



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102924554 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201210419579. 6

(22) 申请日 2012. 10. 29

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 张颖君 许敏 王东 朱宏涛
杨崇仁

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07J 7/00(2006. 01)

C07J 17/00(2006. 01)

A61K 31/57(2006. 01)

A61K 31/704(2006. 01)

A61P 25/08(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101953864 A, 2011. 01. 26, 说明书第 1 页
第 [0004] 段, 第 5 页.

CN 1148958 A, 1997. 05. 07, 说明书第 2 页.

CN 1150951 A, 1997. 06. 04, 说明书第 1-2
页.

CN 1190404 A, 1998. 08. 12, 全文.

Shin-Ichi Yoshimura et al.. "Studies
on the Constituents of Asclepiadaceae
Plants. LIX. The Structures of Five New
Glycosides from *Dregea volubilis* (L.)
BENTH. ". 《Chem. Pharm. Bull. 》. 1985, 第 33 卷
(第 6 期), 2287-2293.

Xiao-Xia Ma et al.. "Identification
of new qingyangshengenin and caudatin
glycosides from the roots of *Cynanchum
otophyllum*". 《Steroids》. 2011, 第 76 卷
1003-1009.

Xiao-Xia Ma et al.. "New pregnane
glycosides from the roots of *Cynanchum
otophyllum*". 《Steroids》. 2007, 第 72 卷
778-786.

审查员 原悦

权利要求书1页 说明书20页 附图3页

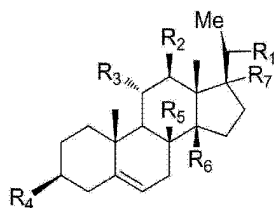
(54) 发明名称

C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体类衍生物及其
药物组合物和其在医药中的应用

(57) 摘要

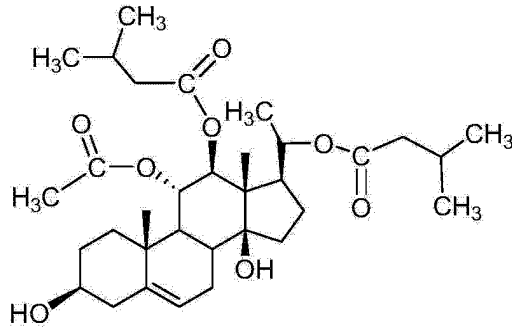
提供通式 I 的 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾
体类衍生物及其药用盐及配糖体, 以其为活性成
分的药物组合物, 其在制备治疗癫痫病的药物中
的应用。式 I 中 :R₁、R₂、R₃各自独立的为酮基、羟
基及取代酰酯基、氨基及取代酰氨基 ;R₄为酮基、
羟基及取代酰酯基、氨基及取代酰氨基、糖基 ;R₅、
R₆、R₇各自独立的为氢、羟基及其取代酰酯基、氨

基及取代酰氨基。



(I)

1. 结构式 (I) 所示的 C - 3, 11, 12, 20 - 四取代 C - 21 甾体类衍生物及其药用盐及配糖体,



(I)。

2. 抗癫痫病的药物组合物,其中含有权利要求 1 所述的 C - 3, 11, 12, 17 - 四取代 C - 21 甾体衍生物及其药用盐及配糖体和至少一种药学上可接受的载体。

3. 权利要求 1 所述的 C - 3, 11, 12, 17 - 四取代 C - 21 甾体衍生物及其药用盐及配糖体在制备治疗癫痫病的药物中的应用。

C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体类衍生物及其药物组合物 和其在医药中的应用

技术领域：

[0001] 本发明属于医药领域，具体涉及一种天然化合物为活性成分的抗癫痫药物，更具体地，涉及天然生理活性物质 C-3, 11, 12, 17- 四取代 C-21 甾体衍生物及其药物组合物和其在制备治疗癫痫病的药物中的应用。

背景技术：

[0002] 癫痫 (epilepsy) 俗称“羊癫疯、羊角风”，是大脑神经元突发性异常放电，导致短暂的大脑功能障碍的一种慢性疾病。该疾病由于异常放电的神经元在大脑中的部位不同，而有多种多样的症状。这些症状包括相对常见的、显著的运动症状和在强直阵挛性发作中可见的意识丧失，还有在多种运动功能中观察到的阵发改变，例如感觉、嗅觉、视觉的改变以及更高功能，例如情绪、记忆、语言和洞察力的改变。其中，痉挛是典型的癫痫症状之一，常伴随僵直性、间接性的不随意运动，也有不伴随痉挛的发作类型。另外，可能出现突然丧失意识、记忆，突然昏倒，四肢抽搐，口吐白沫，大声喊叫等症状，癫痫发作大多数属于暂时性，一般数分至数十分钟即恢复如常人。但是癫痫具有病程长，反复发作的特点，由此引发的后遗症甚至能造成智能障碍。一旦患上癫痫，就很难根治。较轻微的能用药物控制发作，抗癫痫药物治疗将是终身的。当药物不能控制癫痫发作时，必须作手术治疗，但费用、风险极高，而且仍需终身服药。

[0003] 据 WHO 统计，目前全球癫痫患者 5000 万人，其中 80% 在发展中国家，每年新增 200 万癫痫患者。我国癫痫疾病的发病率约为 7%，其中 40% 未曾接受过任何治疗，40% 的患者接受的是非正规治疗，且每年新增患者将近 40 万人。

[0004] 1980 年 WHO 推荐的抗癫痫药物主要有：苯巴比妥 (Phenobarbital, Luminal)、卡马西平 (Carbamazepine)、苯妥英钠 (Dilantin, Phenytoin, 癫能停)、丙戊酸钠 (Depakene)、乙琥胺 (Ethosuximide, Zarontin)、去氧苯妥英钠 (Primidonum, Mysoline, Hexamidinu, 扑痫酮)。目前，在国内市场，传统的老品种苯巴比妥、卡马西平、丙戊酸钠、苯妥英钠仍然占据了绝对的市场份额。此外，亦有一些抗癫痫的中成药产品，例如青阳参片、癫痫清片、痫宁片、愈痫灵在国内市场销售。但是，这些传统西药副作用大，长期服用会对身体造成较大的影响。例如，治疗癫痫的第一线用药卡马西平，该药会产生严重过敏副作用 - 史蒂芬强生综合症 (Steven-Johnson syndrome)，死亡率达 1 至 4 成。而中成药产品存在疗效不显著、靶点不清楚等特点，没有市场竞争力。

[0005] 近年来，国际市场中，已出现多个新型抗癫痫药物，例如：奥卡西平 (Trileptal)、左乙拉西坦 (Levetiracetam)、托吡酯 (Topiramate)、拉莫三嗪 (Lamotrigine) 等。其中，左乙拉西坦在 2008 年，销售额就超过 18.64 亿美元，成为抗癫痫药物中的重磅炸弹。该药物的作用机制为与突触前神经末梢内突触小泡蛋白 SV2A 结合，抑制癫痫环路中的异常放电，从而阻断癫痫发作。具有抗发作谱广、疗效好、治疗指数增加、可与其他 AEDs 合用等特点。在中国上市后，于 2009 年已占据中国抗癫痫药物 10.65% 的市场份额。

[0006] 因此,与国外抗癫痫药物研究发活活跃,市场增长迅猛相比,国内没有创新性的癫痫药物投产上市。目前国内的癫痫药物市场被进口药物所占据,价格偏高,一般病人难以承受,长期服用带来的经济问题,也难以解决我国癫痫病就医率低的问题。同时,现有的药物副作用都较大,长期服用造成较大影响。

[0007] 迄今为止,现有技术中未见有 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体类衍生物及其药理活性的报道,也未见其具有抗癫痫活性的报道。

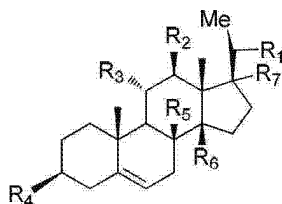
发明内容:

[0008] 本发明的目的旨在提供 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体衍生物,以其为活性成分的药物组合物,它们在制备治疗癫痫病的药物中的应用。

[0009] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0010] 通式 (I) 所示的 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体类衍生物及其药学上可接受的盐及配糖体,

[0011]



(I),

[0012] 其中, R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立的为酮基、羟基及取代酰酯基、氨基及取代酰氨基; R_4 为酮基、羟基及取代酰酯基、氨基及取代酰氨基、糖基; R_5 、 R_6 、 R_7 各自独立的为氢、羟基及其取代酰酯基、氨基及取代酰氨基。

[0013] 针对上述的通式 (I) 化合物,本发明优选的技术方案是 R_1 、 R_2 分别为异戊酰酯基, R_3 为乙酰酯基, R_4 、 R_6 为羟基, R_5 、 R_7 分别为氢。

[0014] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为酮基、 R_2 对羟基苯甲酰酯基、 R_3 为氢, R_4 为 3-O- β -D- 葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖基, R_5 、 R_6 、 R_7 分别为羟基。

[0015] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 、 R_2 、 R_3 分别为羟基, R_4 为 0-6- 去氧-3-0- 甲基- β -D- 阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基, R_5 、 R_7 分别为氢、 R_6 为羟基。

[0016] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为酮基, R_2 、 R_3 分别为乙酰酯基, R_4 为 0-6- 去氧-3-0- 甲基- β -D- 阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基, R_5 、 R_7 分别为氢, R_6 为羟基。

[0017] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为酮基、 R_2 对羟基苯甲酰酯基、 R_3 为氢, R_4 为 3-O- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖基, R_5 、 R_6 、 R_7 分别为羟基。

[0018] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为顺式异戊烯酯基, R_2 为异戊酰酯基, R_3 为乙酰酯基, R_4 为 0-6- 去氧-3-0- 甲基- β -D- 阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖

基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0019] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₂、R₃分别为羟基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0020] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₂、R₃分别为羟基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0021] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁为反式异戊烯酯基, R₂为异戊酰酯基, R₃为乙酰酯基, R₄为 0-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0022] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₃分别为羟基, R₂为反式异戊烯酯基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0023] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₃分别为羟基, R₂为顺式异戊烯酯基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0024] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₂分别为异戊酰氨基, R₃为乙酰氨基, R₄、R₆为羟基, R₅、R₇分别为氢。

[0025] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁为酮基, R₂为对羟基苯甲酰氨基, R₃为氢, R₄为 0-β-D-夹竹桃吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆、R₇分别为羟基。

[0026] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₂、R₃分别为氨基, R₄为 0-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₇分别为氢, R₆为羟基。

[0027] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁为顺式异戊烯酰氨基, R₂为异戊酰氨基, R₃为乙酰氨基, R₄为 0-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0028] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁为反式异戊烯酰氨基, R₂为异戊酰氨基, R₃为乙酰氨基, R₄为 0-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0029] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₃分别为羟基, R₂为反式异戊烯酰氨基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟基, R₇为氢。

[0030] 本发明进一步优选的技术方案是 R₁、R₃分别为氨基, R₂为顺式异戊烯酰氨基, R₄为 0-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-6-去氧-3-0-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基, R₅、R₆分别为羟

基, R_7 为氢。

[0031] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 、 R_2 、 R_3 分别为氨基, R_4 为 0- β -D- 葡萄吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)-6- 去氧-3-0- 甲基- β -D- 阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基, R_5 、 R_6 分别为羟基, R_7 为氢。

[0032] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为酮基, R_2 为对羟基苯甲酰氨基, R_3 为氢, R_4 为 0- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖基, R_5 、 R_6 、 R_7 分别为羟基。

[0033] 本发明进一步优选的技术方案是 R_1 为酮基, R_2 、 R_3 分别为乙酰氨基, R_4 为 0-6- 去氧-3-0- 甲基- β -D- 阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基, R_5 、 R_7 分别为氢, R_6 为羟基。

[0034] 上述任一项所述的药用盐,是指药学上可接受的盐,包括与有机酸或无机酸形成的盐,所述的有机酸包括但不限于酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸、丁酸、草酸、马来酸、琥珀酸、己二酸、藻酸、柠檬酸、天冬氨酸、苯苯磺酸、樟脑酸、樟脑磺酸、二葡萄糖酸、环戊烷丙酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、葡庚糖酸、甘油磷酸、半硫酸、庚酸、己酸、延胡索酸、2- 羟基乙磺酸、乳酸、马来酸、甲磺酸、烟酸、2- 萘磺酸、扑酸、果胶酯酸、3- 苯基丙酸、苦味酸、新戊酸、丙酸、琥珀酸、酒石酸、硫代氰酸、对- 甲苯磺酸盐和十一烷酸盐,所述的无机酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸或磷酸。

[0035] 本发明同时提供抗癫痫病的药物组合物,其包含根据上述任一项所述的 C-3, 11, 12, 17- 四取代 C-21 甾体衍生物或其药物盐或配糖体和至少一种药学上可接受的载体。

[0036] 本发明另外还提供了上述任一项所述的 C-3, 11, 12, 17- 四取代 C-21 甾体衍生物在制备治疗癫痫病的药物中的应用。

[0037] 本发明的上述技术方案是基于下述的发现和原理提出的。

[0038] C-21 甾体是一类以孕甾烷为母核的化合物,其 C-11, C-12, C-20 位羟基经常形成酯键, C-3 位羟基与主要由 α - 去氧糖组成的糖链形成配糖体。这类化合物具有神经系统的生理活性,如抗惊厥,抗癫痫,抗忧郁等。它们的化学结构和生理功能与上个世纪九十年代兴起的神经甾体非常相似,由此推测, C-21 甾体为一种植物来源的类神经甾体。本发明基于前期文献的基础上,从萝藦科植物中发现一系列新的 11-0- 乙酰基-12, 20-0- 二异戊酰- 苦绳苷类及青阳参苷类衍生物,并通过水解得到新的 11-0- 乙酰基-12, 20-0- 二异戊酰- 苦绳苷元具有较强的抗癫痫活性,而此前的文献中没有报道过该 C-21 甾体化合物及其抗癫痫作用,本发明首次分离鉴定了该类化合物,并通过斑马鱼抗癫痫模型确认 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体衍生物对治疗癫痫有效。11-0- 乙酰基-12, 20-0- 二异戊酰- 苦绳苷元(11-0-acetyl-12, 20-di-0-isovaleryldrevogenin)是 C-21 甾体衍生物,属于一种创新的 C-21 甾体类化合物。斑马鱼抗癫痫模型证明,它具有较强的抗癫痫活性(IC_{50} 为 17.2 μ M),远远强于阳性对照药左乙拉西坦(IC_{50} 为 170.6 μ M)和青阳参片。且与左乙拉西坦相比,左乙拉西坦抗癫痫治疗效率先快速增加,之后增加趋势逐渐减缓,而该化合物具有抗癫痫治疗效率随着浓度的增加而基本呈线性增加的药理特点。

[0039] 通过斑马鱼抗癫痫模型研究发现,本发明的 C-3, 11, 12, 20- 四取代 C-21 甾体衍生物及其药学上可接受的盐及配糖体有治疗癫痫症的活性,显著降低发作程度和发作率,在

1 μM 至 100 μM 的浓度范围内,抗癫痫治疗效率随着浓度的增加而增加,呈现浓度依赖性。本发明的化合物 11-0-乙酰基-12,20-0-二异戊酰-苦绳昔元, IC_{50} 为 17.2, 显著优于阳性对照左乙拉西坦 (IC_{50} 为 170.6 μM) 及青阳参片 (52.8 $\mu\text{g/ml}$)。

[0040] 本发明的 C-3, 11, 12, 20-四取代 C-21 甾体衍生物及其药物组合物可以是任何合适形式,例如固体,半固体,液体或气溶胶形式。一般情况下,药物含有本发明的化合物或提取物作为活性成分,与适合外部,肠道,或肠胃外给药的有机或无机载体或赋形剂混合。活性成分可以是复方的,例如,与常规无毒药理学可接受载体和 / 或赋形剂制成片剂、小药丸、胶囊、栓剂、阴道栓、溶液、乳液、混悬液和适合使用的其他形式。在组合物中使用的药理学可接受载体包括,例如,水、葡萄糖、乳糖、阿拉伯胶、明胶、甘露糖醇、淀粉、三硅酸镁、滑石、玉米淀粉、角蛋白、胶态二氧化硅、马铃薯淀粉,和适合在制备固体、半固体、液体或气溶胶形式的制剂中使用的其他载体。组合物可以另外含有稳定剂,增稠剂,和 / 或着色剂和香料。

[0041] 本发明的 C-3, 11, 12, 20-四取代 C-21 甾体衍生物及其药理学上可接受的盐及配糖体可经口或不经过口给药,给药量因药物不同而各有不同,对成人来说,每天 1-100mg 较合适。

[0042] 经口服给药时,首先使化合物与常规的药用辅剂如赋形剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等混合,将其制成颗粒剂、胶囊、片剂等形式给药;非经口给药时可以注射液、输液剂或栓剂等形式给药。制备上述制剂时,可使用常规的制剂技术。

附图说明:

[0043] 图 1-1 为化合物 DV12a 各浓度组处理后的斑马鱼运动轨迹;

[0044] 图 1-2 为化合物 11-0-乙酰基-12,20-0-二异戊酰-苦绳昔元各浓度组处理后的斑马鱼快速运动距离,11-0-乙酰基-12,20-0-二异戊酰-苦绳昔元各浓度组和苯妥英钠与癫痫模型组相比, $p < 0.001$;

[0045] 图 1-3 为化合物 11-0-乙酰基-12,20-0-二异戊酰-苦绳昔元抗癫痫作用的剂量-效应曲线;

[0046] 图 2-1 为青阳参昔 H 各浓度组处理后的斑马鱼运动轨迹;

[0047] 图 2-2 为青阳参昔 H 各浓度组处理后的斑马鱼快速运动距离,青阳参昔 H 各浓度组和苯妥英钠与癫痫模型组相比, $p < 0.001$;

[0048] 图 2-3 为青阳参昔 H 抗癫痫作用的剂量-效应曲线。

具体实施方式:

[0049] 下面结合附图,以本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,这些实例仅是对本发明优选方案的说明,而并不以任何方式限制本发明的范围。

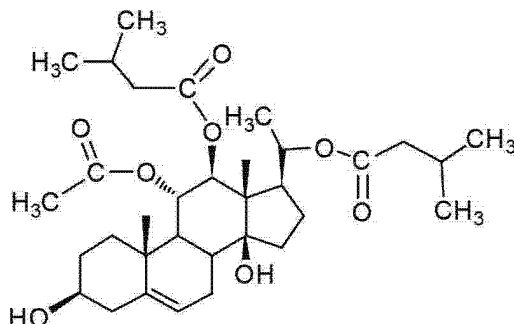
[0050] 实施例 1:

[0051] 11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元体内抗癫痫作用的评价:

[0052] 11-0-乙酰基-12,20-0-二异戊酰-苦绳昔元的制备:干燥的南山藤茎 (5.5kg) 粉碎,用甲醇回流提取三次,每次四小时,冷却后过滤,合并提取液,浓缩至约 1.5L,用石油醚萃取除去脂溶性成分后,回收甲醇至浸膏状,将浓缩物混悬于水中,用氯仿萃取四次,得

到氯仿萃取物 168g。取 150g 溶解, 300g 硅胶 (80-100 目) 拌样, 用硅胶柱层析 (200-300 目, 3270g) 分离, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (86:17:1) 洗脱, 主要分为不同极性的三个部分 Frs. A-C。Fr. C (21g) 为小极性部分, 分离难度相对较小, 主要运用硅胶柱层析分离 (氯仿 / 甲醇或石油醚 / 丙酮为洗脱剂), Rp-8 反相硅胶和 MCI-gel CHP-20P 柱层析纯化 (甲醇 / 水为洗脱剂), 得到新化合物南山藤苷 I (97mg)。将南山藤苷 I 溶于 MeOH (20mL), 加入 5% HCl (10mL), 50°C 水浴反应 15min 后, 加入 H_2O (20mL), 减压回收 MeOH 至 30mL, 再于 60°C 水浴反应 15min 后, 冷却, 用等量氯仿萃取三次, 得到甙元部分。甙元部分经硅胶柱层析分离纯化, 以石油醚 / 丙酮混合液洗脱, 得到 11-O-乙酰基-12, 20-O-二异戊酰-苦绳昔元。

[0053]



[0054] 11-O-乙酰酯基-12, 20-O-二异戊酰酯基-苦绳昔元

[0055] 11-O-acetyl-12, 20-di-O-isovaleryldrevogenin

[0056] 化合物 11-O-acetyl-12, 20-di-O-isovaleryldrevogenin 的理化数据如下: 白色无定型粉末, $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_8$; mp $97\text{-}99^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +39.3^\circ$ ($c=0.27$, MeOH), IR (KBr) ν_{max} 3441, 2961, 2934, 2873, 1742, 1631, 1467, 1415, 1370, 1294, 1254, 1236, 1196, 1168, 1120, 1094, 1061, 1029, 1000, 963, 940, 901, 811, 771cm^{-1} . ESI-MS (正离子) m/z 599 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HRESI-MS (正离子) m/z 599.3568 $[\text{M}(\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_8)+\text{Na}]^+$ (calcd. 599.3559). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400MHz): δ 1.46 (1H, m, H-1a), 2.08 (1H, m, H-1b), 1.82 (1H, m, H-2a), 2.10 (1H, m, H-2b), 3.85 (1H, m, H-3), 2.41 (1H, m, H-4a), 2.61 (1H, m, H-4b), 5.51 (1H, d, $J=4.9\text{Hz}$, H-6), 2.01 (1H, m, H-7a), 2.61 (1H, m, H-7b), 2.22 (1H, m, H-8), 1.86 (1H, m, H-9), 5.77 (1H, t, $J=9.8\text{Hz}$, H-11), 5.28 (1H, d, $J=9.8\text{Hz}$, H-12), 1.89 (1H, m, H-15a), 1.98 (1H, m, H-15b), 1.81 (1H, m, H-16a), 1.99 (1H, m, H-16b), 2.77 (1H, m, H-17), 1.46 (3H, s, Me-18), 1.31 (3H, s, Me-19), 5.47 (1H, m, H-20), 1.20 (3H, d, $J=5.9\text{Hz}$, Me-21), 2.12 (3H, s, Me-2'), 2.38 (1H, m, H-2'' a), 2.51 (1H, m, H-2'' b), 2.35 (1H, m, H-3''), 1.04 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$, Me-4''), 1.04 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$, Me-5''), 2.27 (2H, m, H-2'''), 2.20 (1H, m, H-3'''), 0.95 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$, Me-4'''), 0.95 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$, Me-5'''). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100MHz): δ 39.0 (t, C-1), 32.8 (t, C-2), 70.9 (d, C-3), 43.9 (t, C-4), 140.8 (s, C-5), 121.9 (d, C-6), 28.2 (t, C-7), 38.0 (d, C-8), 48.2 (d, C-9), 39.6 (s, C-10), 72.2 (d, C-11), 78.8 (d, C-12), 53.0 (s, C-13), 84.2 (s, C-14), 33.0 (t, C-15), 25.0 (t, C-16), 50.2 (d, C-17), 11.3 (q, C-18), 19.5 (q, C-19), 73.2 (d, C-20), 19.5 (q, C-21), 170.2 (s, C-1'), 21.8 (q, C-2'), 1-73.2 (s, C-1''), 43.9 (t, C-2''), 25.7 (d, C-3''), 22.7 (q, C-4''), 22.8 (q, C-5''), 172.3 (s, C-1'''), 44.1 (t, C-2'''), 25.9 (d, C-3'''), 22.5 (q, C-4'''), 22.5 (q, C-5''').

[0057] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时 (即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理

(移除已死亡胚胎),并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质:每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐,电导率为 480~510 $\mu\text{S}/\text{cm}$;pH 为 6.9~7.2;硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质,所以在受精后 9 天内(9dpf)不需要喂食。实验完成后,用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0058] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组;苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组;1.1%的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组(溶剂对照组);未处理的斑马鱼为空白对照组。将 11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元以及阳性对照(左乙拉西坦和青阳参片)分别溶于 DMSO 中,配制成浓度为 1、3、10、30、60 和 100 μM 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一段时间后,利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹,然后对斑马鱼的快速运动(seizure, $V>20\text{mm}/\text{sec}$) 距离进行定量分析,通过计算得到以下指标:①斑马鱼快速运动距离(distance of rapid movement-seizure);②化合物的抗癫痫治疗效率(therapeutic efficacy);③化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线(compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。对斑马鱼的运动速度与距离(D)进行定量分析,计算化合物的抗癫痫治疗效率,并根据化合物癫痫治疗效率绘制剂量-效应曲线,计算化合物抗癫痫作用的 IC₅₀;用方差分析和 T-检验进行统计学分析, $p<0.05$ 为显著性差异。实验过程中各组斑马鱼均未出现死亡现象。图 1-1 为 60min 内各实验组斑马鱼运动轨迹,由图 1-1 可知,11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元各浓度组与癫痫模型组相比,斑马鱼快速运动轨迹明显减少。图 1-2 为根据斑马鱼快速运动距离平均值 $\text{mean}\pm\text{SE}$ 绘制的柱形图,由图 1-2 可知,各浓度组与溶剂对照组相比均具有统计学意义($p<0.001$);图 1-3 为 11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元抗癫痫作用的剂量-效应曲线,由图 1-3 可知,11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元在 1 μM 至 100 μM 的浓度范围内,抗癫痫治疗效率随着浓度的增加而增加,呈现浓度依赖性,IC₅₀为 17.2 μM 。

[0059] 表 1. 11-0-乙酰酯基-12,20-0-二异戊酰酯基-苦绳昔元各浓度组斑马鱼快速运动距离原始数据

No.	空白对照组	溶剂对照组	癫痫模型组	苯妥英钠	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	60 μ M	100 μ M
1	1713	1496	6963	4162	4451	4307	3997	3074	1099	94
2	1668	1248	7006	4024	4556	4509	4303	3931	1075	119
3	1306	1398	7312	4435	4734	4537	4456	3235	1160	127
4	1511	1346	7503	4792	4841	4490	3540	3057	1088	131
5	1436	1682	7505	4842	4153	5110	4122	3303	1226	141
6	1202	1510	7523	5059	4268	4596	4793	3129	1516	103
7	1417	1212	7804	4086	4378	4400	3916	3080	1202	114
8	1209	1415	7811	5021	5388	3748	3939	2326	1126	168
mean	1433	1413	7428	4553	4596	4462	4133	3142	1186	125
SD	193	152	320	428	393	375	383	437	144	23
CV	13%	11%	4%	9%	9%	8%	9%	14%	12%	18%
P			1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
#	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
SQRT	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83
SE	68	54	113	151	139	133	135	155	51	8

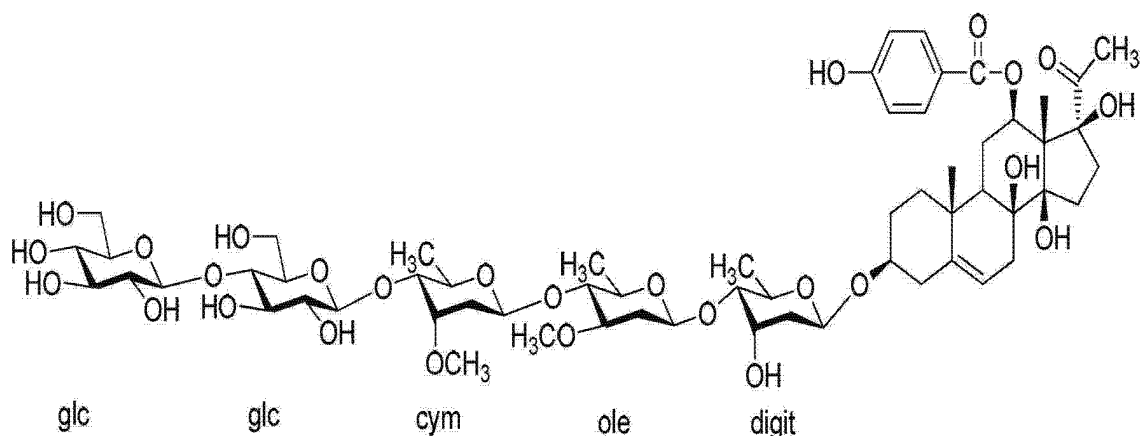
[0061] 实施例 2 :

[0062] 青阳参苷 H[青阳参苷元 -3-O- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖苷, Otophyllaside H] 体内抗癫痫作用的评价。

[0063] 青阳参苷 H[青阳参苷元 -3-O- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖苷, Otophyllaside H] 的制备 :

[0064] 干燥的青阳参根 (10.0kg) 粉碎, 用 90% 乙醇室温浸泡提取三次 (72, 72, 48 小时), 每次用量 15L, 过滤, 合并提取液, 回收溶剂至无醇味, 得到流浸膏 368g。将浸膏混悬于 2L 水中, 用氯仿萃取三次, 每次用量 1.5L, 合并萃取液, 浓缩至干, 得到氯仿萃取物 155g。取 150g 经硅胶柱层析分离, 氯仿 / 甲醇 (10:1.5, 7.6L) 洗脱, 得到五个部分 Frs. 1-5。Fr. 3 经硅胶柱层析, 以氯仿 / 甲醇和乙酸乙酯 / 乙醇 / 水为洗脱剂, 以及 Rp-8 柱层析 (以甲醇 / 水为洗脱剂) 反复分离纯化, 得到青阳参苷 H[青阳参苷元 -3-O- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 葡萄糖吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 加拿大麻吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 夹竹桃吡喃糖基 -(1 \rightarrow 4)- β -D- 毛地黄毒吡喃糖苷, Otophyllaside H]。

[0065]



[0066] 青阳参苷 H, Otophyllaside H

[0067] 青阳参苷 H 的理化数据如下:白色无定型粉末, $C_{60}H_{90}O_{27}$; mp 213-216 ° C, $[\alpha]_D^{25} +7.96^\circ$ (c=0.83, MeOH), IR(KBr) ν_{max} 3442, 2934, 1709, 1610, 1591, 1504, 1452, 1384, 1309, 1276, 1163, 1072, 911, 854, 773 cm^{-1} . FAB-MS(负离子) m/z 1242[M]⁻, 1105[M-137]⁻, 943[M-137-162]⁻, HRFAB-MS(负离子) m/z 1241.5628[M(C₆₀H₉₀O₂₇)-H]⁻(calcd. 1241.5591)。¹H-NMR(C₅D₅N, 500MHz): δ 3.54(1H, m, H-3), 5.38(1H, d, J=4.7Hz, H-6), 4.72(1H, dd, J=11.6Hz, J=4.1Hz, H-12), 1.63(3H, s, Me-18), 1.14(3H, s, Me-19), 2.08(3H, s, Me-21), 7.73(1H, d, J=8.8Hz, H-3'), 6.71(1H, d, J=8.8Hz, H-4'), 6.71(1H, d, J=8.8Hz, H-6'), 7.73(1H, d, J=8.8Hz, H-7'), 4.94(1H, dd, J=9.7Hz, J=1.7Hz, H-1''), 1.67(1H, m, H-2'' a), 1.93(1H, m, H-2'' b), 4.21(1H, m, H-3''), 3.27(1H, m, H-4''), 3.80(1H, m, H-5''), 1.21(3H, d, J=5.8Hz, H-6''), 4.60(dd, J=9.6Hz, J=1.6Hz, H-1''''), 1.41(1H, m, H-2a'''), 2.34(1H, m, H-2b'''), 3.41(1H, m, H-3'''), 3.18(1H, m, H-4'''), 3.40(1H, m, H-5'''), 1.38(3H, d, J=6.2Hz, H-6'''), 3.48(3H, s, Me-3'''), 4.82(1H, br d, J=9.7Hz, H-1''''), 1.73(1H, m, H-2a'''), 2.45(1H, m, H-2b'''), 3.55(1H, m, H-3''''), 3.51(1H, m, H-4''''), 3.52(1H, m, H-5''''), 1.43(3H, d, J=6.4Hz, H-6''''), 3.51(3H, s, Me-3''''), 4.48(1H, d, J=7.9Hz, H-1'''''), 3.23(1H, m, H-2'''''), 3.29(1H, m, H-3'''''), 3.52(1H, m, H-4'''''), 3.51(1H, m, H-5'''''), 3.82(1H, m, H-6a'''''), 3.92(1H, dd, J=12.0Hz, J=2.2Hz, H-6b'''''), 4.38(1H, d, J=7.8Hz, H-1'''''), 3.21(1H, m, H-2'''''), 3.34(1H, m, H-3'''''), 3.28(1H, m, H-4'''''), 3.32(1H, m, H-5'''''), 3.64(1H, dd, J=12.0Hz, J=5.8Hz, H-6a'''''), 3.87(1H, dd, J=12.0Hz, J=2.2Hz, H-6b''''')。 ¹³C-NMR(C₅D₅N, 100MHz): δ 39.8(t, C-1), 30.1(t, C-2), 79.3(d, C-3), 39.8(t, C-4), 140.3(s, C-5), 119.4(d, C-6), 35.2(t, C-7), 75.0(s, C-8), 45.1(d, C-9), 38.1(s, C-10), 25.5(t, C-11), 73.7(d, C-12), 59.1(s, C-13), 90.0(s, C-14), 34.3(t, C-15), 33.4(t, C-16), 93.1(s, C-17), 10.6(q, C-18), 18.6(q, C-19), 211.9(s, C-20), 27.7(q, Me-21), 167.3(s, C-1'), 119.6(s, C-2'), 132.8(d, C-3'), 117.6(d, C-4'), 168.3(s, C-5'), 117.6(d, C-6'), 132.8(d, C-7'), 97.0(d, C-1''), 38.8(t, C-2''), 68.3(d, C-3''), 3.7(d, C-4''), 69.5(d, C-5''), 18.5(q, C-6''), 102.6(d, C-1'''), 37.7(t, C-2'''), 80.1(d, C-3'''), 83.6(d, C-4'''), 72.6(d, C-5'''), 18.8(q, C-6'''), 57.9(q, Me-3'''), 100.6(d, C-1''''), 36.3(t, C-2''''), 78.4(d, C-3''''), 83.6(d, C-4''''), 70.0(d, C-5''''), 18.6(q, C-6''''), 58.6(q, Me-3''''), 104.0(d, C-1'''''), 75.3(d, C-2'''''), 76.7(d, C-3'''''), 81.0(d, C-4'''''), 76.4(d, C-5'''''), 62.1(t, C-6'''''), 104.6(d, C-1'''''), 74.9(d, C-2'''''), 78.1(d, C-3'''''), 71.4(d, C-4'''''), 77.8(d, C-5'''''), 62.4(t, C-6''''')。

[0068] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时(即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理(移除已死亡胚胎), 并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28°C 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质: 每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 μ S/cm; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质, 所以在受精后 9 天内(9dpf) 不需要喂食。实验完成后, 用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理, 从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA) 对动物麻醉处死的规范要求。

[0069] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组；苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组；1.1%的DMSO处理的斑马鱼为阴性对照组（溶剂对照组）；未处理的斑马鱼为空白对照组。青阳参苷H以及阳性对照（左乙拉西坦和青阳参片）分别溶于DMSO中，配制成浓度为1、3、10、30、60、100、150和300 μM 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间，利用行为分析仪记录60min内斑马鱼的运动轨迹，然后对斑马鱼的快速运动（seizure, $V > 20\text{mm/sec}$ ）距离进行定量分析，通过计算得到以下指标：①斑马鱼快速运动距离（distance of rapid movement-seizure）；②化合物的抗癫痫治疗效率（therapeutic efficacy）；③化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线（compound effect on the time-course of zebrafish seizure）。对斑马鱼的运动速度与距离（D）进行定量分析，计算化合物的抗癫痫治疗效率，并根据化合物癫痫治疗效率绘制剂量-效应曲线，计算化合物抗癫痫作用的 IC_{50} ；用方差分析和T-检验进行统计学分析， $p < 0.05$ 为显著性差异。实验过程中各组斑马鱼均未出现死亡现象。图2-1为60min内各实验组斑马鱼运动轨迹，由图2-1可知，化合物青阳参苷H各浓度组与癫痫模型组相比，斑马鱼快速运动轨迹明显减少。图2-2为根据斑马鱼快速运动距离平均值 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 绘制的柱形图，由图2-2可知，各浓度组与溶剂对照组相比均具有统计学意义（ $p < 0.001$ ）；图2-3为化合物青阳参苷H抗癫痫作用的剂量-效应曲线，由图2-3可知，化合物青阳参苷H在1 μM 至300 μM 的浓度范围内，抗癫痫治疗效率随着浓度的增加而增加，呈现浓度依赖性，浓度为30 μM 时抗癫痫治疗效率为 $45\% \pm 2.13\%$ 。

[0070] 表2. 青阳参苷H各浓度组斑马鱼快速运动距离原始数据

[0071]

No.	空白对照组	溶剂对照组	癫痫模型组	苯妥英钠	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	60 μM	100 μM	150 μM
1	1299	1360	7740	5129	6953	5751	5394	3855	3935	4279	4716
2	1409	1387	7100	4189	5918	5885	5421	3923	3888	3872	3628
3	1528	1666	7051	4411	6608	4818	4508	3788	3947	3829	4188
4	1472	1463	7104	4480	5437	4964	4530	3738	3960	3838	4168
5	1519	1287	7437	4515	5391	4933	4793	4284	4046	3993	4653
6	1596	1337	7005	4579	6193	6803	4743	3928	3121	3883	4196
7	1279	1535	7882	4794	6567	5285	5831	4628	4094	4189	3178
8	1411	1433	7988	4995	5336	5582	4569	4468	5093	4681	4384
mean	1439	1433	7413	4636	6050	5503	4974	4076	4011	4070	4139
SD	111	122	405	314	627	658	504	337	534	298	514
CV	8%	8%	5%	7%	10%	12%	10%	8%	13%	7%	12%
p			1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
#	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
SQRT	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83
SE	39	43	143	111	222	233	178	119	189	105	182

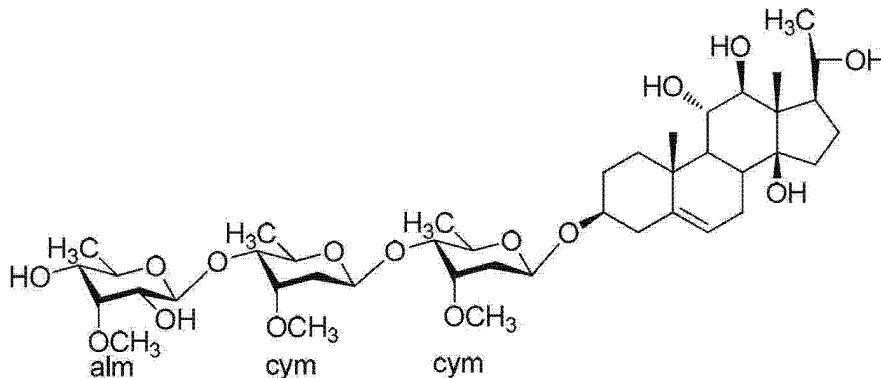
[0072] 实施例3：

[0073] 南山藤苷 Da_1 (Dregeoside Da_1) 体内抗癫痫作用的评价：

[0074] 南山藤苷 Da_1 (Dregeoside Da_1) 的制备：干燥的南山藤茎（5.5kg）粉碎，用甲醇回流提取三次，每次四小时，冷却后过滤，合并提取液，浓缩至约1.5L，用石油醚萃取除去脂溶性成分后，回收甲醇至浸膏状，将浓缩物混悬于水中，用氯仿萃取四次，得到氯仿萃取物168g。取150g溶解，300g硅胶（80-100目）拌样，用硅胶柱层析（200-300目，3270g）分离，

CHCl₃-MeOH-H₂O(86:17:1) 洗脱, 主要分为不同极性的三个部分 Frs. A-C。Fr. C(21g) 为小极性部分, 分离难度相对较小, 主要运用硅胶柱层析分离(氯仿/甲醇或石油醚/丙酮为洗脱剂), Rp-8 反相硅胶和 MCI-gel CHP-20P 柱层析纯化(甲醇/水为洗脱剂), 得到化合物南山藤苷 Da₁(46mg)。

[0075]



[0076] 南山藤苷 Da₁, Dregeoside Da₁

[0077] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时(即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理(移除已死亡胚胎), 并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质: 每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 μS/cm; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质, 所以在受精后 9 天内(9dpf) 不需要喂食。实验完成后, 用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理, 从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA) 对动物麻醉处死的规范要求。

[0078] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组; 苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组; 1.1% 的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组(溶剂对照组); 未处理的斑马鱼为空白对照组。南山藤苷 Da₁ 溶于 DMSO 中, 配制成浓度为 30 μM 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间, 利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹, 然后对斑马鱼的快速运动(seizure, V>20mm/sec) 距离进行定量分析, 通过计算得到以下指标: ① 斑马鱼快速运动距离(distance of rapid movement-seizure); ② 化合物的抗癫痫治疗效率(therapeutic efficacy); ③ 化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线(compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。南山藤苷 Da₁ 和苯妥英钠与癫痫模型组相比, 斑马鱼快速运动轨迹明显减少, 初步确定化合物南山藤苷 Da₁ 具有抗癫痫作用, 治疗效率为 40±3.13%。

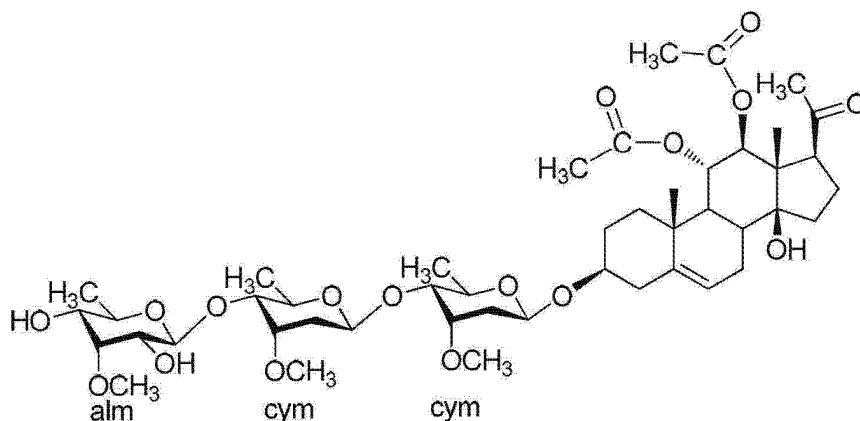
[0079] 实施例 4:

[0080] 南山藤苷 D[11, 12-di-O-acetyldrevogenin P-3-O-6-去氧-3-O-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖苷, Drevoluoside D] 体内抗癫痫作用的评价

[0081] 南山藤苷 D[11, 12-di-O-acetyldrevogenin P-3-O-6-去氧-3-O-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖苷, Drevoluoside D] 的制备:

[0082] 干燥的南山藤茎 (5.5kg) 粉碎, 用甲醇回流提取三次, 每次四小时, 冷却后过滤, 合并提取液, 浓缩至约 1.5L, 用石油醚萃取除去脂溶性成分后, 回收甲醇至浸膏状, 将浓缩物混悬于水中, 用氯仿萃取四次, 得到氯仿萃取物 168g。取 150g 溶解, 300g 硅胶 (80-100 目) 拌样, 用硅胶柱层析 (200-300 目, 3270g) 分离, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (86:17:1) 洗脱, 主要分为不同极性的三个部分 Frs. A-C。Fr. C (21g) 为小极性部分, 分离难度相对较小, 主要运用硅胶柱层析分离 (氯仿 / 甲醇或石油醚 / 丙酮为洗脱剂), Rp-8 反相硅胶和 MCI-gel CHP-20P 柱层析纯化 (甲醇 / 水为洗脱剂), 得到南山藤苷 D (8mg)。

[0083]



[0084] 南山藤苷 D, Drevoluoside D

[0085] 南山藤苷 D 的理化数据如下: 白色无定型粉末, $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{O}_{17}$; mp 116-120 ° C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +23.0^\circ$ (c=0.20, MeOH), IR (KBr) ν_{max} 3442, 2971, 2932, 2856, 1748, 1700, 1612, 1450, 1369, 1318, 1247, 1226, 1195, 1166, 1127, 1084, 1030, 1004, 964, 915, 866, 816, 785, 721 cm^{-1} 。FAB-MS (负离子) m/z 895 $[\text{M}-1]^-$, HRESI-MS (负离子) m/z 931.4434 $[\text{M}(\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{O}_{17})+\text{C}_1]^-$ (cal cd. 931.4458)。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500MHz): δ 1.33 (1H, m, H-1a), 1.98 (1H, m, H-1b), 1.74 (1H, m, H-2a), 2.10 (1H, m, H-2b), 3.77 (1H, m, H-3), 2.30 (1H, m, H-4a), 2.50 (1H, m, H-4b), 5.43 (1H, d, J=5.4Hz, H-6), 1.94 (1H, m, H-7a), 2.58 (1H, m, H-7b), 2.03 (1H, m, H-8), 3.08 (1H, m, H-9), 5.65 (1H, t, J=10.3Hz, H-11), 5.12 (1H, d, J=10.3Hz, H-12), 1.95 (1H, m, H-15a), 2.05 (1H, m, H-15b), 1.96 (1H, m, H-16a), 2.29 (1H, m, H-16b), 3.08 (1H, m, H-17), 1.30 (3H, s, Me-18), 1.19 (3H, s, Me-19), 2.20 (3H, s, Me-21), 2.02 (3H, s, Me-2'), 2.18 (3H, s, Me-2''), 5.23 (1H, br d, J=9.3Hz, cym-1), 1.85 (1H, m, cym-2a), 2.27 (1H, m, cym-2b), 4.03 (1H, m, cym-3), 3.44 (1H, dd, J=9.8Hz, J=2.4Hz, cym-4), 4.19 (1H, m, cym-5), 1.33 (3H, d, J=6.4Hz, cym-6), 3.57 (3H, s, Me-cym-3), 5.09 (1H, br d, J=9.3Hz, cym-1'), 1.82 (1H, m, cym-2a'), 2.33 (1H, m, cym-2b'), 4.08 (1H, m, cym-3'), 3.53 (1H, dd, J=9.8Hz, J=2.4Hz, cym-4'), 4.18 (1H, m, cym-5'), 1.49 (3H, d, J=6.4Hz, cym-6'), 3.58 (3H, s, Me-cym-3'), 5.12 (1H, d, J=7.8Hz, alm-1), 3.88 (1H, m, alm-2), 4.07 (1H, m, alm-3), 3.60 (1H, br d, J=9.8Hz, alm-4), 4.15 (1H, m, alm-5), 1.53 (3H, d, J=6.4Hz, cym-6'), 3.84 (3H, s, Me-alm-3')。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125MHz): δ 38.8 (t, C-1), 30.5 (t, C-2), 77.2 (d, C-3), 39.8 (t, C-4), 139.7 (s, C-5), 122.6 (d, C-6), 28.3 (t, C-7), 37.4 (d, C-8), 47.9 (d, C-9), 39.5 (s, C-10), 71.9 (d, C-11), 78.0 (d, C-12), 54.6 (s, C-13), 84.0 (s, C-14), 34.5 (t, C-15), 24.0 (t, C-16), 58.3 (d, C-17), 11.5 (q, C-18), 19.3 (q, C-19), 213.6 (s, C-20), 31.8 (q, Me-21), 170.2 (s, C-1'), 21.4 (q, C-2')-

, 171.1 (s, C-1''), 20.8 (q, C-2''), 96.5 (d, cym-1), 37.3 (t, cym-2), 78.0 (d, cym-3), 83.3 (d, cym-4), 69.1 (d, cym-5), 18.6 (q, cym-6), 58.8 (q, Me-cym-3), 100.4 (d, cym-1'), 36.9 (t, cym-2'), 78.2 (d, cym-3'), 83.3 (d, cym-4'), 69.4 (d, cym-5'), 18.6 (q, cym-6'), 58.8 (q, Me-cym-3'), 104.2 (d, alm-1), 73.1 (d, alm-2), 84.0 (d, alm-3), 74.5 (d, alm-4), 70.8 (d, alm-5), 18.6 (d, alm-6), 62.2 (q, Me-alm-3')。

[0086] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时 (即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理 (移除已死亡胚胎), 并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎 (养鱼用水水质: 每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 μ S/cm; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质, 所以在受精后 9 天内 (9dpf) 不需要喂食。实验完成后, 用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理, 从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会 (AVMA) 对动物麻醉处死的规范要求。

[0087] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组; 苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组; 1.1% 的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组 (溶剂对照组); 未处理的斑马鱼为空白对照组。南山藤苷 D 溶于 DMSO 中, 配制成浓度为 30 μ M 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间, 利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹, 然后对斑马鱼的快速运动 (seizure, $V > 20$ mm/sec) 距离进行定量分析, 通过计算得到以下指标: ① 斑马鱼快速运动距离 (distance of rapid movement-seizure); ② 化合物的抗癫痫治疗效率 (therapeutic efficacy); ③ 化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线 (compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。南山藤苷 D 和苯妥英钠与癫痫模型组相比, 斑马鱼快速运动轨迹明显减少, 初步确定化合物南山藤苷 D 具有抗癫痫作用, 治疗效率为 $38 \pm 4.43\%$ 。

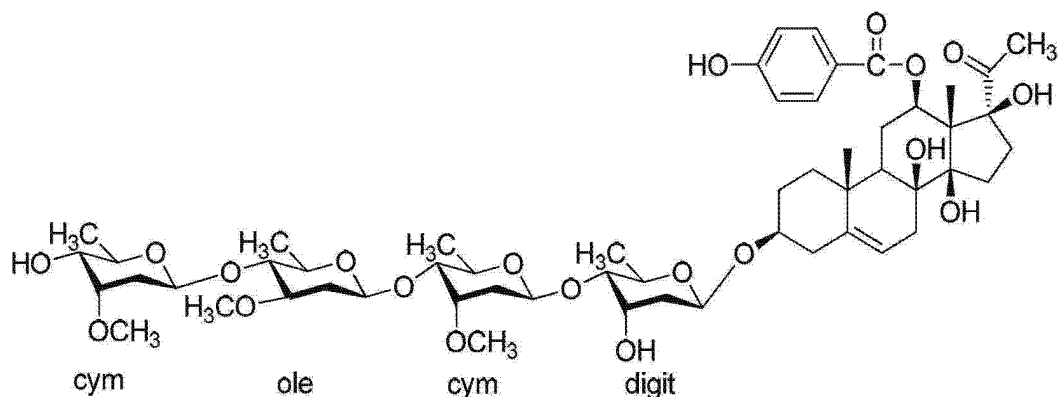
[0088] 实施例 5:

[0089] 青阳参苷 N [青阳参苷元 -3-O- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-毛地黄毒吡喃糖苷, Otophyllaside N] 体内抗癫痫作用的评价

[0090] 青阳参苷 N [青阳参苷元 -3-O- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-毛地黄毒吡喃糖苷, Otophyllaside N] 的制备:

[0091] 干燥的青阳参根 (10.0kg) 粉碎, 用 90% 乙醇室温浸泡提取三次 (72, 72, 48 小时), 每次用量 15L, 过滤, 合并提取液, 回收溶剂至无醇味, 得到流浸膏 368g。将浸膏混悬于 2L 水中, 用氯仿萃取三次, 每次用量 1.5L, 合并萃取液, 浓缩至干, 得到氯仿萃取物 155g。取 150g 经硅胶柱层析分离, 氯仿/甲醇 (10:1.5, 7.6L) 洗脱, 得到五个部分 Frs. 1-5。Fr. 1 经硅胶柱层析反复分离, 以氯仿/甲醇和石油醚/丙酮为洗脱剂, 得到青阳参苷 N (10mg)。

[0092]



[0093] 青阳参苷 N, Otophylloside N

[0094] 青阳参甙 N(Otophylloside N) 的理化数据: 白色无定型粉末, $C_{55}H_{82}O_{20}$; mp163-165 ° C, $[\alpha]_D^{18} +7.7^\circ$ (c=0.20, MeOH), IR(KBr) ν_{max} 3446, 2971, 2932, 1713, 1610, 1594, 1516, 1452, 1382, 1369, 1308, 1275, 1164, 1093, 1004, 912, 866, 852, 772 cm^{-1} . FAB-MS(负离子) m/z 1061 [M-1]⁻, HRESI-MS(负离子) m/z 1061.5284 [M(C₅₅H₈₂O₂₀)-H]⁻ (calcd. 1061.5321). ¹H-NMR(C₅D₅N, 500MHz): δ 3.87 (1H, m, H-3), 5.26 (1H, br s, H-6), 5.33 (1H, dd, J=11.5Hz, J=4.0Hz, H-12), 2.09 (3H, s, Me-18), 1.30 (3H, s, Me-19), 2.41 (3H, s, Me-21), 8.30 (1H, d, J=8.6Hz, H-3'), 7.23 (1H, d, J=8.6Hz, H-4'), 7.23 (1H, d, J=8.6Hz, H-6'), 8.30 (1H, d, J=8.6Hz, H-7'), 5.48 (1H, br d, J=9.2Hz, H-1''), 2.07 (1H, m, H-2'' a), 2.40 (1H, m, H-2'' b), 4.64 (1H, m, H-3''), 3.52 (1H, m, H-4''), 4.30 (1H, m, H-5''), 1.43 (3H, d, J=6.4Hz, H-6''), 5.17 (1H, br d, J=9.8Hz, H-1'''), 1.78 (1H, m, H-2a'''), 2.29 (1H, m, H-2b'''), 4.01 (1H, m, H-3'''), 3.41 (1H, m, H-4'''), 4.18 (1H, m, H-5'''), 1.32 (3H, d, J=6.1Hz, H-6'''), 3.56 (3H, s, Me-3'''), 4.68 (1H, br d, J=9.7Hz, H-1'''), 1.73 (1H, m, H-2a'''), 2.45 (1H, m, H-2b'''), 3.55 (1H, m, H-3'''), 3.51 (1H, m, H-4'''), 3.52 (1H, m, H-5'''), 1.43 (3H, d, J=6.4Hz, H-6'''), 3.51 (3H, s, Me-3'''), 5.25 (1H, br d, J=9.3Hz, H-1'''), 1.77 (1H, m, H-2a'''), 2.38 (1H, m, H-2b'''), 3.77 (1H, m, H-3'''), 3.54 (1H, m, H-4'''), 4.14 (1H, m, H-5'''), 1.54 (3H, d, J=6.3Hz, H-6'''), 3.46 (3H, s, Me-3'''). ¹³C-NMR(C₅D₅N, 100MHz): δ 39.3 (t, C-1), 29.9 (t, C-2), 77.6 (d, C-3), 38.9 (t, C-4), 139.4 (s, C-5), 119.2 (d, C-6), 34.8 (t, C-7), 74.3 (s, C-8), 44.5 (d, C-9), 37.4 (s, C-10), 25.2 (t, C-11), 73.4 (d, C-12), 58.4 (s, C-13), 89.6 (s, C-14), 33.9 (t, C-15), 33.2 (t, C-16), 92.5 (s, C-17), 10.9 (q, C-18), 18.2 (q, C-19), 209.9 (s, C-20), 27.9 (q, Me-21), 165.4 (s, C-1'), 122.0 (s, C-2'), 132.5 (d, C-3'), 116.2 (d, C-4'), 163.7 (s, C-5'), 116.2 (d, C-6'), 132.5 (d, C-7'), 96.4 (d, C-1''), 39.1 (t, C-2''), 67.6 (d, C-3''), 83.4 (d, C-4''), 68.6 (d, C-5''), 18.7 (q, C-6''), 99.8 (d, C-1'''), 36.7 (t, C-2'''), 77.7 (d, C-3'''), 83.2 (d, C-4'''), 69.1 (d, C-5'''), 18.5 (q, C-6'''), 58.9 (q, Me-3'''), 102.0 (d, C-1'''), 37.7 (t, C-2'''), 78.9 (d, C-3'''), 82.7 (d, C-4'''), 71.8 (d, C-5'''), 18.7 (q, C-6'''), 57.4 (q, Me-3'''), 98.6 (d, C-1'''), 35.9 (t, C-2'''), 79.0 (d, C-3'''), 74.2 (d, C-4'''), 71.3 (d, C-5'''), 19.1 (q, C-6'''), 58.1 (q, Me-3''').

[0095] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时 (即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理

(移除已死亡胚胎),并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质:每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐,电导率为 480~510 μ S/cm;pH 为 6.9~7.2;硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质,所以在受精后 9 天内(9dpf)不需要喂食。实验完成后,用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0096] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组;苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组;1.1%的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组(溶剂对照组);未处理的斑马鱼为空白对照组。青阳参苷 N 溶于 DMSO 中,配制成浓度为 30 μ M 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间,利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹,然后对斑马鱼的快速运动(seizure, $V > 20$ mm/sec)距离进行定量分析,通过计算得到以下指标:①斑马鱼快速运动距离(distance of rapid movement-seizure);②化合物的抗癫痫治疗效率(therapeutic efficacy);③化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线(compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。青阳参苷 N 和苯妥英钠与癫痫模型组相比,斑马鱼快速运动轨迹明显减少,初步确定化合物青阳参苷 N 具有抗癫痫作用,治疗效率为 32 \pm 4.50%。

[0097] 实施例 6:

[0098] 11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷体内抗癫痫作用的评价

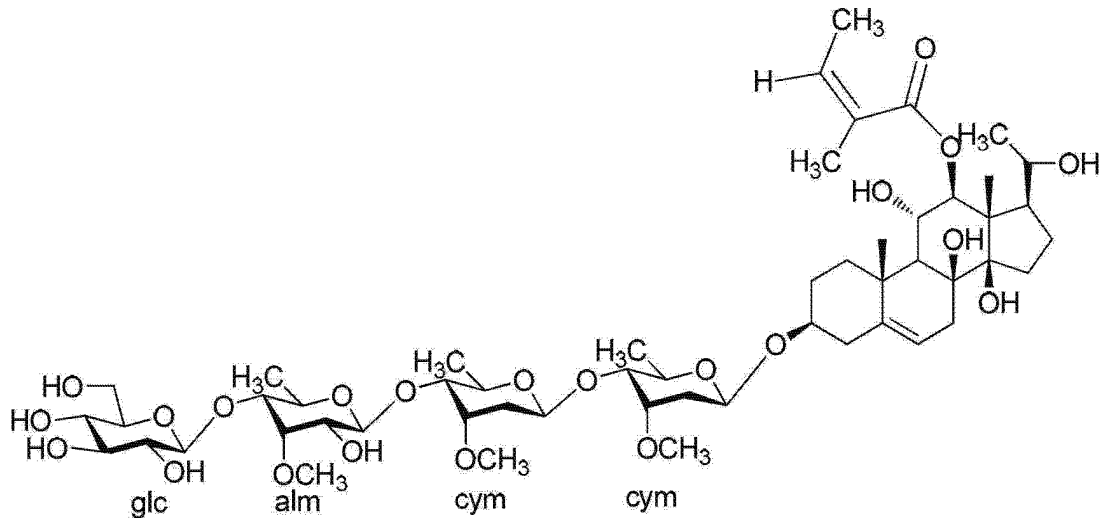
[0099] 11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷的制备:

[0100] 干燥的南山藤茎(5.5kg)粉碎,用甲醇回流提取三次,每次四小时,冷却后过滤,合并提取液,浓缩至约 1.5L,用石油醚萃取除去脂溶性成分后,回收甲醇至浸膏状,将浓缩物混悬于水中,用氯仿萃取四次,得到氯仿萃取物 168g。取 150g 溶解,300g 硅胶(80-100 目)拌样,用硅胶柱层析(200-300 目,3270g)分离,CHCl₃-MeOH-H₂O(86:17:1)洗脱,主要分为不同极性的三个部分 Frs. A-C。Fr. C(21g)为小极性部分,分离难度相对较小,主要运用硅胶柱层析分离(氯仿/甲醇或石油醚/丙酮为洗脱剂),Rp-8 反相硅胶和 MCI-gel CHP-20P 柱层析纯化(甲醇/水为洗脱剂),得到 11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷(3mg)。

[0101] 11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷的理化数据:白色无定型粉末, C₄₉H₇₆O₁₈;FAB-MS(负离子)m/z 951[M-1]⁻, 869[M-83]⁻。¹H-NMR(C₅D₅N, 500MHz): δ 2.50(1H, m, H-1a), 2.56(1H, m, H-1b), 1.92(1H, m, H-2a), 2.15(1H, m, H-2b), 3.87(1H, m, H-3), 1.34(1H, m, H-4a), 2.36(1H, m, H-4b), 5.33(1H, d, J=5.6Hz, H-6), 2.05(1H, m, H-7a), 2.22(1H, m, H-7b), 2.14(1H, m, H-9), 6.27(1H, t, J=10.7Hz, H-11), 5.42(1H, d, J=10.7Hz, H-12), 2.30(1H, m, H-15a), 2.59(1H, m, H-15b), 2.03(1H, m, H-16a), 2.29(1

H, m, H-16b), 3. 15 (1H, m, H-17), 1. 63 (3H, s, Me-18), 1. 59 (3H, s, Me-19), 2. 18 (3H, s, Me-21), 1. 59 (3H, s, Me-2'), 7. 19 (1H, H-3''), 1. 65 (3H, d, J=6. 8Hz, Me-4''), 1. 97 (3H, s, Me-5''), 5. 27 (1H, br d, J=9. 4Hz, cym-1), 1. 85 (1H, m, cym-2a), 2. 26 (1H, m, cym-2b), 4. 02 (1H, m, cym-3), 3. 44 (1H, dd, J=9. 4Hz, J=2. 6Hz, cym-4), 4. 19 (1H, m, cym-5), 1. 34 (3H, d, J=6. 0Hz, cym-6), 3. 57 (3H, s, Me-cym-3), 5. 09 (1H, br d, J=9. 4Hz, cym-1'), 1. 81 (1H, m, cym-2a'), 2. 33 (1H, m, cym-2b'), 4. 07 (1H, m, cym-3'), 3. 52 (1H, dd, J=9. 4Hz, J=2. 6Hz, cym-4'), 4. 17 (1H, m, cym-5'), 1. 48 (3H, d, J=6. 0Hz, cym-6'), 3. 57 (3H, s, Me-cym-3'), 5. 13 (1H, d, J=8. 1Hz, alm-1), 3. 87 (1H, m, alm-2), 4. 07 (1H, m, alm-3), 3. 59 (1H, m, alm-4), 4. 16 (1H, m, alm-5), 1. 53 (3H, d, J=6. 4Hz, cym-6'), 3. 85 (3H, s, Me-alm-3')。 ¹³C-NMR(C₅D₅N, 125MHz) : δ 39. 8(t, C-1), 30. 2(t, C-2), 77. 8(d, C-3), 40. 5(t, C-4), 139. 7(s, C-5), 118. 8(d, C-6), 36. 8(t, C-7), 76. 0(s, C-8), 49. 1(d, C-9), 39. 3(s, C-10), 71. 7(d, C-11), 78. 4(d, C-12), 55. 7(s, C-13), 85. 6(s, C-14), 35. 5(t, C-15), 24. 4(t, C-16), 59. 5(d, C-17), 13. 7(q, C-18), 18. 1(q, C-19), 21. 3. 3(s, C-20), 31. 4(q, Me-21), 169. 9(s, C-1'), 21. 5(q, C-2'), 168. 0(s, C-1''), 128. 6(t, C-2''), 139. 1(d, C-3''), 14. 4(q, C-4''), 12. 2(q, C-5''), 96. 5(d, cym-1), 37. 3(t, cym-2), 78. 0(d, cym-3), 83. 4(d, cym-4), 69. 1(d, cym-5), 18. 6(q, cym-6), 58. 8(q, Me-cym-3), 100. 4(d, cym-1'), 36. 9(t, cym-2'), 78. 2(d, cym-3'), 83. 3(d, cym-4'), 69. 4(d, cym-5'), 18. 6(q, cym-6'), 58. 8(q, Me-cym-3'), 104. 2(d, alm-1), 73. 2(d, alm-2), 84. 0(d, alm-3), 74. 5(d, alm-4), 70. 8(d, alm-5), 18. 6(d, alm-6), 62. 2(q, Me-alm-3')。

[0102]



[0103] 11-O-acetyl-12-O-angeloyl-17β-marsdenin-3-O-6-去氧-3-O-甲基-β-D-阿洛吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖基-(1→4)-β-D-加拿大麻吡喃糖苷

[0104] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时 (即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理 (移除已死亡胚胎), 并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎 (养鱼用水水质: 每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 μS/cm; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质, 所以在受精后 9 天内 (9dpf) 不需要喂食。实验完成后, 用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理, 从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美

国兽医协会 (AVMA) 对动物麻醉处死的规范要求。

[0105] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组；苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组；1.1% 的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组（溶剂对照组）；未处理的斑马鱼为空白对照组。11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷溶于 DMSO 中，配制成浓度为 30 μ M 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间，利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹，然后对斑马鱼的快速运动 (seizure, $V > 20\text{mm/sec}$) 距离进行定量分析，通过计算得到以下指标：①斑马鱼快速运动距离 (distance of rapid movement-seizure)；②化合物的抗癫痫治疗效率 (therapeutic efficacy)；③化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线 (compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷和苯妥英钠与癫痫模型组相比，斑马鱼快速运动轨迹明显减少，初步确定化合物 11-0-acetyl-12-0-angeloyl-17 β -marsdenin-3-0-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷具有抗癫痫作用，治疗效率为 $24 \pm 4.32\%$ 。

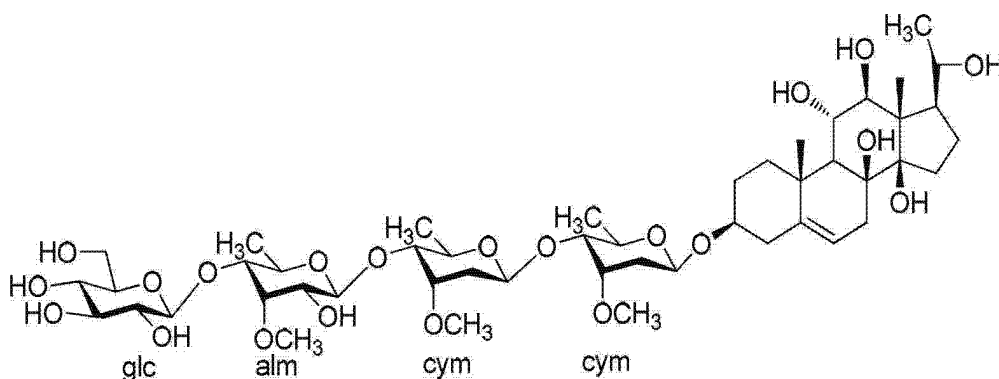
[0106] 实施例 7：

[0107] 南山藤苷 N[Marsectohexol-3-0- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷, Drevoluoside N] 体内抗癫痫作用的评价

[0108] 南山藤苷 N[Marsectohexol-3-0- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)-6-去氧-3-0-甲基- β -D-阿洛吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-加拿大麻吡喃糖苷, Drevoluoside N] 的制备：

[0109] 干燥的南山藤茎 (5.5kg) 粉碎，用甲醇回流提取三次，每次四小时，冷却后过滤，合并提取液，浓缩至约 1.5L，用石油醚萃取除去脂溶性成分后，回收甲醇至浸膏状，将浓缩物混悬于水中，用氯仿萃取四次，得到氯仿萃取物 168g。取 150g 溶解，300g 硅胶 (80-100 目) 拌样，用硅胶柱层析 (200-300 目, 3270g) 分离， CHCl_3 -MeOH- H_2O (86:17:1) 洗脱，主要分为不同极性的三个部分 Frs. A-C。Fr. A (27g) 为大极性部分，经 Rp-8 反相硅胶分离 (甲醇 / 水为洗脱剂) 后，再用硅胶 (氯仿 / 甲醇为洗脱剂) 和 MCI-gel CHP-20P (甲醇 / 水为洗脱剂) 柱层析纯化，得到化合物南山藤苷 N (6mg)。

[0110]



[0111] 南山藤苷 N, Drevoluoside N

[0112] 南山藤甙 N(Drevoluoside N) 的理化数据: 白色无定型粉末, $C_{48}H_{80}O_{21}$; mp 177-179 $^{\circ}$ C, $[\alpha]_D^{23} +17.8^{\circ}$ (c=0.22, MeOH), IR(KBr) ν_{max} 3442, 3433, 2970, 2933, 1637, 1452, 1402, 1378, 1371, 1319, 1262, 1235, 1196, 1162, 1080, 1004, 953, 909, 864, 816, 780, 720 cm^{-1} . FAB-MS(负离子) m/z 991 $[M-1]^{-}$, HRESI-MS(负离子) m/z 1027.4870 $[M(C_{48}H_{80}O_{21})+Cl]^{-}$ (calcd. 1027.4880). 1H -NMR(C_5D_5N , 500MHz): δ 2.59(2H, m, H-1), 2.02(1H, m, H-2a), 2.13(1H, m, H-2b), 3.92(1H, m, H-3), 1.38(1H, m, H-4a), 3.33(1H, m, H-4b), 5.35(1H, d, J=4.9Hz, H-6), 1.89(2H, m, H-7), 1.83(1H, m, H-9), 4.66(1H, t, J=10.3Hz, H-11), 3.67(1H, d, J=10.3Hz, H-12), 2.35(1H, m, H-15a), 2.54(1H, m, H-15b), 1.89(2H, m, H-16), 2.50(1H, m, H-17), 1.88(3H, s, Me-18), 1.80(3H, s, Me-19), 4.09(1H, m, H-20), 1.41(3H, d, J=6.4Hz, Me-21), 5.28(1H, br d, J=9.3Hz, cym-1), 1.86(1H, m, cym-2a), 2.27(1H, m, cym-2b), 4.00(1H, m, cym-3), 3.43(1H, br d, J=8.8Hz, cym-4), 4.19(1H, m, cym-5), 1.33(3H, d, J=6.4Hz, cym-6), 3.55(3H, s, Me-cym-3), 5.08(1H, br d, J=9.3Hz, cym-1'), 1.80(1H, m, cym-2a'), 2.30(1H, m, cym-2b'), 4.01(1H, m, cym-3'), 3.45(1H, dd, J=8.8Hz, J=2.6Hz, cym-4'), 4.15(1H, m, cym-5'), 1.43(3H, d, J=6.4Hz, cym-6'), 3.58(3H, s, Me-cym-3'), 5.07(1H, d, J=8.3Hz, alm-1), 3.80(1H, m, alm-2), 4.44(1H, m, alm-3), 3.71(1H, br d, J=9.8Hz, alm-4), 4.24(1H, m, alm-5), 1.61(3H, d, J=6.4Hz, cym-6'), 3.82(3H, s, Me-alm-3'), 4.97(1H, d, J=7.8Hz, glc-1), 4.04(1H, m, glc-2), 4.23(1H, m, glc-3), 4.20(1H, m, glc-4), 4.25(1H, m, glc-5), 4.37(1H, dd, J=11.7Hz, J=5.4Hz, glc-6). ^{13}C -NMR(C_5D_5N , 125MHz): δ 39.9(t, C-1), 30.4(t, C-2), 78.3(d, C-3), 40.9(t, C-4), 141.0(s, C-5), 118.6(d, C-6), 36.1(t, C-7), 76.4(s, C-8), 51.1(d, C-9), 39.7(s, C-10), 70.1(d, C-11), 82.2(d, C-12), 54.4(s, C-13), 85.4(s, C-14), 36.0(t, C-15), 27.5(t, C-16), 56.8(d, C-17), 12.2(q, C-18), 17.9(q, C-19), 69.7(s, C-20), 23.3(q, Me-21), 96.4(d, cym-1), 37.3(t, cym-2), 78.1(d, cym-3), 83.4(d, cym-4), 69.1(d, cym-5), 18.7(q, cym-6), 58.9(q, Me-cym-3), 100.4(d, cym-1'), 37.1(t, cym-2'), 78.2(d, cym-3'), 83.2(d, cym-4'), 69.3(d, cym-5'), 18.6(q, cym-6'), 59.1(q, Me-cym-3'), 104.0(d, alm-1), 72.5(d, alm-2), 83.1(d, alm-3), 83.1(d, alm-4), 69.3(d, alm-5), 18.3(d, alm-6), 61.8(q, Me-alm-3'), 106.6(d, glc-1), 75.5(d, glc-2), 78.5(d, glc-3), 71.9(d, glc-4), 78.4(d, glc-5), 63.0(t, glc-6).

[0113] 斑马鱼胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼, 平均每对能产 200~300 个胚胎。在受精后 6 小时(即 6hpf) 和 24hpf 对胚胎进行清理(移除已死亡胚胎), 并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎。在 28 $^{\circ}$ C 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质: 每 1L 反渗透水中加入 200mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 μ S/cm; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6mg/LCaCO₃)。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质, 所以在受精后 9 天内(9dpf) 不需要喂食。实验完成后, 用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理, 从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA) 对动物麻醉处死的规范要求。

[0114] 戊四唑处理的斑马鱼为癫痫模型组; 苯妥英钠与戊四唑共同处理的斑马鱼为阳性对照组; 1.1% 的 DMSO 处理的斑马鱼为阴性对照组(溶剂对照组); 未处理的斑马鱼为空白对照组。南山藤苷 N 溶于 DMSO 中, 配制成浓度为 30 μ M 的待测溶液。上述待测溶液分别与戊

四唑共同处理斑马鱼一定时间,利用行为分析仪记录 60min 内斑马鱼的运动轨迹,然后对斑马鱼的快速运动 (seizure, $V > 20\text{mm/sec}$) 距离进行定量分析,通过计算得到以下指标:①斑马鱼快速运动距离 (distance of rapid movement-seizure);②化合物的抗癫痫治疗效率 (therapeutic efficacy);③化合物对斑马鱼快速运动影响的时间变化曲线 (compound effect on the time-course of zebrafish seizure)。南山藤苷 N 和苯妥英钠与癫痫模型组相比,斑马鱼快速运动轨迹明显减少,初步确定南山藤苷 N 具有抗癫痫作用,治疗效率为 $19 \pm 2.27\%$ 。

[0115] 根据癫痫的发病机理,本发明的上述实施例系选择戊四唑 (Pentylentetrazole) 处理的斑马鱼用作癫痫模型组,待测化合物与戊四唑共同处理斑马鱼一定时间,利用运动/行为分析仪记录一定时间内斑马鱼的运动情况,对斑马鱼的运动速度与距离 (D) 进行定量分析,计算化合物的抗癫痫治疗效率,并根据化合物癫痫治疗效率绘制剂量-效应曲线,计算化合物抗癫痫作用的 IC_{50} ;用方差分析和 T-检验进行统计学分析, $p < 0.05$ 为显著性差异。

[0116]

$$\text{抗癫痫治疗效率 (\%)} = \left(1 - \frac{D(\text{待测化合物})}{D(\text{模型组})}\right) \times 100\%$$

[0117] 快速运动指斑马鱼运动速度大于 20mm/sec 的运动,相当于哺乳动物的癫痫发作状态;快速运动轨迹指利用行为分析仪记录的运动速度大于 20mm/sec 的运动轨迹,即斑马鱼在癫痫发作状态下的运动轨迹,在行为分析记录结果中以红色线条表示;快速运动距离指斑马鱼运动速度大于 20mm/sec 的运动距离,即斑马鱼在癫痫发作状态下的运动距离。

[0118] 在整个实验过程中所有实验组均未出现斑马鱼死亡现象。

[0119] 供试品选择 11-0-乙酰酯基-12, 20-0-二异戊酰酯基-苦绳苷元及其衍生物以及青阳参苷衍生物。

[0120] 阳性对照品选择左乙拉西坦和青阳参片。

[0121] 斑马鱼抗癫痫模型中,供试品 11-11-0-乙酰酯基-12, 20-0-二异戊酰酯基-苦绳苷元及其衍生物、青阳参苷衍生物以及阳性对照左乙拉西坦和青阳参片分别用 DMSO 溶解,终浓度均为 $1\ \mu\text{M}$ 。观察 60min 内各实验组斑马鱼运动轨迹,计算样品的 IC_{50} 。

[0122] 制剂实施例 1:

[0123] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物,以及利用有机酸(酒石酸,柠檬酸,甲酸,乙二酸等)或无机酸(盐酸,硫酸,磷酸等)制成的盐,按常规加注射用水,精滤,灌封灭菌制成注射液。

[0124] 制剂实施例 2:

[0125] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物,以及利用有机酸(酒石酸,柠檬酸,甲酸,乙二酸等)或无机酸(盐酸,硫酸,磷酸等)制成的盐,将其溶于无菌注射用水中,搅拌使溶,用无菌抽滤漏斗过滤,再无菌精滤,分装于 2 安瓿中,低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

[0126] 制剂实施例 3:

[0127] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物,以及利用有机酸(酒石酸,柠檬酸,甲酸,乙二酸等)或无机酸(盐酸,硫酸,磷酸等)制成的盐,与赋形剂重量比为 9:1 的比例加入赋形剂,制成粉剂。

[0128] 制剂实施例 4：

[0129] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等)或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等)制成的盐, 按其与赋形剂重量比为 1:5-1:10 的比例加入赋形剂, 制粒压片。

[0130] 制剂实施例 5：

[0131] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等)或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等)制成的盐, 按常规口服液制法制成口服液。

[0132] 制剂实施例 6：

[0133] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等)或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等)制成的盐, 按其与赋形剂重量比为 5:1 的比例加入赋形剂, 制成胶囊或颗粒剂或冲剂。

[0134] 制剂实施例 7：

[0135] 按实施例 1-7 的方法先制得本发明的上述化合物, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等)或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等)制成的盐, 按其与赋形剂重量比为 3:1 的比例加入赋形剂, 制成胶囊或颗粒剂或冲剂。

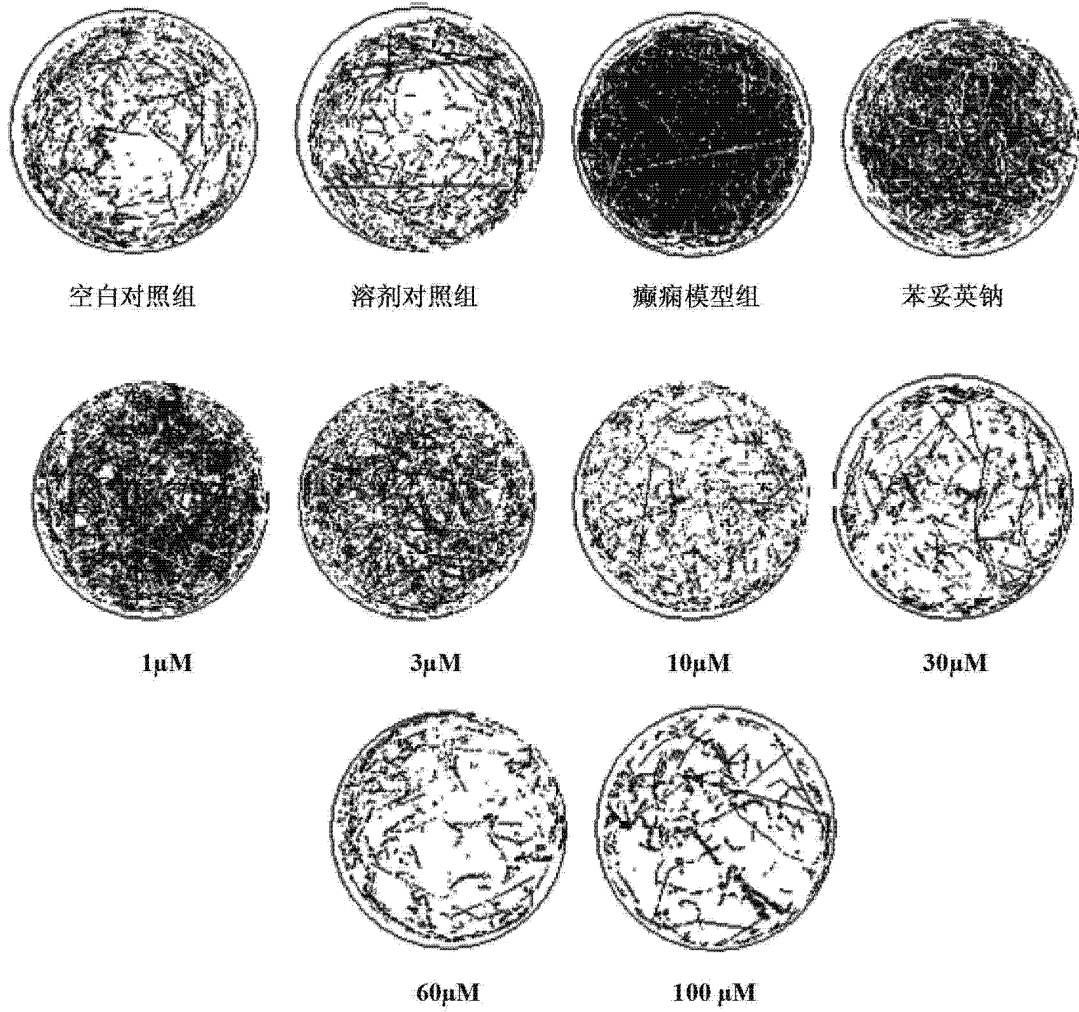


图 1-1

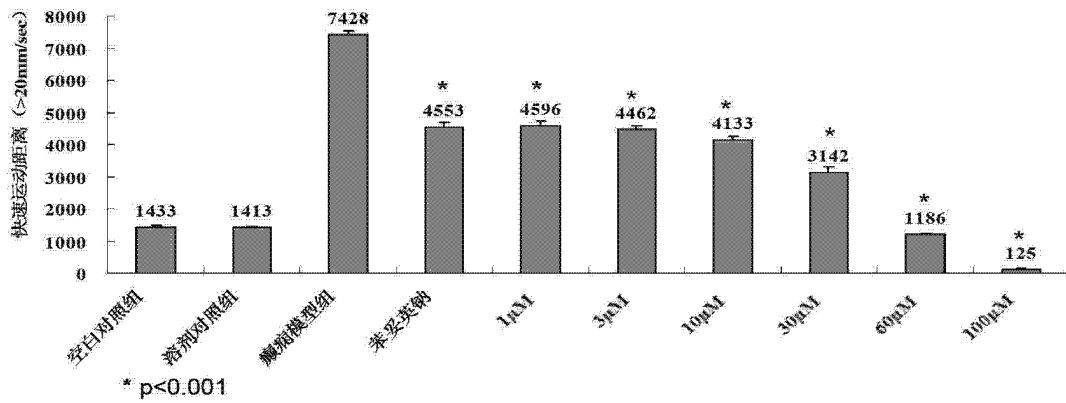


图 1-2

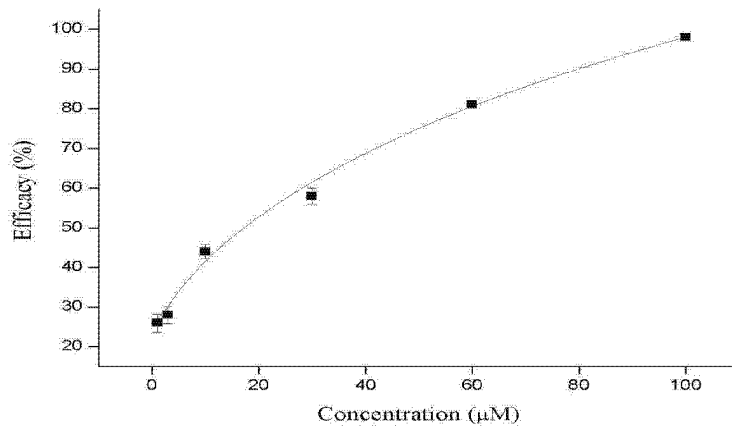


图 1-3

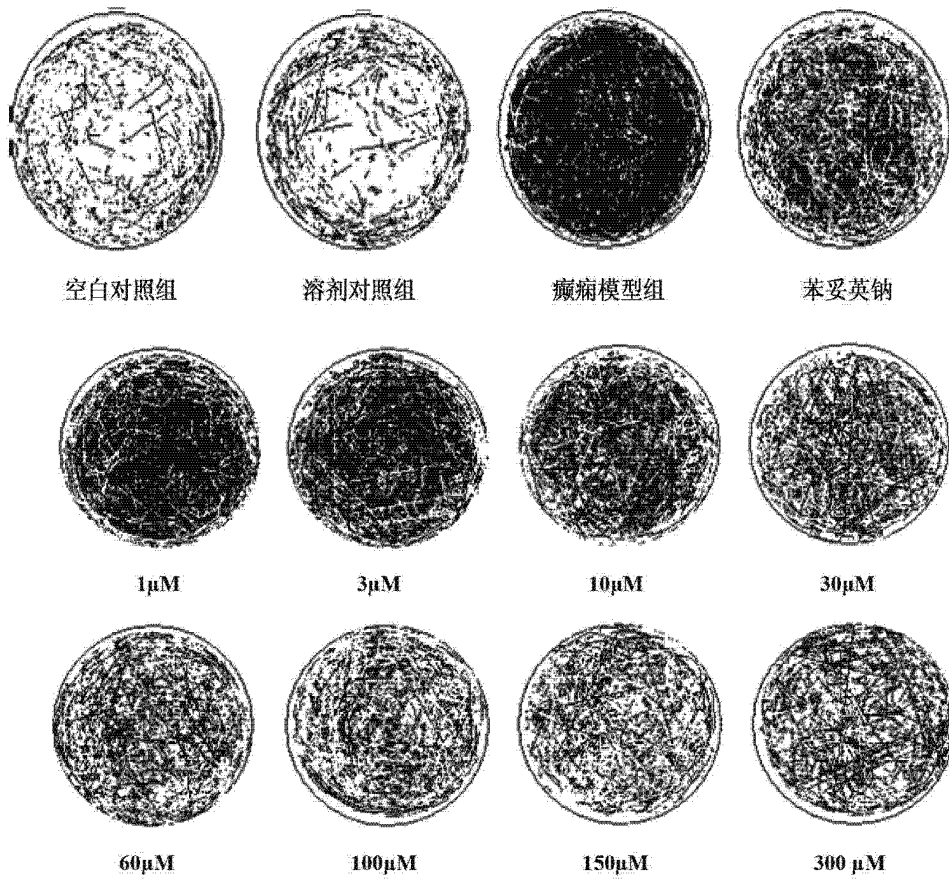


图 2-1

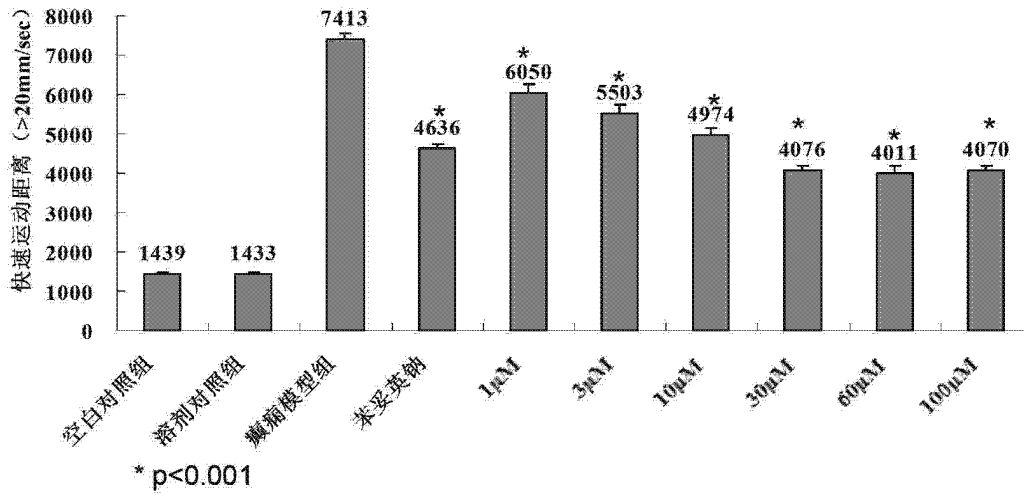


图 2-2

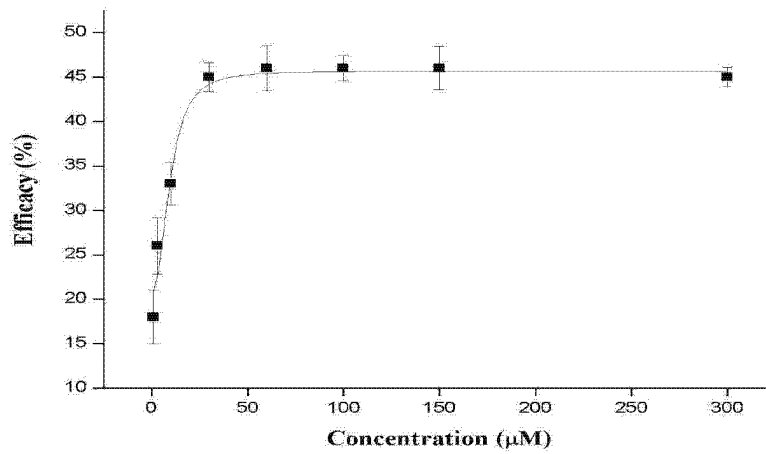


图 2-3