

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C07D 221/06 (2006.01)



## [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410052688.4

[45] 授权公告日 2006年7月19日

[11] 授权公告号 CN 1264822C

[22] 申请日 2004.7.9

[21] 申请号 200410052688.4

[71] 专利权人 上海同田生化技术有限公司

地址 200122 上海市浦东新区浦东南路  
1279 号华融大厦 1311 室

[72] 发明人 王少珍 邓秋云

审查员 旭 昀

[74] 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司  
代理人 黄志达

权利要求书 1 页 说明书 6 页

### [54] 发明名称

一种高纯度石杉碱甲的制备方法

### [57] 摘要

本发明涉及一种用高速逆流色谱法(HSCCC)从石杉属植物千层塔中分离高纯度石杉碱甲的制备方法。它包括制备上相固体相,下相流动相的溶剂体系:正构烷烃如正庚烷、正己烷、或正戊烷;脂肪醇是甲醇、乙醇、或正丁醇、或丙酮和水组成,三组分的体积比依次为:1-5:0.1-2:1-5。条件温度20-30℃,用固定相存满柱子,主机转速600-1000rpm,以0.5-4mL/min的流速将流动相泵入柱内;待体系动态平衡后,进样阀进样;根据监测器接收目标成分。馏分浓缩蒸干后结晶,得到石杉碱甲单体。本方法适用各种型号高速逆流色谱仪和各种含量石杉碱甲制备,具有分离量大,回收率高,操作简便的特点。

1. 一种高纯度石杉碱甲的制备方法，它包括制备构成固体相，流动相的溶剂体系：先用固定相存满逆流色谱仪柱子，调节主机转速，将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；根据紫外图谱监测器接收目标成分，其特征在于：所述的溶剂体系由正庚烷、正己烷、正戊烷和甲醇、乙醇、正丁醇或丙酮，和水组成，三组分的体积比依次为：1—5：0.1—2：1—5，上相为固体相，下相为流动相。
2. 根据权利要求1所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的主机转速为600—1000rpm，所述的流动相泵入柱内的流速为0.5—4mL/min。
3. 根据权利要求1或2所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的溶剂体系为正己烷—正丁醇—水，三组分的体积比依次为5：1：5，主机转速950rpm，流动相泵入柱内的流速为3ml/min。
4. 根据权利要求1或2所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的溶剂体系是正庚烷-丙酮-水，用量体积比依次为：4：1：3，所述的主机转速650rpm，所述的流动相泵入柱内的流速为3ml/min。
5. 根据权利要求1或2所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的溶剂体系为正戊烷-甲醇-水，用量体积比依次为：2：1：1。
6. 根据权利要求1或2所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的溶剂体系为正己烷-乙醇-水，用量体积比依次为：2：1：4，所述的主机转速750rpm，所述的流动相泵入柱内的流速为4ml/min。
7. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的一种高纯度石杉碱甲的制备方法，其特征在于：所述的溶剂体系为正己烷-甲醇-水，用量体积比依次为2：1：4。

## 一种高纯度石杉碱甲的制备方法

### 技术领域

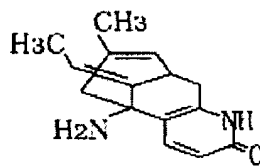
本发明涉及采用高速逆流色谱法（HSCCC）从石杉属植物千层塔中制备天然生物碱的方法，特别是一种高纯度石杉碱甲的制备方法。

### 背景技术

随着社会人口的老龄化，老年性痴呆症发病率相对上升，目前 65 岁以上的痴呆症患病率为 5%~10%，而且仍在增长之中。据统计，当今世界有 5000 多万老年人患有不同程度的老年性痴呆症。我国 60 岁以上人口预计到 2010 年将占总人口的 15.7%，痴呆症问题同样是我们所面临的不可回避的问题。因此寻找治疗老年性痴呆病的有效药物已受到各国的高度重视，成为当务之急。老年痴呆病中 50%~60% 为阿尔茨海默氏病（Alzheimer's Disease, AD），它是一种以记忆力丧失和认知功能障碍为主要特点的原发性灰质脑病。临床表现为进行性痴呆，其病因尚不明确，假说有多种，如神经递质缺陷、炎症、自由基损伤、淀粉样蛋白、神经毒作用、激素缺乏、细胞凋亡等。治疗 AD 的目的是改善认知功能障碍，提高病人的生活能力。70 年代，研究主要集中在乙酰胆碱与 AD 的关系；80 年代，主要是研究胆碱酯酶抑制剂对 AD 的影响；90 年代，研究不仅有乙酰胆碱受体激动剂，还包括了雌激素、消炎药、影响自由基代谢的药物及抑制淀粉样蛋白沉积的药物。但由于种种原因，到目前为止，AD 的临床治疗仍然是一个有待攻破的世界性难题。近年来，国内外学者在应用天然药物有效成分治疗老年痴呆病方面做了大量的基础研究和临床应用研究，由于脑中胆碱能系统与人的学习、记忆功能是密切相关的。早期的研究发现 AD 病人的脑胆碱能系统受到了损害，导致突触部位乙酰胆碱含量的下降，从而对病人的学习、记忆能力产生影响。因此，针对提高 AD 病人脑中的乙酰胆碱含量，促进胆碱能神经功能的药物应运而生。现在这类药物的研究集中于胆碱酯酶抑制剂和毒蕈碱 M1 受体激动剂。石杉碱甲(huperzine A)为我国首创的可逆性强效乙酰

胆碱酯酶(AChE) 抑制剂, 是近年来从石杉属植物千层塔 *Huperzia serrata* (Thunb.) Tre v. 中分离到的一种新的生物碱。目前进行的临床研究表明它在胆碱能神经突触处对 AChE 的抑制作用强于他克林 (tacrine)。动物行为学研究显示石杉碱甲可提高动物的学习和记忆能力, 治疗指数高于他克林、毒扁豆碱和加兰他敏。在临床为期 8 周的双盲试验中, 口服 0.2 mg/d, 每日 2 次, 有 58% 的病人显著改善了所有被测记忆、认知和行为能力参数  $P < 0.05$ , 且未出现严重的反应, 因此石杉碱甲是一种很有发展前途的治疗 AD 的药物。对老年性痴呆症, 单纯记忆障碍以及重症肌无力症治疗有显著疗效, 且药效持续时间长, 无严重不良反应, 是国内外上述病症最有效的药物, 深受关注, 国内已批准上市。在国际上已被列为第二代胆碱酯酶的抑制剂之一。

石杉碱甲的结构式如下:



化学名称为 (5R, 9R, 11E) -5-氨基-11-乙叉基-5, 6, 9, 10-四氢-7-甲基-5, 9-甲撑环辛并 (b) 吡啶-2 (1H) 酮

石杉碱甲 (Hup A) 在自然界中存在量极低, 且含有大量杂质, 至今国内外有大量研究人员正在探索寻找理想的分离办法。曾有人利用溶剂萃取、硅胶柱层析等方法进行分离, 虽然能获得少量产品, 但终因费时, 得率低而难于规模化生产。而人工合成品难于获得理想的疗效。逆流色谱分离制备方法可以达到纯度高, 得率高而优于传统的柱色谱等分离方法。高速逆流色谱技术 (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 是近 30 年发展起来的一种连续的无需任何固体支持物的高效、快速的液液分配色谱分离技术, 其原理是利用螺旋柱在行星运动时产生的离心力, 使互不相溶的两相不断混合, 同时保留其中的一相 (固体相), 利用恒流泵连续输入另一相 (流动相), 随流动相进入螺旋柱的溶质在两相之间反复分配, 按分配系数的次序, 被依次洗脱。在流动相中分配比例大的先被洗脱, 反之, 在固体相中分配比例大的后被洗脱。它

避免了固态支持体或载体带来的各种问题——样品容易被吸附、损耗和变性，使其它液相色谱技术进行制备量分离时，其分配效率会明显降低，溶剂消耗量大，HSCCC 保证较高峰型分辨率，分离量大、样品无损耗、回收率高、分离环境缓和，节约溶剂。高速逆流色谱仪能直接进大量粗提物样品或合成混合物，分离结果能够达到相当高的纯度，甚至能直接接质谱仪等仪器，已广泛应用于生物、医药、环保等领域化学物质的制备分离和纯化。因此，HSCCC 具有操作简便，理论回收率为 100%，重现性好和分离效率高、分离量较大的特点。

### 发明内容

本发明要解决的技术问题是克服传统分离技术的缺陷，采用高速逆流色谱法（HSCCC），提供一种高纯度石杉碱甲的制备方法。该方法具有回收率高，分离量大和操作简便的优点。

本发明的技术方案包括如下步骤：

采用高速逆流色谱制备方法，它包括制备构成固体相，流动相的溶剂体系：先用固定相存满逆流色谱仪柱子，调节主机转速，将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；根据监测器紫外图谱接收目标成分。首先选择一个溶剂体系的两相组合，溶剂体系由三个组分构成，A 组分可选自正庚烷、正己烷、正戊烷等正构烷烃，B 组分可选自甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮等脂肪醇及脂肪酮，C 组分为水，优先选择正己烷—正丁醇—水体系。

根据溶解度常数，在不破坏体系平衡的情况下，调节 A，B，C，三组分的体积比依次为：1—5：0.1—2：1—5。例如 2：1：2； 5：1：4； 20：8：20 等；上述体系上相为固定相，下相为流动相。且经一次分离得到石杉碱纯品，纯度在 99%以上。

实验条件适合温度 20—30℃，在上述温度范围内，温度较高时，出峰时间略有提前，分离效率变化不大，对峰形无多大影响。

主机转速和流速需控制在一定范围内，按体积比将溶剂体系置于分液漏斗中，摇匀静置分层。待平衡一定时间后，将上相和下相分开，采用 TBE-300A 高速逆流色谱仪，该机型柱体积为 300ml，进样圈为 20ml，配有 AKTA Prime 泵，监测器和记录仪。进样前，先用固定相存满整个柱子，调整主机转速为 600

—1000rpm，以 0.5—4mL/min 的流速将流动相泵入柱内。

由于石杉碱甲的不稳定性，分离和收集到的目标成分，马上馏分浓缩蒸干进行结晶得到单体。

本发明方法采用了高速逆流色谱分离技术，是一种连续的无需任何固体支持物的高效、快速的液液分配色谱分离技术，它克服了固态支持体或载体不可逆吸附、损耗和变性，使被分离物回收率高，理论达 100%，本发明实际达到 95%以上。又因为采用优选的溶剂体系，控制实验条件温度、调整主机转速和流速的工艺条件，可以高效率的分离，获得高纯度石杉碱甲单体（达到 99%以上）。本发明方法适合从各种工艺途径制备的不同含量石杉碱甲粗品中分离制备高纯度的石杉碱甲单体。使用于用各种型号的逆流色谱仪分离制备石杉碱甲单体，能直接进大量粗提样品或合成混合物，分离结果能达到相当高的纯度，保证较高峰型分辨率，分离量大、回收率高、分离环境缓和，节约溶剂，操作简便。

## 具体实施方式

### 实施例 1

选取正己烷—正丁醇—水体系在半制备型逆流色谱仪上来分离纯化石杉碱甲。先按 5: 1: 5 体积比将上述溶剂组分配置于分液漏斗中，摇匀后静置分层。待平衡一段时间后，将上相和下相分开。采用半制备型逆流色谱仪，配有聚四氟乙烯柱，20ml 进样阀，柱容积为 200ml，AKTA Prime 泵、检测器和记录仪。称取 200mg 石杉碱甲粗样溶解于 20ml 固定相中待用。进样前，先用固定相充满整个柱子，调整主机转速为 950rpm，以 3.0ml/min 的流速将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；然后根据检测器紫外图谱，接收目标成分。得到石杉碱甲馏份，浓缩蒸干后进行结晶，其 HPLC 纯度达到 99%左右。

### 实施例 2

选取正己烷-甲醇-水体系在半制备型逆流色谱仪上来分离纯化石杉碱甲。实验条件适合温度 25℃，先按 2: 1: 4 体积比将上述溶剂组分配置于分液漏斗中，摇匀后静置分层。待平衡一段时间后，将上相和下相分开。采用半制备型逆流

色谱仪，配有聚四氟乙烯柱，20ml 进样阀，柱容积为 200ml，AKTA Prime 泵、检测器和记录仪。称取 150mg 石杉碱甲粗样溶解于 20ml 固定相中待用。进样前，先用固定相存满整个柱子，调整主机转速为 750rpm，以 4.0ml/min 的流速将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；然后根据检测器紫外图谱，接收目标成分。得到石杉碱甲馏份，浓缩蒸干后进行结晶，其 HPLC 纯度达到 99% 左右。

### 实施例 3

选取正己烷-乙醇-水体系在半制备型逆流色谱仪上来分离纯化石杉碱甲。实验条件适合温度 30℃，先按 2: 1: 4 体积比将上述溶剂组分配置于分液漏斗中，摇匀后静置分层。待平衡一段时间后，将上相和下相分开。采用半制备型逆流色谱仪，配有聚四氟乙烯柱，20ml 进样阀，柱容积为 200ml，AKTA Prime 泵、检测器和记录仪。称取 150mg 石杉碱甲粗样溶解于 20ml 固定相中待用。进样前，先用固定相存满整个柱子，调整主机转速为 750rpm，以 4.0ml/min 的流速将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；然后根据检测器紫外图谱，接收目标成分。得到石杉碱甲馏份，浓缩蒸干后进行结晶，其 HPLC 纯度达到 99% 左右。

### 实施例 4

选取正庚烷-丙酮-水体系在半制备型逆流色谱仪上来分离纯化石杉碱甲。实验条件适合温度 22℃，先按 4: 1: 3 体积比将上述溶剂组分配置于分液漏斗中，摇匀后静置分层。待平衡一段时间后，将上相和下相分开。采用半制备型逆流色谱仪，配有聚四氟乙烯柱，20ml 进样阀，柱容积为 200ml，AKTA Prime 泵、检测器和记录仪。称取 150mg 石杉碱甲粗样溶解于 20ml 固定相中待用。进样前，先用固定相存满整个柱子，调整主机转速为 650rpm，以 3.0ml/min 的流速将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；然后根据检测器紫外图谱，接收目标成分。得到石杉碱甲馏份，浓缩蒸干后进行结晶，其 HPLC 纯度达到 99% 左右。

### 实施例 5

选取正戊烷-甲醇-水体系在半制备型逆流色谱仪上来分离纯化石杉碱甲。实

验条件适合温度 20℃，先按 2: 1: 1 体积比将上述溶剂组分配置于分液漏斗中，摇匀后静置分层。待平衡一段时间后，将上相和下相分开。采用半制备型逆流色谱仪，配有聚四氟乙烯柱，20ml 进样阀，柱容积为 200ml，AKTA Prime 泵、检测器和记录仪。称取 180mg 石杉碱甲粗样溶解于 20ml 固定相中待用。进样前，先用固定相存满整个柱子，调整主机转速为 1000rpm，以 3.0ml/min 的流速将流动相泵入柱内；待整个体系建立动态平衡后，由进样阀进样；然后根据检测器紫外图谱，接收目标成分。得到石杉碱甲馏份，浓缩蒸干后进行结晶，其 HPLC 纯度达到 99%左右。