

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410089313.5

C07J 63/00

A61K 31/704

A61P 25/28

A61P 25/22

A61P 25/24

A61P 25/20

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1651453A

[22] 申请日 2004. 12. 9

[21] 申请号 200410089313.5

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市翔殷路 800 号

[72] 发明人 张卫东 李廷钊 张 川 柳润辉  
苏 娟 徐希科

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 陆 飞 盛志范

权利要求书 3 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 瓜子金皂苷类化合物及苷元,总皂苷  
及总皂苷元及其在医药中的应用

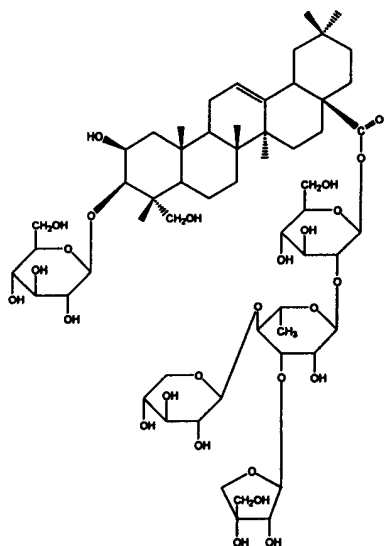
[57] 摘要

本发明属医药技术领域,具体为从中草药瓜子金中分离得到的瓜子金总皂苷及总苷元、4 种皂苷化合物及 3 种苷元,及其制备方法和在医药中的应用。4 种皂苷化合物为 polygalasaponin V, polygalasaponin E, polygalasaponin F 和 2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxy-oleanolic acid 3 $\beta$ -O-glucoside。3 种皂苷元由以上 4 种皂苷化合物水解得到,总苷元由总皂苷水解得到。实验证明:这 4 种皂苷化合物、3 种皂苷苷元、瓜子金总皂苷及总苷元对抑郁病人的症状及东莨菪碱诱导的小鼠大脑记忆损伤均有明显的改善作用;能对抗兴奋剂的中枢兴奋作用;在小鼠抗焦虑实验中显著增加动物的活动性;且能显著延长戊巴比妥钠导致的睡眠时间。可用作治疗抑郁症、老年痴呆症的药物,或用作中枢抑制剂、抗焦虑剂和催眠药等。

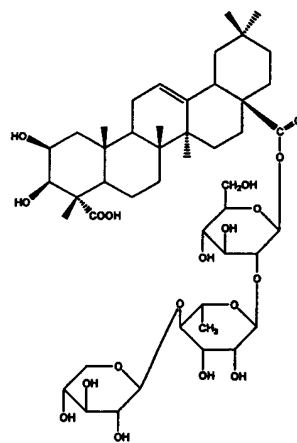
知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

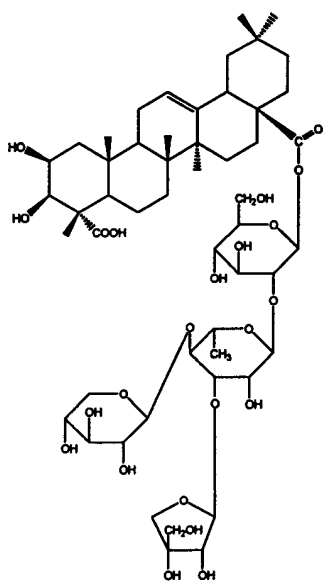
1. 一种从瓜子金中分离得到的皂苷类化合物, 其特征在于为 4 种齐墩果烷型三萜皂苷: polygalasaponin V, polygalasaponin E, polygalasaponin F 和 2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3 $\beta$ -O-glucoside, 其化学结构如下所示:



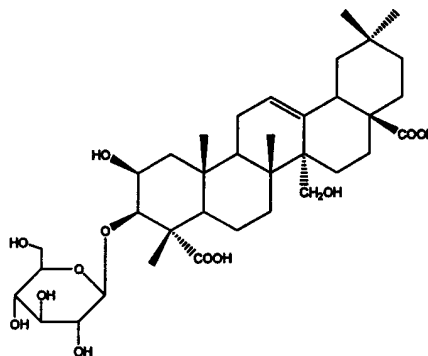
polygalasaponin V



polygalasaponin E: ( medicagenic acid 28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl] ester)

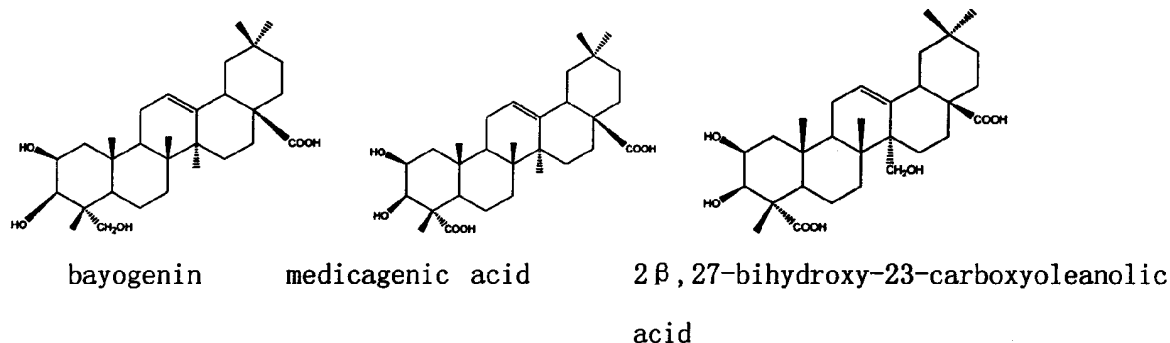


polygalasaponin F: ( medicagenic acid 28-O-{ $\beta$ -D-xylopyranosyl(1  $\rightarrow$  4)-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl} ester)



2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside

2、一种构成权利要求 1 所述的皂苷类化合物的苷元，其特征在于为 3 种齐墩果烷型三萜皂苷元 bayogenin, medicagenic acid, 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid, 其结构分别如下所示：



3、根据权利要求 1 所述的皂苷类化合物，其特征在于：

polygalasaponin V 中，苷元为 bayogenin, C-3, C-28 双糖链取代，其中，C-3 糖链为 3-O- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基，C-28 糖链为 28-O- $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-芹菜呋喃糖基(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基；

polygalasaponin E 中，苷元为 medicagenic acid, 糖链为 28-O-[ $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基；

polygalasaponin F 中，苷元为 medicagenic acid, 糖链为 28-O- $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-芹菜呋喃糖基(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基；

2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside 中，苷元为 2 $\beta$ ,27-二羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸，糖链为 3-O- $\beta$ -葡萄糖吡喃糖基。

4、根据权利要求 2 所述的皂苷类化合物的苷元，其特征在于：

bayogenin 的结构为 2 $\beta$ -羟基-23-羟基齐墩果-28-羧酸；

medicagenic acid 的结构为 2 $\beta$ -羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸；

2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 的结构为 2 $\beta$ ,27-二羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸。

5、一种瓜子金总皂苷，其特征于是包含有权利要求 1 所述的皂苷类化合物：polygalasaponin V、polygalasaponin E、polygalasaponin F 和 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3 $\beta$ -O- glucoside 之一或任意组合的混合物。

6、根据权利要求 5 所述的瓜子金总皂苷，其特征于是所述混合物中皂苷类化合物的总重量含量 $\geq$ 50%。

7、一种瓜子金总皂苷元，其特征于是包含有权利要求 2 所述苷元：bayogenin、medicagenic acid、2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 一种或其任意组合的

混合物。

8、根据权利要求 7 所述的瓜子金总苷元，其特征在于所述混合物中 3 种齐墩果烷型三萜皂苷元总重量含量 $\geq 50\%$ 。

9、如权利要求 1 所述的瓜子金皂苷类化合物及其苷元在制备治疗抑郁症、老年痴呆症的药物，以及中抑制剂：抗焦虑剂和催眠中的应用。

10、如权利要求 5 所述的瓜子金总皂苷及其总苷元在制备治疗抑郁症、老年痴呆症的药物，以及中抑制剂：抗焦虑剂和催眠中的应用。

## 瓜子金皂苷类化合物及苷元、总皂苷及总皂苷元及其在医药中的应用

### 技术领域

本发明属医药技术领域，具体涉及一种从草药瓜子金中提取分离得到的具有治疗抑郁和老年痴呆、中枢抑制、抗焦虑和催眠作用的4种齐墩果烷型三萜皂苷类化合物、3种齐墩果烷型三萜皂苷元、瓜子金总皂苷提取物及瓜子金总皂苷元，以及它们在医药中的应用。

### 背景技术

瓜子金系远志科植物瓜子金 (*Polygala japonica* HOUTT.) 的全草，中医认为其具有祛痰止咳，散瘀止血，宁心安神，解毒消肿等功效，主要用来治疗咳嗽痰多，跌打损伤，风湿痹痛，吐血，便血，心悸，失眠，咽喉肿痛等。

《中国药用植物图鉴》中认为瓜子金：“根：为镇静、祛痰剂，能益智安神，散郁化痰，消痈肿。治支气管炎，肺炎，咳嗽多痰，惊悸，健忘，痈疽疮肿，喉痹。”现代研究证明瓜子金含有的齐墩果烷型三萜皂苷是其主要的活性成分，具有治疗抑郁，益智，镇静，抗焦虑和催眠的作用。

### 发明内容

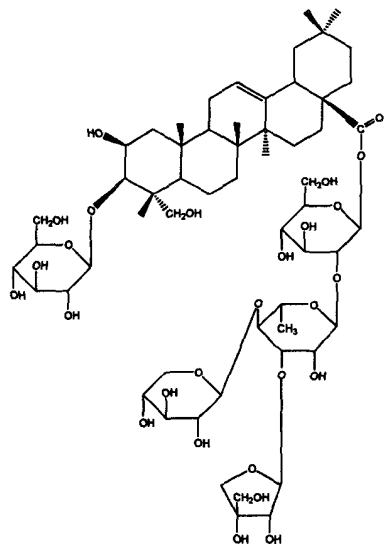
本发明的目的是，根据中医传统理论和治疗经验，结合现代化学和药理手段，从瓜子金中提取分离高效低毒，具有治疗抑郁和老年痴呆，镇静，抗焦虑和催眠作用的齐墩果烷型三萜皂苷，并制备具有治疗抑郁和老年痴呆，镇静，抗焦虑和催眠作用的齐墩果烷型三萜皂苷苷元。

本发明从草药瓜子金中提取分离瓜子金皂苷类化合物，得到4种齐墩果烷型三萜皂苷：polygalasaponin V，polygalasaponin E，polygalasaponin F 和 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3 $\beta$ -O- glucoside，以及包含这4种齐墩果烷型三萜皂苷中的一种或多种(一般这皂苷化合物重量含量 $\geq$ 50%)的混合物-瓜子金总皂苷，并通过水解等方法得到这4种皂苷的3种苷元，及包含这3种苷元中的一种或多种(一般这苷元的重量含量 $\geq$ 50%)的混合物-瓜子金总皂苷元。

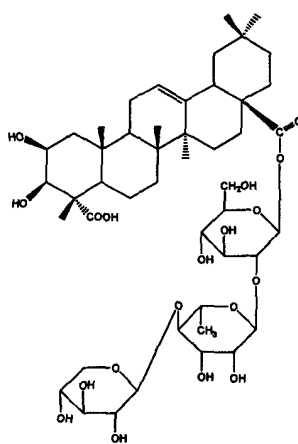
这4种齐墩果烷型瓜子金三萜皂苷及包含这些齐墩果烷型三萜皂苷的混合物瓜子金总皂苷，以及由以上三萜皂苷得到的3种齐墩果烷型瓜子金三萜皂苷苷元及包含这些齐墩果烷型三萜皂苷苷元的瓜子金皂苷总苷元，对抑郁病人、老年痴呆及东莨菪碱诱导的小鼠记忆损伤均有明显的改善作用；能对抗兴奋剂的中枢兴奋作用减少小鼠的自主活动；在小鼠

抗焦虑实验中显著增加动物的活动性；且能显著延长戊巴比妥钠导致的睡眠时间。它们是有有效的治疗抑郁和老年痴呆的药物，并且是有效的镇静剂、抗焦虑剂和催眠药。

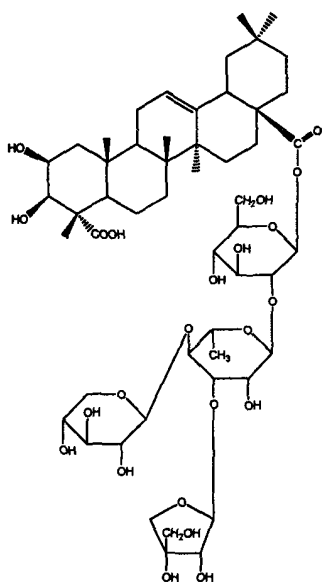
本发明中的4种齐墩果烷型三萜皂苷化学结构分别如下所示：



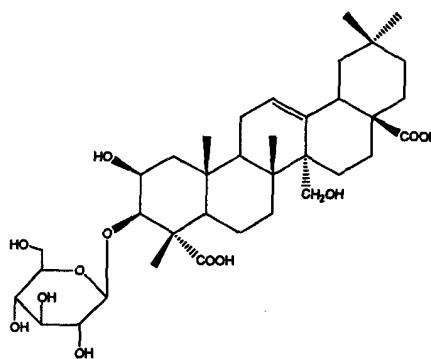
polygalasaponin V



polygalasaponin E: ( medicagenic acid 28-O-[  $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-  $\beta$ -D-glucopyranosyl] ester)



polygalasaponin F: ( medicagenic acid 28-O-{  $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)-[  $\beta$ -D-apiofuranosyl(1 $\rightarrow$ 3)]-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-  $\beta$ -D-glucopyranosyl} ester)



2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid  
3-O- $\beta$ -glucopyranoside

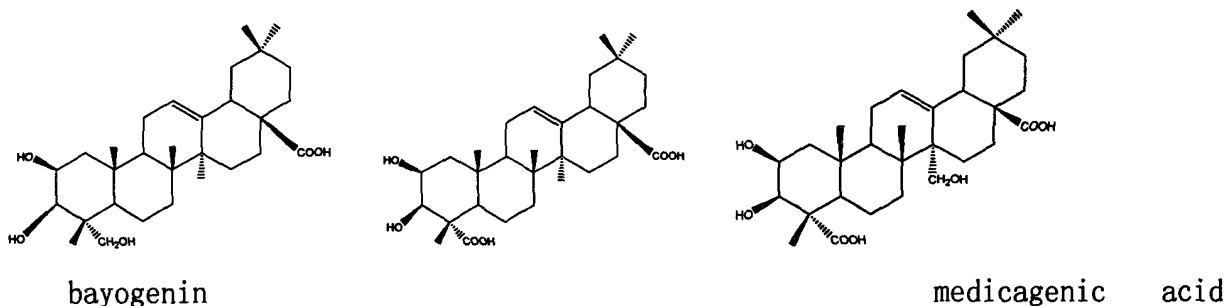
Polygalasaponin V 中, 苷元为 bayogenin, C-3, C-28 双糖链取代, 其中, C-3 糖链为 3-O- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基, C-28 糖链为 28-O- $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-芹菜呋喃糖基(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基。

Polygalasaponin E 中, 苷元为 medicagenic acid, 糖链为 28-O- $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基。

Polygalasaponin F 中, 苷元为 medicagenic acid, 糖链为 28-O- $\beta$ -D-木糖吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-芹菜呋喃糖基(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基。

2 $\beta$ , 27-bihydroxy- 23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside 中, 苷元为 2 $\beta$ , 27-二羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸, 糖链为 3-O- $\beta$ -葡萄糖吡喃糖基。

本发明中 3 种齐墩果烷型三萜皂苷苷元的化学结构如下所示:



2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid

Bayogenin 的结构为 2 $\beta$ -羟基-23-羟基齐墩果-28-羧酸。

Medicagenic acid 的结构为 2 $\beta$ -羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸。

2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 的结构为 2 $\beta$ , 27-二羟基-23-羧基齐墩果-28-羧酸。

本发明提供的齐墩果烷型三萜皂苷以及包含齐墩果烷型三萜皂苷的混合物瓜子金总皂苷的制备方法如下, 瓜子金用乙醇等有机溶剂提取, 提取液浓缩得到浸膏, 再经大孔树脂柱分离, 收集乙醇洗脱液, 浓缩, 即得到瓜子金总皂苷。再经硅胶柱层析, 用薄层层析检测层析流分, 合并具有相同单一斑点的流分, 浓缩, 在经 RP-18 低压柱、葡聚糖凝胶柱或制备高效液相色谱分离和纯化, 分别得: polygalasaponin V, polygalasaponin E, polygalasaponin F 和 2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3 $\beta$ -O-glucoside。以上 4 种齐墩果烷型三萜皂苷分别经酸水解得到 3 种齐墩果烷型三萜皂苷苷元: bayogenin、medicagenic acid、2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid。瓜子金皂苷总苷元由瓜子金总皂苷经水解后脱色得到, 包含有 bayogenin、medicagenic acid、2 $\beta$ , 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid。

通过酸水解以及紫外光谱仪、红外光谱仪、电喷雾质谱仪、高分辨电喷雾质谱仪、核磁共振谱仪（氢谱、碳谱、化学位移相关谱、无畸变极化转移增益谱、异核多量子相干谱、异核多键相干谱、二维核欧沃豪斯效应谱、全相关谱等）、旋光仪、气相色谱仪等化学和光谱分析技术,得到 4 种齐墩果烷型三萜皂苷和 3 种齐墩果烷型三萜皂苷苷元的化学结构,它们分别为: 3-O-β-D-glucopyranosyl bayogenin 28-O-{β-D-xylopyranosyl(1→4)-[β-D-apiofuranosyl (1→3)]-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl} ester; medicagenic acid 28-O-[β-D-xylopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl] ester; medicagenic acid 28-O-{β-D-xylopyranosyl(1→4)-[β-D-apiofuranosyl(1→3)]-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl} ester ; 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside ; 2β-hydroxy-23-hydroxyoleanolic acid ; 2β-hydroxy-23-carboxyoleanolic acid ; 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid.

本发明对瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4 个齐墩果烷型三萜皂苷和 3 个齐墩果烷型皂苷苷元进行了抗抑郁、抗老年痴呆、中枢抑制、抗焦虑和催眠作用的活性评价试验。

(一) 瓜子金皂苷及苷元对小鼠强迫游泳不动时间的影响

1. 试验目的:

评价瓜子金皂苷及苷元对小鼠强迫游泳不动时间的影响。

2. 方法

取雄性 ICR 小鼠, 体重 20±2g, 随机分为 11 个实验组, 一个氟西汀对照组和 1 个空白对照组。常规饲养, 一周后, 将 4 种三萜皂苷、3 种三萜皂苷苷元、瓜子金总皂苷和瓜子金皂苷总苷元水悬液按 50mg/kg 灌胃, 1 次/d, 连续给药 7 天。末次给药 1 小时后进行强迫游泳实验。

每只小鼠游泳 6min, 记录后 4min 内的不动时间。用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

3. 结果

瓜子金皂苷及苷元 (10-200mg/kg) 能显著缩短强迫游泳小鼠的不动时间 (表 1)。

表 1 瓜子金皂苷及苷元对强迫游泳小鼠不动时间的影响

分组	不动时间	缩短百分比(%)	P
阴性组	116.5±32.4		
阳性组	45.3±21.9	61.1	<0.01



总皂苷	50.8±30.1	56.4	<0.01
总苷元	42.5±25.0	63.5	<0.01
Polygalasaponin	55.6±27.4	60.9	<0.01
V			
Polygalasaponin	31.6±19.9	72.9	<0.01
E			
Polygalasaponin	36.3±24.7	68.8	<0.01
F			
A*	29.5±26.8	74.7	<0.01
bayogenin	59.5±30.8	48.9	<0.01
medicagenic acid	25.1±24.9	78.5	<0.01
B*	23.8±20.6	79.6	<0.01

\* A: 2β, 27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β, 27-bihydroxy- 23-carboxyoleanolic acid

4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4 个三萜皂苷和 3 个三萜皂苷苷元(10-100mg/kg) 具有显著的抗抑郁作用。

(二) 瓜子金皂苷及苷元对悬尾小鼠不动时间的影响

1. 实验目的

评价瓜子金皂苷对悬尾小鼠不动时间的影响。

2. 方法

取雄性 ICR 小鼠，体重 20±2g，随机分为 11 个实验组，一个氟西汀对照组和 1 个空白对照组。常规饲养，一周后，将 4 种三萜皂苷、3 种三萜皂苷苷元、瓜子金总皂苷和瓜子金皂苷总苷元水悬液按 50mg/kg 灌胃，1 次/d，连续给药 7 天。末次给药 1 小时后进行悬尾实验。

每只小鼠悬尾 6min，记录后 4min 内的不动时间。用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

3. 结果

瓜子金皂苷及苷元（10-200mg/kg）均能显著缩短悬尾小鼠的不动时间（表 2）。

表 1 瓜子金皂苷及苷元对悬尾小鼠不动时间的影响

分组	不动时间	缩短百分比(%)	P
阴性组	99.6±28.3		
阳性组	42.1±21.8	57.7	<0.01
总皂苷	39.7±25.2	60.1	<0.01
总苷元	30.5±19.5	69.4	<0.01
Polygalasaponin	45.8±28.4	54.0	<0.01
V			
Polygalasaponin	29.3±20.2	70.6	<0.01
E			
Polygalasaponin	27.6±26.5	72.3	<0.01
F			
A*	30.9±27.7	69.0	<0.01
bayogenin	39.0±30.8	60.8	<0.01
medicagenic acid	32.4±24.9	67.5	<0.01
B*	27.2±30.1	72.7	<0.01

\* A: 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside

B: 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid

#### 4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4个三萜皂苷和3个三萜皂苷苷元(10-200mg/kg)具有显著的抗抑郁作用。

#### (三) 瓜子金皂苷及苷元的促智作用

##### 1. 实验目的

评价瓜子金皂苷及苷元对老年痴呆的治疗作用。

##### 2. 方法

取 ICR 小鼠雌雄各半, 体重  $20\pm 2\text{g}$ , 随机分为 11 个实验组, 阴性对照和阳性对照组每次均灌以等体积的生理盐水, 其余 9 个实验组先分别给药 7 天, 末次给药后, 除阴性对照组外, 其余各组均灌胃  $10\text{mg/kg}$  东莨菪碱, 给药一小时后进行跳台实验。用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

##### 3. 结果

瓜子金皂苷及苷元 ( $10\text{--}200\text{mg/kg}$ ) 均能显著延长东莨菪碱诱导脑损伤小鼠跳台潜伏期并使错误次数明显减少 (表 3)。

表 3 瓜子金皂苷及苷元对小鼠学习记忆功能的影响

分组	训练 5min 内错 误次数 (n)	24h 后潜伏期 (T1)/s	3min 内错误次 数 (n)	P
阴性组	5.77±3.83	73.23±49.84	0.47±0.23	
阳性组	16.5±4.77	22.93±12.63	2.90±1.66	
总皂苷	10.34±3.97	45.24±15.38	1.00±1.00	<0.05
总苷元	9.25±3.45	51.75±20.66	0.92±0.83	<0.01
Polygalasaponin	9.79±5.21	54.19±17.68	0.78±0.43	<0.01
V				
Polygalasaponin	6.57±3.11	60.43±19.90	0.71±0.59	<0.01
E				
Polygalasaponin	5.26±4.27	63.24±21.30	0.69±0.60	<0.01
F				
A*	7.16±3.38	59.49±18.61	0.82±0.36	<0.01
bayogenin	9.98±5.12	48.26±22.48	0.97±0.85	<0.05
medicagenic	5.71±3.29	66.40±17.85	0.66±0.20	<0.01
acid				
B*	5.13±3.57	69.50±18.37	0.63±0.28	<0.01

\* A: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β,27-bihydroxy- 23-carboxyoleanolic acid

4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4 个三萜皂苷和 3 个三萜皂苷苷元 (10-100mg/kg) 能改善东莨菪碱诱导的脑损伤, 具有促进小鼠学习记忆功能的作用。

(四) 瓜子金皂苷及苷元的镇静作用

1. 实验目的

评价瓜子金皂苷及苷元的镇静作用。

2. 方法

取雌性 ICR 小鼠, 体重 25±2g。小鼠分为 11 组, 一个阴性对照组, 一个阳性对照组 (安定), 其余 9 组为受试组。连续给药 7 天, 末次给药 1h 后小鼠置小型动物自主活动测定仪中, 适应 3min 后, 测定 5min 小鼠自主活动计数, 用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

3. 结果

瓜子金皂苷及苷元均能显著减少小鼠自主活动（表 4）。

表 4 瓜子金皂苷及苷元对小鼠自主活动的影响

组别	自主活动计数（次）	P
阴性组	302.4±89.6	
阳性组	116.4±100.3	<0.01
总皂苷	139.6±83.1	<0.01
总苷元	159.2±118.3	<0.01
Polygalasaponin V	147.9±106.7	<0.01
Polygalasaponin E	129.8±96.4	<0.01
Polygalasaponin F	120.5±78.2	<0.01
A*	130.4±92.5	<0.01
Bayogenin	143.8±114.6	<0.01
medicagenic acid	119.9±105.1	<0.01
B*	125.7±86.9	<0.01

\* A: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β,27-bihydroxy- 23-carboxyoleanolic acid

4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4 个三萜皂苷和 3 个三萜皂苷苷元(10-200mg/kg) 能显著抑制小鼠的自发活动，提示其具有中枢抑制作用，可用作镇静剂。

（五）瓜子金皂苷及苷元的抗焦虑作用

1. 实验目的

评价瓜子金皂苷及苷元的抗焦虑活性。

2. 方法

取雄性 ICR 小鼠，随机分作 11 组，一阴性对照组，一阳性对照组（安定），其余为受试组。口服给药 1h 后将受试动物置于高架十字迷宫中央开阔区，头朝闭臂，观察 5min 内小鼠进入开臂和闭臂的次数与在两臂滞留的时间。分别计算小鼠进入开臂的次数和时间占总次数和总时间的百分比。用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

3. 结果

瓜子金皂苷及苷元可显著增加小鼠在高架十字迷宫开臂滞留次数及滞留时间（表 5）。

瓜子金皂苷及苷元的抗焦虑作用

组别	开臂滞留次数百分率	开臂滞留时间百分率
阴性组	30.49±14.53	25.03±16.2
阳性组	55.24±19.08**	50.63±20.7**
总皂苷	45.56±13.57*	51.02±16.2*
总苷元	50.24±14.78*	48.21±15.8*
Polygalasaponin V	48.25±13.86*	59.24±15.24*
Polygalasaponin E	50.52±19.24*	54.32±16.34*
Polygalasaponin F	49.26±18.23*	49.52±13.56*
A	45.27±16.29*	50.28±13.29*
bayogenin	49.02±12.8*	47.26±18.34*
medicagenic acid	52.01±16.34*	52.82±10.86*
B	47.42±18.22*	47.27±15.47*

A: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid

\* P<0.05    \*\* P<0.01

4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4 个三萜皂苷和 3 个三萜皂苷苷元(10-200mg/kg) 具有抗焦虑作用。

(六) 瓜子金皂苷及苷元的催眠作用

1. 实验目的

评价瓜子金皂苷和苷元的催眠活性。

2. 方法

2.1 对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠作用的影响

取雌性 ICR 小鼠，随机分作 10 组，一组空白对照，其余为受试组。连续给药 7 天，末次给药 30min 后腹腔注射阈下剂量戊巴比妥钠，即刻观察，翻正反射超过 1min 为入睡指标，记录 15min 中内入睡小鼠个数。χ<sup>2</sup> 检验比较受试组与对照组间的差异。

2.2 对小鼠戊巴比妥钠阈剂量催眠时间的影响

取雌性 ICR 小鼠，随机分作 10 组，一组空白对照，其余为受试组。连续给药 7 天，末次给药 30min 后腹腔注射阈剂量戊巴比妥钠，即刻观察，从睡眠开始记录小鼠睡眠时间，用单因素方差分析检验各受试组和对照组间差异。

3. 结果

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4个三萜皂苷和3个三萜皂苷苷元(10-200mg/kg)能显著增加阈下剂量小鼠睡眠的个数(表6),并能显著延长阈剂量小鼠的睡眠时间(表7)。

表6 瓜子金皂苷及苷元对小鼠阈下剂量戊巴比妥钠致睡眠的影响

组别	小鼠数量(只)	入睡个数(只)	
对照组	15	1	
总皂苷	15	10	<0.01
总苷元	15	9	<0.01
Polygalasaponin V	15	8	<0.01
Polygalasaponin E	15	10	<0.01
Polygalasaponin F	15	9	<0.01
A*	15	11	<0.01
Bayogenin	15	7	<0.01
Medicagenic acid	15	8	<0.01
B*	15	9	<0.01

\* A: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β,27-bihydroxy- 23-carboxyoleanolic acid

表7 瓜子金皂苷及苷元对小鼠阈剂量戊巴比妥钠致睡眠时间的影响

组别	睡眠时间(min)	P
阴性组	15.7±3.1	
总皂苷	38.4±6.3	<0.01
总苷元	43.8±9.2	<0.01
Polygalasaponin V	37.4±4.9	<0.01
Polygalasaponin E	46.5±10.3	<0.01
Polygalasaponin F	48.1±12.0	<0.01
A*	41.9±9.7	<0.01
bayogenin	49.4±12.4	<0.01

medicagenic acid	43.7±7.1	<0.01
B*	39.3±8.9	<0.01

\* A: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

B: 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid

4. 结论

ig 瓜子金总皂苷、瓜子金皂苷总苷元、4个三萜皂苷和3个三萜皂苷苷元(10-200mg/kg)具有催眠作用。

具体实施方式

实施例 1:

制备瓜子金总皂苷

瓜子金全草 10kg 粉碎后，以 70%乙醇回流提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压回收溶剂，得乙醇提取物，该提取物以水分散后，经 AB-8 大孔吸附树脂吸附，以水洗脱后，50%乙醇洗脱，收集 50%乙醇洗脱液，溶剂回收至干后以甲醇溶解为浓溶液，按比例缓慢加入乙醚-丙酮（1:3）混合溶液，持续搅拌，滤出沉淀，真空干燥即得瓜子金总皂苷。

瓜子金总皂苷，淡黄色至棕色粉末，Lieberman-Burchard 反应呈阳性。

实施例 2:

制备瓜子金皂苷总苷元

瓜子金全草 10kg 粉碎后，以 70%乙醇回流提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压回收溶剂，得乙醇提取物，该提取物以水分散后，经 AB-8 大孔吸附树脂吸附，以水洗脱后，50%乙醇洗脱，收集 50%乙醇洗脱液，溶剂回收至干后以甲醇溶解为浓溶液，按比例缓慢加入乙醚-丙酮混合溶液，持续搅拌，滤出沉淀，沉淀真空干燥后以一定比例盐酸甲醇溶液加热水解，水解完全后蒸去溶剂，剩余物加水混悬，用乙酸乙酯萃取，乙酸乙酯部分用活性炭脱色，蒸干溶剂即得瓜子金皂苷总苷元。

瓜子金皂苷总苷元，白色至黄色粉末，Lieberman-Burchard 反应呈阳性。

实施例 3:

制备 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside

瓜子金全草 10kg 粉碎后，以 70%乙醇回流提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压回收溶剂，得乙醇提取物，该提取物以水分散后，经 AB-8 大孔吸附树脂吸附，以水洗脱后，50%乙醇洗脱，收集 50%乙醇洗脱液，溶剂回收至干后，将所得固体物行硅胶柱层析，氯仿-甲醇-水梯度洗脱，用薄层层析检查洗脱流分，具有相同单一斑点的流分合并，浓缩，得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9，其中流分 2 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分

离纯化，得 2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside。

2β,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O-β-glucopyranoside，白色无定形粉末或白色针晶，mp182-184℃， $[\alpha]_D^{20} +37^\circ$ ，(c=0.27, MeOH)，分子式：C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>12</sub>。

经光谱数据分析和理化性状测定与文献报道完全一致。

实施例 4：

制备新化合物 polygalasaponin E

瓜子金全草 10kg 粉碎后，以 70%乙醇回流提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压回收溶剂，得乙醇提取物，该提取物以水分散后，经 AB-8 大孔吸附树脂吸附，以水洗脱后，50%乙醇洗脱，收集 50%乙醇洗脱液，溶剂回收至干后，将所得固体物行硅胶柱层析，氯仿-甲醇-水梯度洗脱，用薄层层析检查洗脱流分，具有相同单一斑点的流分合并，浓缩，得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9，其中流分 5 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化，得 polygalasaponin E。

Polygalasaponin E，白色无定形粉末或白色针晶，mp145-147℃， $[\alpha]_D^{20} -45.3^\circ$  (c=0.38, MeOH)，HR-ESIMS: 965.4720[M+Na]<sup>+</sup>，计算值 C<sub>47</sub>H<sub>74</sub>O<sub>19</sub>Na 为 965.44722。结合核磁共振 <sup>1</sup>H 谱和 <sup>13</sup>C 谱，推断分子式为 C<sub>47</sub>H<sub>74</sub>O<sub>19</sub>。利用多种二维核磁共振相关谱（化学位移相关谱、无畸变极化转移增益谱、异核多量子相干谱、异核多键相干谱、二维核欧沃豪斯效应谱、全相关谱）对其结构进行解析，鉴定 polygalasaponin E 为 medicagenic acid 28-O-[β-D-xylopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl] ester，为一新化合物，对碳氢信号归属如下：

编号	C	H	编号	C	H
1	44.9	2.40(1H, d, J=13 Hz) 1.41(1H, m)	25	16.8	1.61(3H, s)
2	71.3	4.57(1H, m)	26	17.1	1.17(3H, s)
3	75.6	4.53(1H, m)	27	25.7	1.23(3H, s)
4	53.6		28	176.1	
5	52.0	2.17(1H, m)	29	32.8	0.84(3H, s)
6	21.4	1.92(1H, m) 1.77(1H) <sup>a</sup>	30	23.5	0.84(3H, s)



7	32.0	1.94(1H) <sup>a</sup> 1.71(1H) <sup>a</sup>	Glc-1	94.5	6.21(1H, d, J=8.0 Hz)
8	40.1		2	76.2	4.37(1H, d, J=8.0 Hz)
9	48.5	1.81(1H) <sup>a</sup>	3	79.0	4.30(1H) <sup>a</sup>
10	36.7		4	71.0	4.28(1H) <sup>a</sup>
11	23.7	2.20(1H, m) 2.05(1H, m)	5	78.4	4.06(1H) <sup>a</sup>
12	122.5	5.48(1H, t-like)	6	61.8	4.40(1H, dd, J=12.0, 2.0 Hz) 4.34(1H) <sup>a</sup>
13	143.8		Rah-1	101.0	6.41(1H, s)
14	42.1		2	71.4	4.83(1H, br)
15	28.1	2.08(1H) <sup>a</sup> 1.44(1H, m)	3	72.2	4.71(1H, dd, J=8.0, 3.0 Hz)
16	23.2	2.10(1H, m) 1.95(1H) <sup>a</sup>	4	84.9	4.35(1H) <sup>a</sup>
17	46.8		5	68.1	4.52(1H, dd, J=6.0, 9.0 Hz)
18	41.8	3.13(1H, dd, J=13.0, 3.0 Hz)	6	18.3	1.79(3H, d, J=6.0 Hz)
19	46.0	1.94(1H) <sup>a</sup> 1.20(1H, m)	Xyl-1	107.2	5.05(1H, m)
20	30.4		2	75.9	4.05(1H) <sup>a</sup>
21	33.6	1.30(1H, m) <sup>a</sup> 1.11(1H, d, J=12.0 Hz)	3	78.5	3.97(1H, m)
22	32.8	1.81(1H) <sup>a</sup> 1.68(1H, m)	4	70.6	4.18(1H, m)
23	180.8		5	67.2	4.24(1H, dd, J=11.0, 5.0 Hz) 3.52(1H, t, J=10.0 Hz)

24	13.4	1.98(3H, s)
----	------	-------------

实施例 5:

制备新化合物 polygalasaponin F

瓜子金全草 10kg 粉碎后, 以 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 小时, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得乙醇提取物, 该提取物以水分散后, 经 AB-8 大孔吸附树脂吸附, 以水洗脱后, 50%乙醇洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液, 溶剂回收至干后, 将所得固体物行硅胶柱层析, 氯仿-甲醇-水梯度洗脱, 用薄层层析检查洗脱流分, 具有相同单一斑点的流分合并, 浓缩, 得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9, 其中流分 7 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化, 得 polygalasaponin F。

Polygalasaponin F, 白色无定形粉末或白色针晶, mp152-154℃,  $[\alpha]_D^{20} -2.44^\circ$  (c=0.16, MeOH), HR-ESIMS: 1097.5142[M+Na]<sup>+</sup>, 计算值 C<sub>62</sub>H<sub>82</sub>O<sub>23</sub>Na 为 1097.5145, 结合核磁共振 <sup>1</sup>H 谱和 <sup>13</sup>C 谱, 推断分子式为 C<sub>62</sub>H<sub>82</sub>O<sub>23</sub>。利用多种二维核磁共振相关谱 (化学位移相关谱、无畸变极化转移增益谱、异核多量子相干谱、异核多键相干谱、二维核欧沃豪斯效应谱、全相关谱) 对其结构进行解析, 鉴定 polygalasaponin F 结构为 medicagenic acid 28-O-{β-D-xylopyranosyl(1 → 4)-[β-D-apiofuranosyl(1 → 3)]-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranosyl} ester, 为一新化合物, 并对碳氢信号归属如下:

编号	C	DEPT	H	编号	C	DEPT	H
1	44.90	CH <sub>2</sub>	2.40(1H, dd, J=12.0, 2.0 Hz)	28	176.10	C	
			1.42(1H, m)				
2	71.29	CH	4.58(1H, m)	29	32.13	CH <sub>3</sub>	0.83(3H, s)
3	75.56	CH	4.75(1H, d, J=4.0 Hz)	30	23.52	CH <sub>3</sub>	0.89(3H, s)
4	53.64	C		Glc-1	94.45	CH	6.26(1H, d, J=7.0 Hz)
5	52.04	CH	2.17(1H, d, J=12.0 Hz)	2	77.96	CH	4.30(1H, dd, J=7.0, 2.0 Hz)

6	21.27	CH <sub>2</sub>	2.02(1H) 1.82(1H)	3	78.27	CH	4.23(1H, m)
7	31.99	CH <sub>2</sub>	2.00(1H) 1.75(1H)	4	71.00	CH	4.29(1H, m)
8	40.12	C		5	78.27	CH	4.00(1H)
9	48.50	CH	1.80(1H)	6	62.08	CH <sub>2</sub>	4.41(1H, dd, J=11.0, 2.0 Hz) 4.35(1H, dd, J=11.0, 5.0 Hz)
10	36.64	C		Rah-1	101.43	CH	6.19(1H, s)
11	23.70	CH <sub>2</sub>	2.21(1H, m) 2.05(1H)	2	70.97	CH	5.04(1H, br. s)
12	122.51	CH	5.50(1H, t-like)	3	81.85	CH	4.67(1H, dd, J=8.0, 3.0 Hz)
13	143.68	C		4	78.39	CH	4.55(1H, t, J=9.0 Hz)
14	41.95	C		5	68.29	CH	4.52(1H, m)
15	27.71	CH <sub>2</sub>	2.12(1H, m) 1.34(1H, m)	6	18.68	CH <sub>3</sub>	1.78(3H, d, J=6.0 Hz)
16	23.21	CH <sub>2</sub>	2.11(1H, m) 1.91(1H, m)	Xyl-1	104.95	CH	5.34(1H, d, J=8.0 Hz)
17	46.65	C		2	75.36	CH	4.00(1H)
18	41.71	CH	3.14(1H, dd, J=13.0, 4.0 Hz)	3	78.35	CH	4.10(1H, t, J=8.0 Hz)
19	46.03	CH <sub>2</sub>	1.75(1H) 1.18(1H)	4	70.91	CH	4.19(1H)
20	30.41	C		5	66.84	CH <sub>2</sub>	4.20(1H) 3.48(1H, t, J=10.0 Hz)
21	33.58	CH <sub>2</sub>	1.32(1H, m) 1.16(1H)	Api-1	111.28	CH	6.09(1H, d, J=5.0 Hz)

22	32.85	CH <sub>2</sub>	1.80 (1H) 1.61 (1H, m)	2	77.22	CH	4.78 (1H, d, J=4.0 Hz)
23	180.75	C		3	79.20	C	
24	13.42	CH <sub>3</sub>	2.03 (3H, s)	4	74.21	CH <sub>2</sub>	4.59 (1H, d, J=9.0 Hz) 4.19 (1H, d, J=9.0 Hz)
25	16.79	CH <sub>3</sub>	1.64 (3H, s)	5	64.16	CH <sub>2</sub>	4.05 (1H, d, J=12.0 Hz) 4.02 (1H, d, J=12.0 Hz)
26	17.20	CH <sub>3</sub>	1.18 (3H, s)				
27	25.73	CH <sub>3</sub>	1.22 (3H, s)				

#### 实施例 6:

##### 制备 polygalasaponin V

瓜子金全草 10kg 粉碎后, 以 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 小时, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得乙醇提取物, 该提取物以水分散后, 经 AB-8 大孔吸附树脂吸附, 以水洗脱后, 50%乙醇洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液, 溶剂回收至干后, 将所得固体物行硅胶柱层析, 氯仿-甲醇-水梯度洗脱, 用薄层层析检查洗脱流分, 具有相同单一斑点的流分合并, 浓缩, 得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9, 其中流分 8 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化, 得 polygalasaponin V。

Polygalasaponin V, 白色无定形粉末或白色针晶, mp172-14℃,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -16.7^\circ$ ,

(c=0.48, MeOH), 分子式: C<sub>58</sub>H<sub>94</sub>O<sub>27</sub>。经光谱数据分析和理化性状测定与文献报道完全一致。

#### 实施例 7:

##### 制备 2β-hydroxy-23-hydroxyoleanolic acid (bayogenin)

瓜子金全草 10kg 粉碎后, 以 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 小时, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得乙醇提取物, 该提取物以水分散后, 经 AB-8 大孔吸附树脂吸附, 以水洗脱后, 50%乙醇洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液, 溶剂回收至干后, 将所得固体物行硅胶柱层析,

氯仿-甲醇-水梯度洗脱,用薄层层析检查洗脱流分,具有相同单一斑点的流分合并,浓缩,得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9,其中流分 8 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化,得 polygalasaponin V,取 polygalasaponin V 10g,以一定比例盐酸甲醇溶液加热水解,水解完全后蒸去溶剂,剩余物加水混悬,用乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯部分回收溶剂至小体积,放置结晶即得 2 $\beta$ -hydroxy-23-hydroxyoleanolic acid.

2 $\beta$ -hydroxy-23-hydroxyoleanolic acid,无色针晶或片状结晶,分子式  $C_{30}H_{48}O_5$ 。经光谱数据分析和理化性状测定与文献报道完全一致。

#### 实施例 8:

制备 2 $\beta$ -hydroxy-23-carboxyoleanolic acid (medicagenic acid)

瓜子金全草 10kg 粉碎后,以 70%乙醇回流提取 3 次,每次 1 小时,合并提取液,减压回收溶剂,得乙醇提取物,该提取物以水分散后,经 AB-8 大孔吸附树脂吸附,以水洗脱后,50%乙醇洗脱,收集 50%乙醇洗脱液,溶剂回收至干后,将所得固体物行硅胶柱层析,氯仿-甲醇-水梯度洗脱,用薄层层析检查洗脱流分,具有相同单一斑点的流分合并,浓缩,得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9,其中流分 5、7 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化,分别得到 polygalasaponin E 和 polygalasaponin F,取 polygalasaponin E 或 polygalasaponin F 10g,以一定比例盐酸甲醇溶液加热水解,水解完全后蒸去溶剂,剩余物加水混悬,用乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯部分回收溶剂至小体积,放置结晶即得 2 $\beta$ -hydroxy-23-carboxyoleanolic acid.

2 $\beta$ -hydroxy-23-carboxyoleanolic acid,无色针晶或片状结晶,分子式  $C_{30}H_{46}O_6$ 。经光谱数据分析和理化性状测定与文献报道完全一致。

#### 实施例 9:

制备 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid

瓜子金全草 10kg 粉碎后,以 70%乙醇回流提取 3 次,每次 1 小时,合并提取液,减压回收溶剂,得乙醇提取物,该提取物以水分散后,经 AB-8 大孔吸附树脂吸附,以水洗脱后,50%乙醇洗脱,收集 50%乙醇洗脱液,溶剂回收至干后,将所得固体物行硅胶柱层析,氯仿-甲醇-水梯度洗脱,用薄层层析检查洗脱流分,具有相同单一斑点的流分合并,浓缩,得流分 1、2、3、4、5、6、7、8、9,其中流分 2 经进一步硅胶层析和葡聚糖凝胶层析分离纯化,分别得到 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside,取 2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid 3-O- $\beta$ -glucopyranoside 10g,以一定比例盐酸甲醇溶液加热水解,水解完全后蒸去溶剂,剩余物加水混悬,用乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯部分回收溶剂至小体积,放置结晶即得

2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid.

2 $\beta$ ,27-bihydroxy-23-carboxyoleanolic acid, 无色针晶或片状结晶, 分子式  $C_{30}H_{48}O_7$ 。  
经光谱数据分析和理化性状测定与文献报道完全一致。

实施例 10:

将瓜子金总皂苷用适量注射用水分散, 喷雾干燥或真空干燥, 得瓜子金总皂苷干粉。  
取聚乙二醇 400, 加入瓜子金总皂苷干粉, 边加边搅拌至均匀, 采用压制法, 制成软胶囊。  
用于治疗抑郁症。

实施例 11:

取瓜子金总皂苷, 用适量注射用水分散, 假如辅料适量, 混匀, 制成颗粒, 干燥, 压片, 包糖衣即得瓜子金总皂苷包衣片。用于治疗老年痴呆。

实施例 12:

取 polygalasaponin E 100mg, 用适量注射用水溶解, 加甘露醇 200mg, 按照常规冻干工艺冻干, 即得注射用冻干粉。用于焦虑症。

实施例 13:

取 polygalasaponin F 100mg, 用适量注射用水溶解, 加甘露醇 200mg, 按照常规冻干工艺冻干, 即得注射用冻干粉。用于镇静。

实施例 14:

取瓜子金皂苷总苷元, 加适量注射用水和土温 80 分散, 加入适量辅料, 混匀, 制成颗粒, 干燥, 压片, 包糖衣即得瓜子金皂苷总苷元包衣片。用于辅助睡眠。