 2008; 25(3): 338-340.
- [90] 陈修. 心血管药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 483-486.
- [91] Dorian P. Antiarrhythmic drug therapy of atrial fibrillation: focus on new agents. *Cardiovasc Pharmacol*, 2003; 8: S27-S31
- [92] Peukert S, Brendel J, Pirard B, et al. Identification, synthesis and activity of novel blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *J Med Chem*, 2003; 46: 486-498.
- [93] Noda Y, Anzai K, Mori A, et al. Shirunei M and Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int*, 1997; 42(1): 35-44.
- [92] Pietri S, Maureli E, Drieu K, et al. Cardioprotective and antioxidant effects of the terpenoid constituents of ginkgo



- biloba eXtract (EGB761). J MolCell Cardio, 1997; 29 (2): 733- 742.
- [95] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第 7 期. 第 12 卷, 上海: 上海科技出版社, 1999, 574.
- [96] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术, 北京: 化学工业出版社, 2002: 108.
- [97] 陈磊, 康鲁平, 秦路平, 等. 缬草属药用植物 HPLC 指纹特征研究. 中药材, 2003; 26 (4): 256 - 259.
- [98] 石晋丽, 刘勇, 肖培根. 缬草属药用植物极性成分的 HPLC 指纹图谱研究. 中国中药杂志, 2005; 30 (6): 427-429.
- [99] 《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知》. 中国药品标准, 2000; 1 (4): 3.
- [100] 崔亚君, 穆赫塔尔·亚森, 岳松健, 等. 七种缬草属植物中缬草三酯和乙酰缬草三酯含量考察. 西北药学杂志, 1999; 14 (4): 152-153.
- [101] 黄仁泉, 张立, 杨建丽. 不同种缬草中缬草三酯和缬草烯酸类成分的 HPLC 的分析和比较. 中草药, 2002, 33 (11) : 1000-1001.
- [102] 傅亮, 楚清脆, 黄宝康, 等. 毛细管电泳-电化学检测法测定蜘蛛香中多元酚类化合物. 分析化学, 2005; 33 (2): 161-164.
- [103] 明东升, 郭济贤. 缬草类生药中总缬草素的含量测定. 上海医科大学学报, 1993; 20 (3): 210-212.
- [104] 陈磊, 康鲁平, 秦路平, 等. 总缬草素的质量标准和镇静催眠活性研究. 中成药, 2003; 25 (8): 663-665.
- [105] 陈磊, 秦路平, 郑汉臣, 等. 三种缬草属植物的缬草素类含量种间和种内比较. 中药材, 2002; 25 (4): 237-238.
- [106] 张素霞. 缬草根和根茎中的挥发油、缬草酸及其衍生物和缬草三酯含量的季节变化及药用植株选择. 国外医药. 植物药分册, 1999; 14 (1): 21-22.
- [107] 左月明. 黑水缬草抗老年痴呆有效部位化学成分和药理作用研究. 黑龙江中医药大学博士学位论文, 2007, 5.
- [108] 中国药典. 2005 年版, 一部, 北京: 人民卫生出版社, 2005: 附录 33.

附图

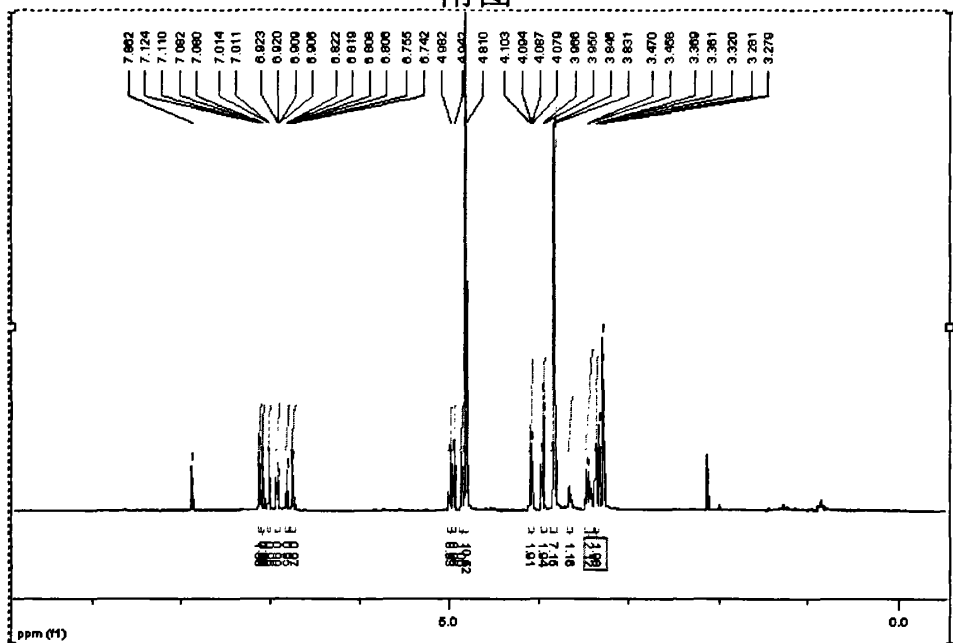


Fig.3-2 <sup>1</sup>H-NMR of Compound I

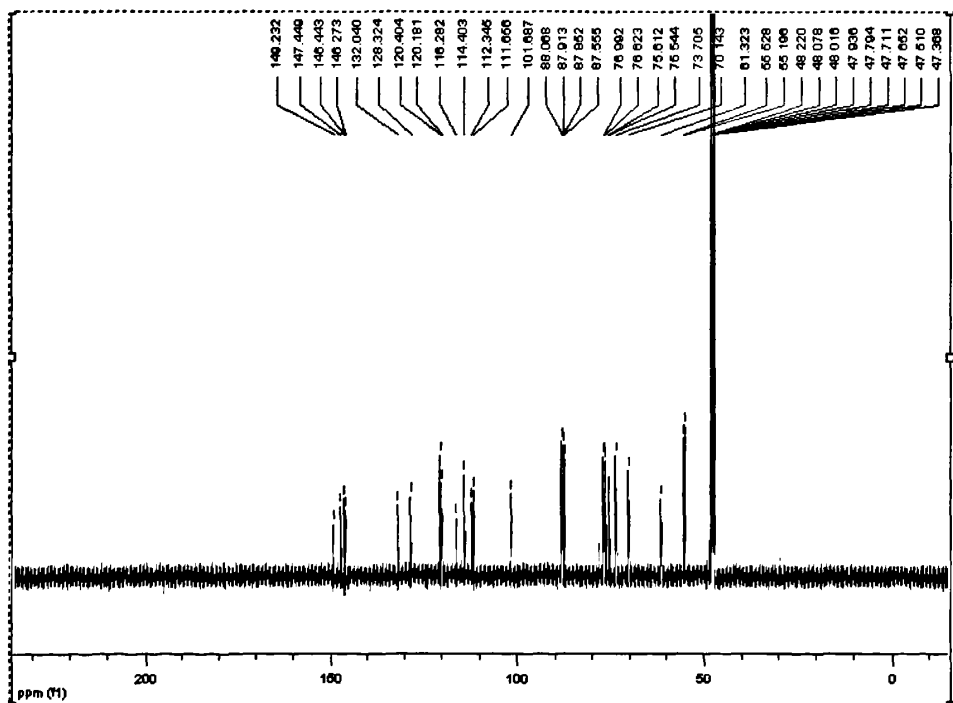


Fig.3-3 <sup>13</sup>C-NMR of Compound I

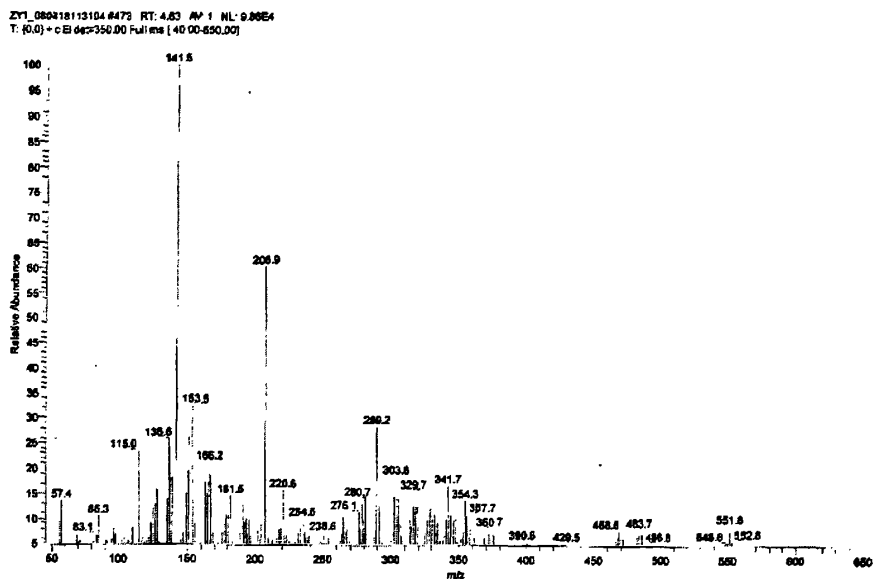


Fig.3-4 EI-MS of Compound I

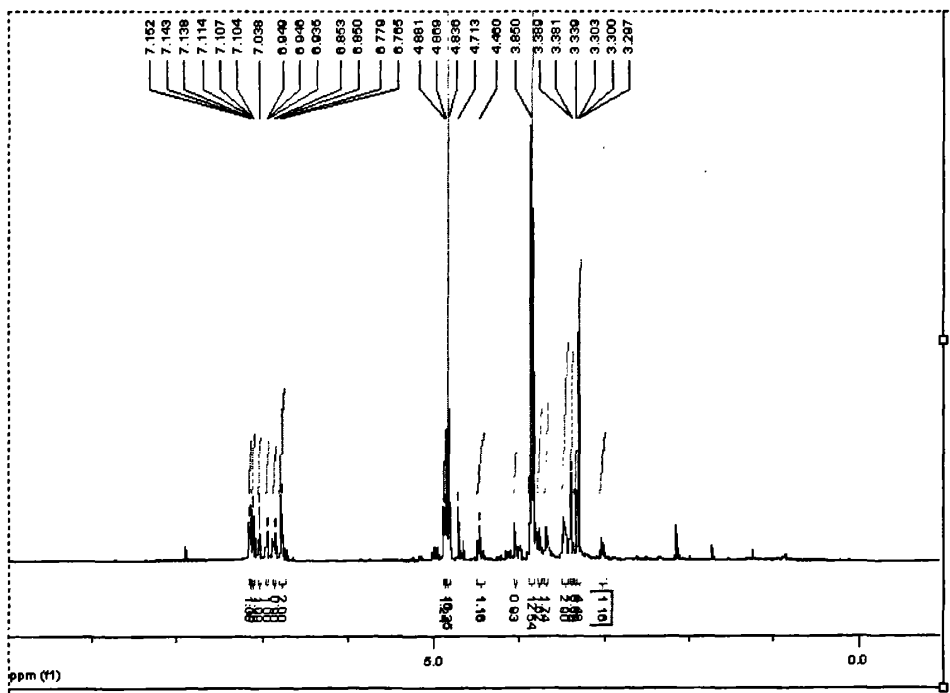


Fig. 3-5 <sup>1</sup>H-NMR of Compound II

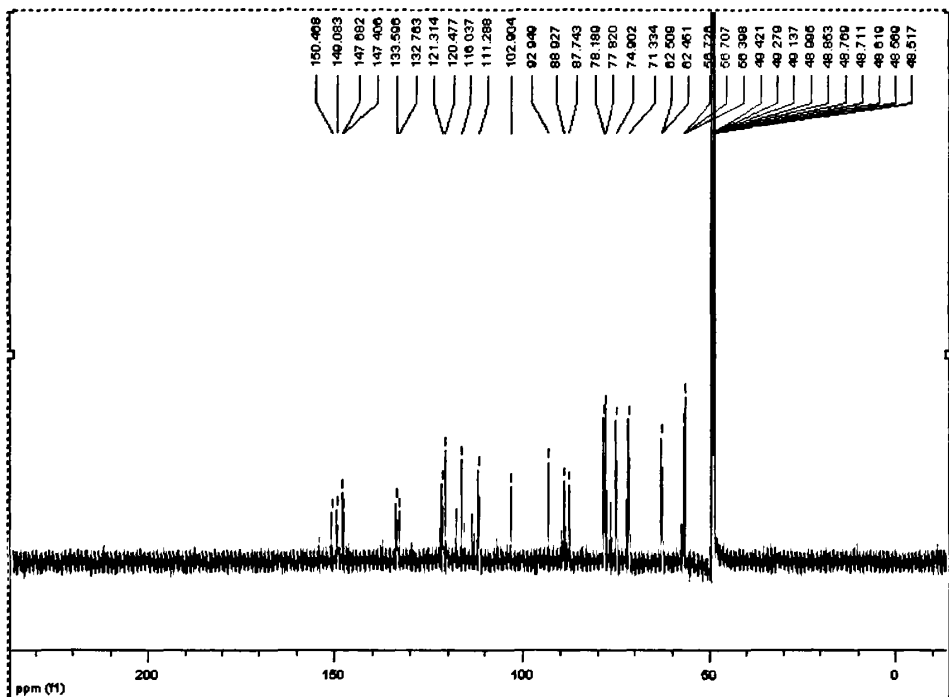


Fig. 3-6  $^{13}\text{C}$ -NMR of Compound II

2/2 #407 RT: 3.87 AV: 1 NL: 1.26E5  
T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-650.00]

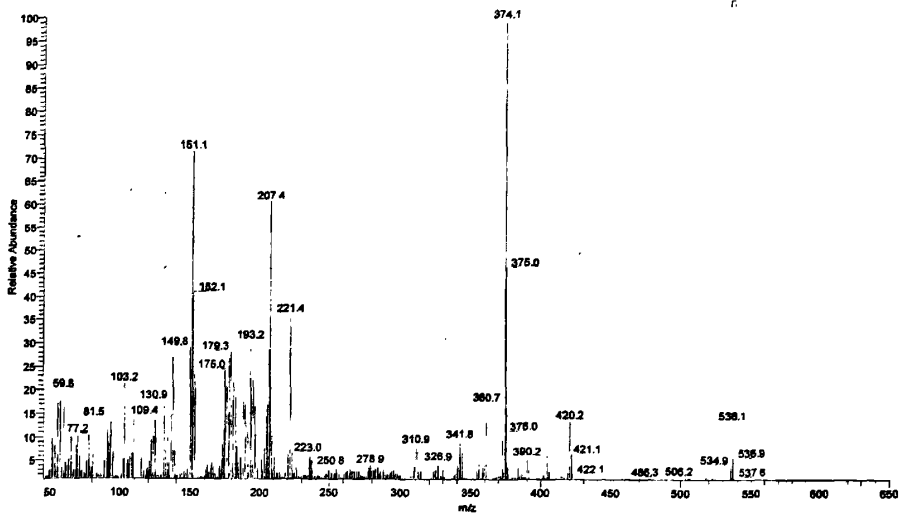


Fig. 3-7 EI-MS of Compound II

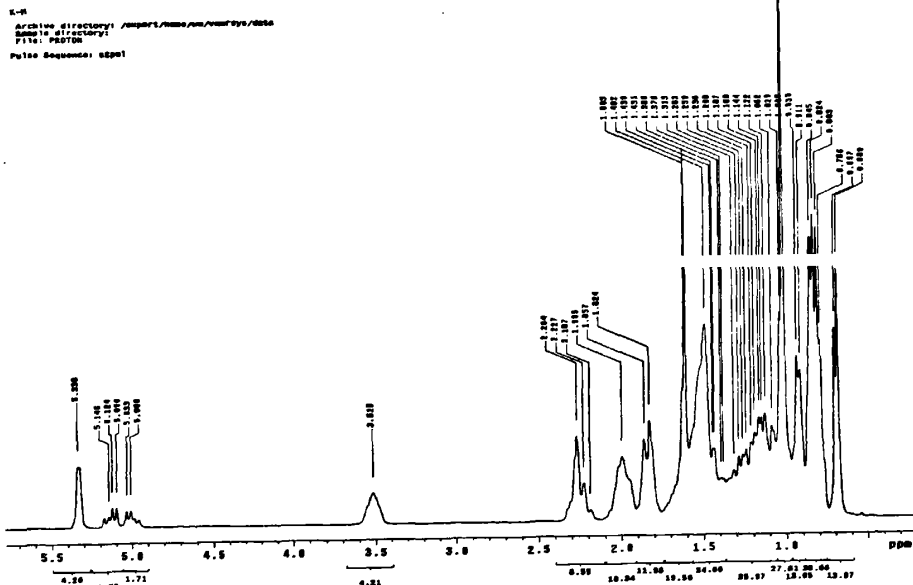


Fig.3-8  $^1\text{H-NMR}$  of Compound III

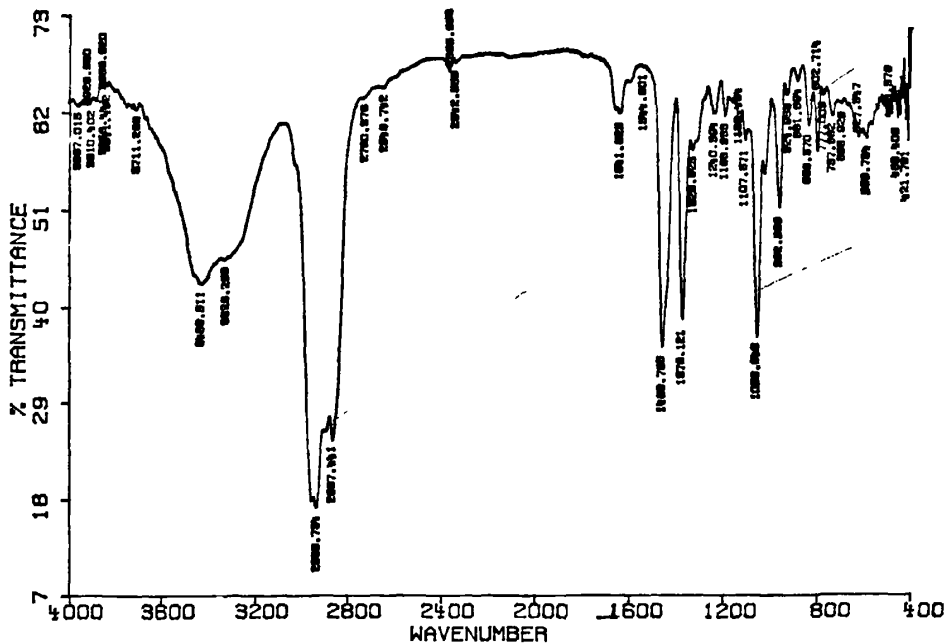


Fig.3-9 IR of Compound III

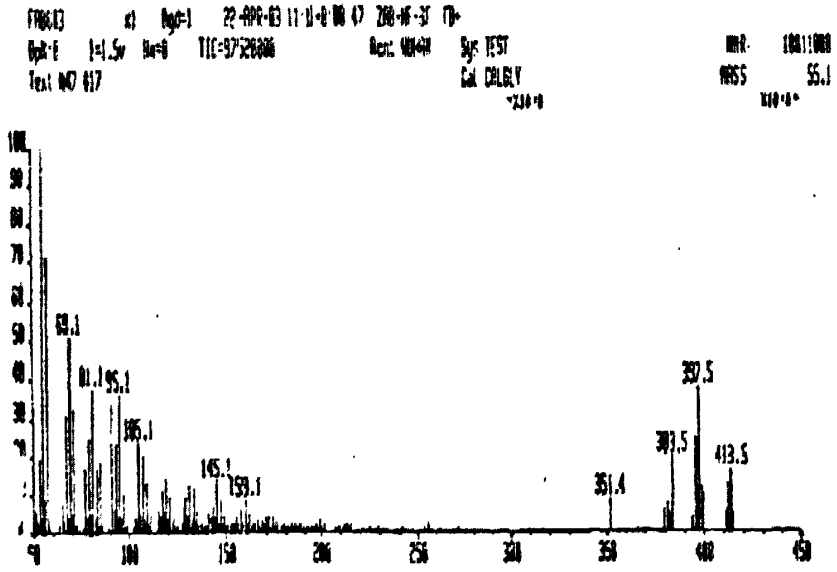


Fig. 3-10 FAB-MS of Compound III

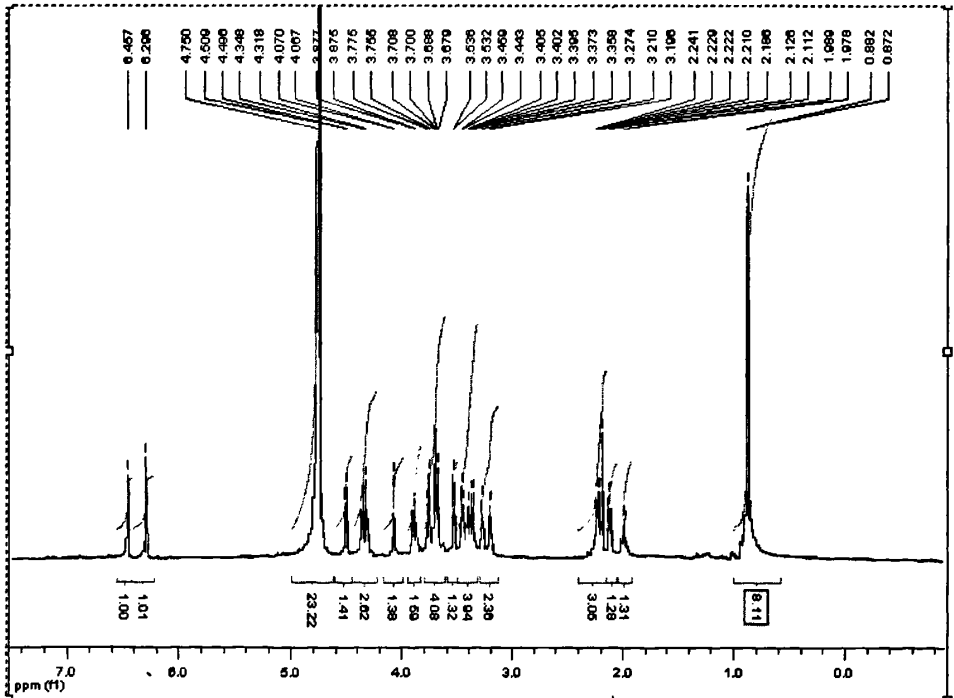


Fig.3-11  $^1\text{H-NMR}$  of Compound IV

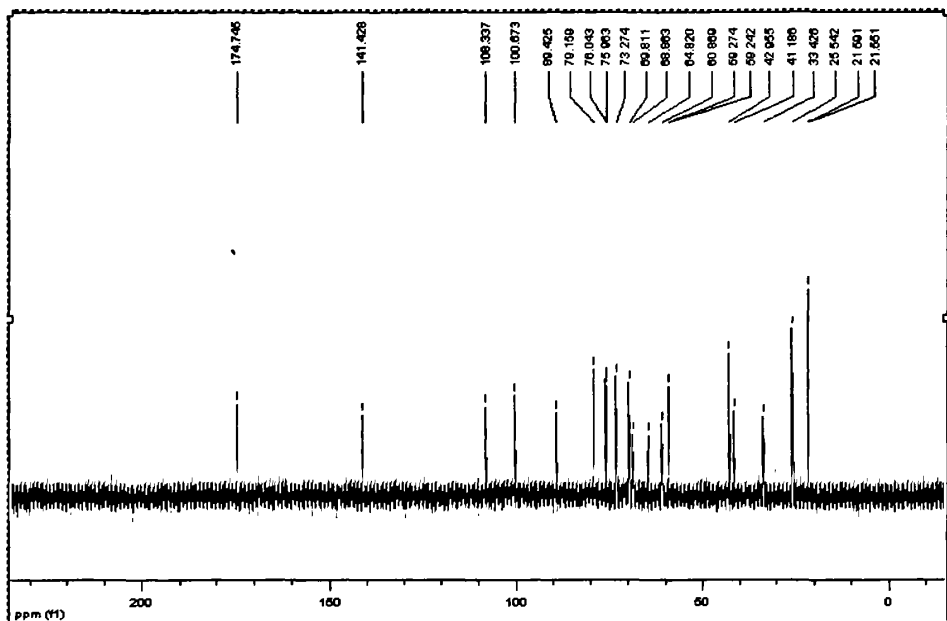


Fig. 3-12  $^{13}\text{C}$ -NMR of Compound IV

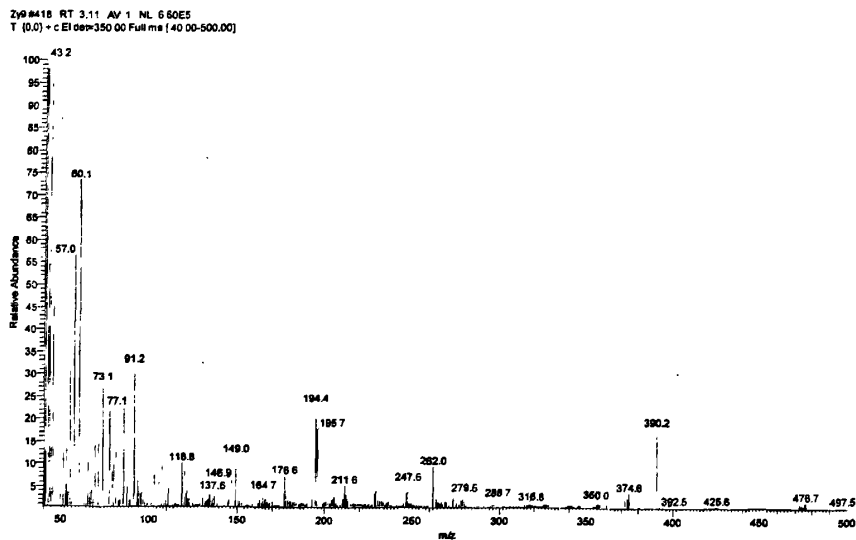


Fig. 3-13 EI-MS of Compound IV

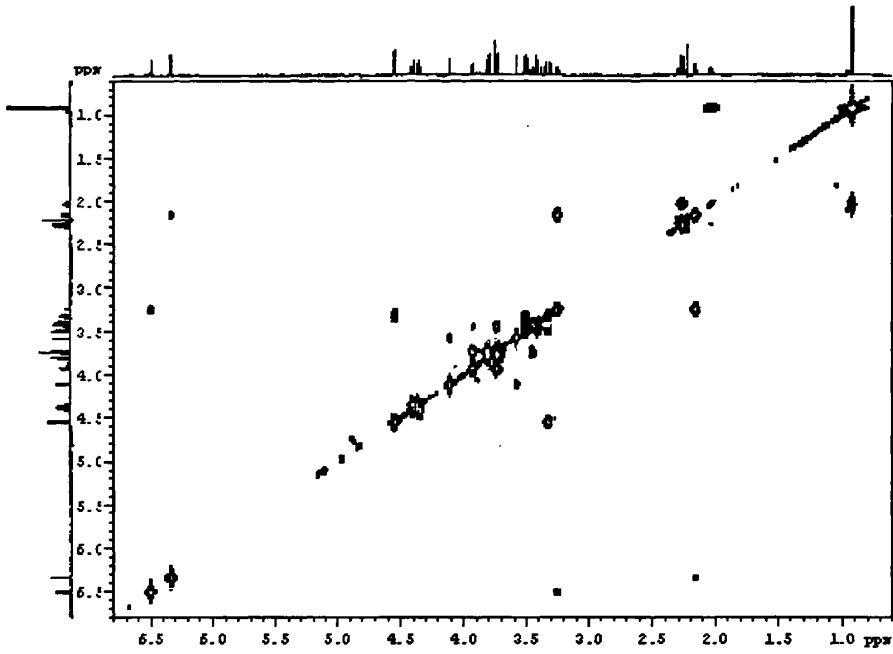


Fig. 3-14  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY of Compound IV

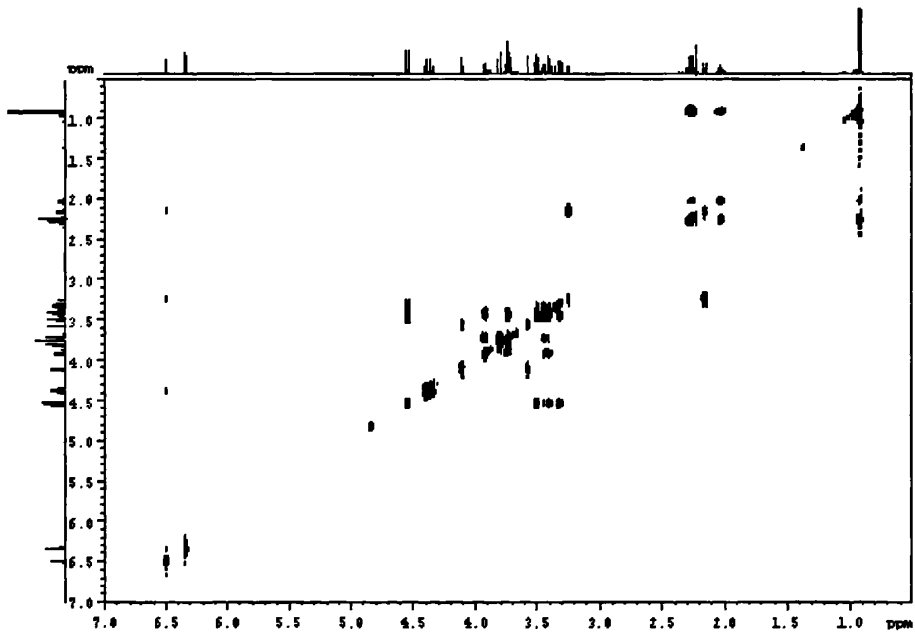


Fig. 3-15  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY of Compound IV



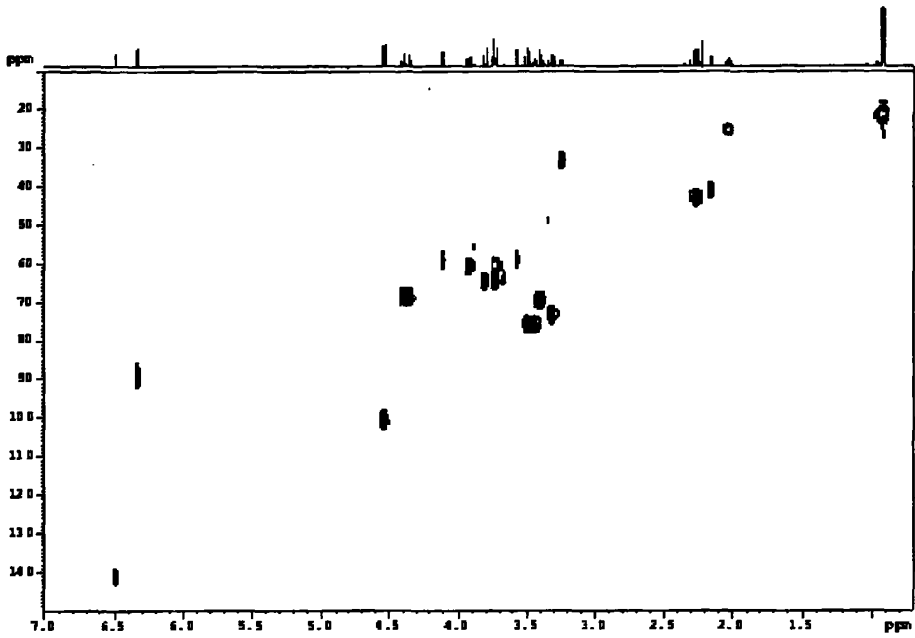


Fig. 3-16 HSQC of Compound IV

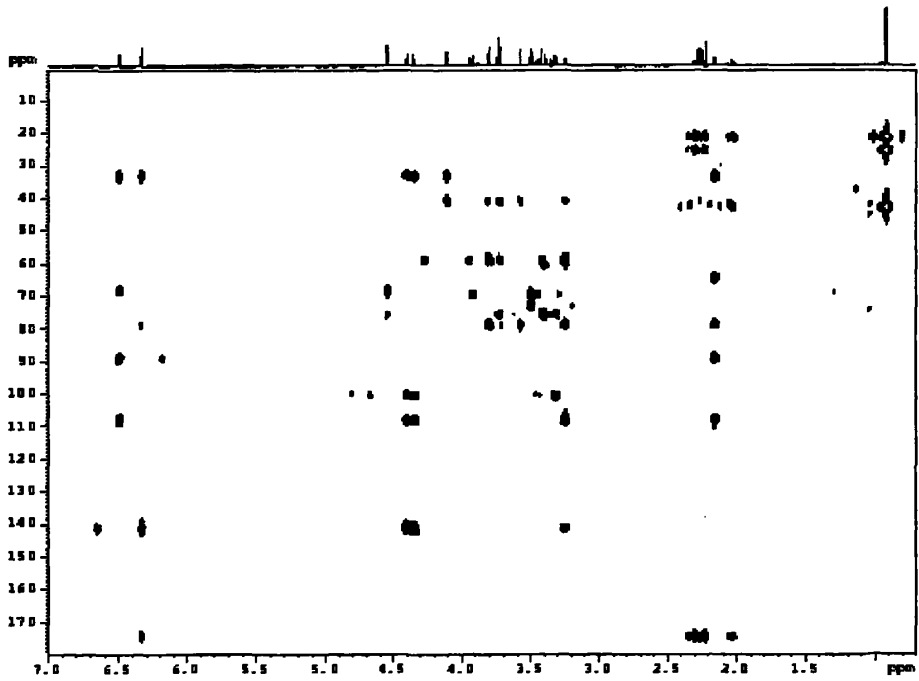


Fig. 3-17 HMBC of Compound IV

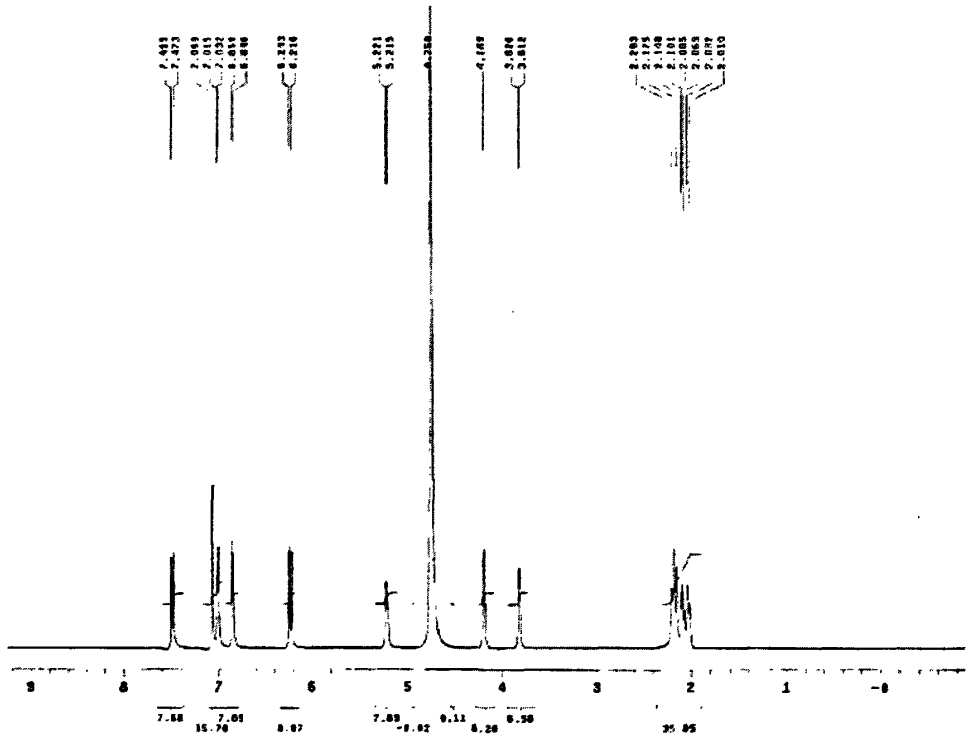


Fig. 3-18 <sup>1</sup>H-NMR of Compound V

## 攻博期间已发表和待发表的文章

1. 段雪云, 方颖, 周颖, 龚占峰, 刘焱文\*. 缬草属植物综合研究概况. 中国药师, 2008; 7: 793 - 796.
2. 段雪云, 龚占峰, 陈树和, 方颖\*, 刘焱文\*. 缬草抗心律失常有效部位的指纹图谱研究. 中药材, 2009; 6 待发表.
3. 段雪云, 龚占峰, 周颖, 方颖, 刘焱文\*. 缬草抗心律失常活性部位的筛选. 中国药师, 2009. 7 待发表.
4. 段雪云, 许腊英, 毛翼. 姜梅安康口服液中生姜提取方法的研究. 湖北中医杂志, 2007; 8: 58 - 59.
5. 段雪云, 陈树和, 文莉, 师磊, 刘焱文\*. 紫苏配伍组方对高脂血症模型大鼠的调脂作用. 医药导报, 2008; 11: 1323 - 1325.
6. 段雪云, 范恒, 陈树和\*, 刘焱文. 高效液相色谱法测定复方甲亢片中甲巯咪唑的含量. 药物分析杂志, 已录用.

## 致 谢

衷心感谢刘焱文教授在学业上对我的悉心指导,在生活和工作上无微不至的关怀。导师渊博的理论知识、严谨的治学态度、创新的科学思维和孜孜不倦的敬业精神都将令我受益终生。在此,谨向我的导师致以衷心的感谢和诚挚的敬意。

感谢国家自然科学基金委对本课题的资助,感谢方颖老师给我提供课题研究的机会。

感谢陈树和主任药师、文莉副教授、杨艳芳老师、吴和珍副教授、王光忠副教授、许腊英教授、干国平副教授、余子川副教授、何再安副教授、韩建伟研究员、刘超英副教授、咎俊峰老师、唐尹萍老师对课题的设计、实验和论文撰写等方面的大力帮助。

感谢华中理工大学同济医学院金满文教授、范恒教授、王宏飞硕士在药理筛选方面给予的大力帮助。

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。

感谢袁丁博士、黄显章博士、殷丹博士以及周颖、龚占峰、陈进文、章文颖、张明、尹玲等硕士的无私帮助。

感谢药学院和研究生部的领导和老师们在我学习期间给予的关心和帮助。

感谢湖北省中医院药事部的领导和同事们在我学习期间给予的关心和帮助。

感谢所有关心和帮助过我的老师、同学和朋友。

最后我还要特别感谢我的家人,在我学习期间给我的关心、支持和鼓励,使我得以顺利完成学业。