



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111537654 B

(45) 授权公告日 2020. 11. 10

(21) 申请号 202010643069.1

(22) 申请日 2020.07.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111537654 A

(43) 申请公布日 2020.08.14

(73) 专利权人 上海亚盛医药科技有限公司
地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试
验区芳春路400号1幢3层

专利权人 苏州亚盛药业有限公司
亚盛医药集团(香港)有限公司

(72) 发明人 张现新 倪友凤 孙智鹏 陈明圆
张小妮

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
代理人 王卫彬 蔡立丰

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

审查员 陈慧慧

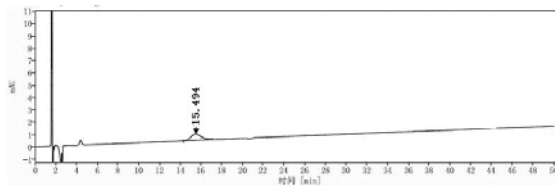
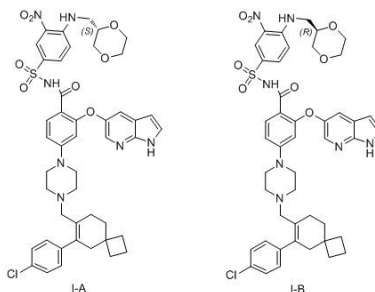
权利要求书5页 说明书17页 附图9页

(54) 发明名称

N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺化合物的HPLC分
析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺化合物的HPLC分析方法。本发明涉及一种物质X的HPLC分析方法;所述的物质X为如式I-A和/或I-B所示化合物;所述的HPLC分析方法包括以下步骤:手性色谱柱中,用流动相对物质X进行洗脱,即可;所述的手性色谱柱为多糖衍生物耐溶剂型手性色谱柱;所述的手性色谱柱的柱温为25-35℃;所述的洗脱为等度洗脱;所述的流动相包括烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂,按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为600-800份,所述的醇类溶剂为50-350份,所述的卤代烃类溶剂为30-100份,所述的醚类溶剂为50-200份。本发明的分析方法能够分离异构体,并能够准确测定异构体的纯度。



- 和/或,按体积份数计,所述的醇类溶剂为60-110份;
- 和/或,按体积份数计,所述的卤代烃类溶剂为40-60份或70-90份;
- 和/或,按体积份数计,所述的醚类溶剂为140-160份;
- 和/或,所述的手性色谱柱为Daicel Chiralpak IC手性色谱柱;
- 和/或,所述HPLC分析方法的检测波长为265 nm、282 nm或287 nm。
- 4.如权利要求3所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,
- 所述的醇类溶剂为异丙醇;
- 和/或,按体积份数计,所述的醇类溶剂为60-80份或90-110份;
- 和/或,所述的手性色谱柱为Daicel Chiralpak IC 250 mm×4.6 mm, 5.0 μm;
- 和/或,所述的流动相包括羧酸类溶剂;
- 和/或,所述的流动相包括有机胺。
- 5.如权利要求4所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,
- 当所述的流动相包括羧酸类溶剂时,所述的羧酸类溶剂为醋酸;
- 和/或,当所述的流动相包括羧酸类溶剂时,按体积份数计,所述的羧酸类溶剂为0.5-2.5份;
- 和/或,当所述的流动相包括有机胺时,所述的有机胺为二乙胺和/或三乙胺;
- 和/或,当所述的流动相包括有机胺时,按体积份数计,所述的有机胺为0.1-4份。
- 6.如权利要求5所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,
- 当所述的流动相包括羧酸类溶剂时,按体积份数计,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份;
- 和/或,当所述的流动相包括有机胺时,所述的有机胺为二乙胺;
- 和/或,当所述的流动相包括有机胺时,按体积份数计,所述的有机胺为0.1-2.5份。
- 7.如权利要求6所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,
- 当所述的流动相包括有机胺时,按体积份数计,所述的有机胺为0.1-1.5份。
- 8.如权利要求7所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,
- 当所述的流动相包括有机胺时,按体积份数计,所述的有机胺为0.1-0.3份。
- 9.如权利要求1-8中任一项所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,所述的流动相为以下任一方案;
- 方案1:
- 所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成;
- 方案2:
- 所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-300份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为70-160份;
- 方案3:
- 所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-110份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为140-160份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;
- 方案4:

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为600-800份，所述的醇类溶剂为50-350份，所述的卤代烃类溶剂为30-100份，所述的醚类溶剂为50-200份，所述的羧酸类溶剂为0.5-2.5份；

方案5：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为650-750份，所述的醇类溶剂为60-300份，所述的卤代烃类溶剂为40-90份，所述的醚类溶剂为70-160份，所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份；

方案6：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为650-750份，所述的醇类溶剂为60-80份，所述的卤代烃类溶剂为70-90份，所述的醚类溶剂为140-160份，所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份；所述的烷烃类溶剂为正己烷，所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇，所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷，所述的醚类溶剂为四氢呋喃，所述的羧酸类溶剂为醋酸；

方案7：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为600-800份，所述的醇类溶剂为50-350份，所述的卤代烃类溶剂为30-100份，所述的醚类溶剂为50-200份，所述的有机胺为0.1-4份；

方案8：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为650-750份，所述的醇类溶剂为60-300份，所述的卤代烃类溶剂为40-90份，所述的醚类溶剂为70-160份，所述的有机胺为0.1-2.5份；所述的烷烃类溶剂为正己烷，所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇，所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷，所述的醚类溶剂为四氢呋喃，所述的有机胺为二乙胺和/或三乙胺；

方案9：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为650-750份，所述的醇类溶剂为90-110份，所述的卤代烃类溶剂为40-60份，所述的醚类溶剂为140-160份，所述的有机胺为0.1-1.5份；所述的烷烃类溶剂为正己烷，所述的醇类溶剂为异丙醇，所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷，所述的醚类溶剂为四氢呋喃；所述的有机胺为二乙胺；

方案10：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为600-800份，所述的醇类溶剂为50-350份，所述的卤代烃类溶剂为30-100份，所述的醚类溶剂为50-200份，所述的羧酸类溶剂为0.5-2.5份，所述的有机胺为0.1-4份；

方案11：

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成；按体积份数计，所述的烷烃类溶剂为650-750份，所述的醇类溶剂为60-300份，所述的卤代烃类溶剂为40-90份，所述的醚类溶剂为70-160份，所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份，所述的有机胺为0.1-2.5份；

方案12:

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-80份,所述的卤代烃类溶剂为70-90份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份,所述的有机胺为0.1-1.5份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;所述的羧酸类溶剂为醋酸,所述的有机胺为二乙胺和/或三乙胺;

方案13:

所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-80份,所述的卤代烃类溶剂为70-90份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份,所述的有机胺为0.1-0.3份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;所述的羧酸类溶剂为醋酸,所述的有机胺为二乙胺。

10. 如权利要求9所述的物质X的HPLC分析方法,其特征在于,所述的流动相为以下任一组成;

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷00份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇130份、二氯甲烷50份、四氢呋喃120份、二乙胺1份、三乙胺1份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份、二乙胺1份、三乙胺1份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇150份、异丙醇150份、二氯甲烷50份、四氢呋喃80份、二乙胺1份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份、二乙胺1份;

或者,

所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇130份、二氯甲烷50份、四氢呋喃120份、二乙胺2份;

或者，

所述的流动相由下述组分组成；按体积份数计，正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份、二乙胺0.2份；

或者，

所述的流动相由下述组分组成；按体积份数计，正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份醋酸1份、二乙胺0.5份；

或者，

所述的流动相由下述组分组成；按体积份数计，正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份、二乙胺1份。

11. 如权利要求1所述的物质X的HPLC分析方法，其特征在于，所述的物质X以溶液的形式添加到所述的手性色谱柱上，所述的物质X的溶液的制备方法为方法一或方法二：

方法一：将物质X溶于溶剂，即可；

方法二：提取含物质X的制剂，即可。

12. 如权利要求11所述的物质X的HPLC分析方法，其特征在于，

所述的溶液中的溶剂与所述的流动相相同，或为卤代烃类溶剂和所述的流动相的混合溶剂；

和/或，所述的物质X的溶液的进样体积为1-30 μL 。

13. 如权利要求12所述的物质X的HPLC分析方法，其特征在于，

当所述的溶液中的溶剂为卤代烃类溶剂和所述的流动相的混合溶剂时，所述的卤代烃类溶剂和所述的流动相的体积比为0.5:1-2:1；

和/或，当所述的溶液中的溶剂为卤代烃类溶剂和所述的流动相的混合溶剂时，所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷；

和/或，所述的物质X的溶液的进样体积为10-20 μL 。

N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺化合物的HPLC分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物分析技术领域,具体而言,涉及N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺化合物的HPLC分析方法。

背景技术

[0002] 细胞凋亡是程序性细胞死亡的过程,是组织稳态的必需生物学过程。在哺乳动物中,它已被证明可以调节早期胚胎发育。在生命的晚期,细胞死亡是一种默认机制,通过该机制除去潜在危险细胞,例如携带癌症缺陷的细胞。已知若干种凋亡途径。最重要的凋亡途径之一涉及Bcl-2蛋白家族,其是细胞凋亡的线粒体(也称为“内在”)途径的关键调节剂。参见Danial和Korsmeyer,Cell 776:205-219(2004)。结构同源结构域BH1、BH2、BH3和BH4是Bcl-2家族蛋白的特征。Bcl-2蛋白质家族可以进一步分为三个亚族,这取决于每种蛋白质含有多少同源结构域及其生物活性,即它是否具有促凋亡或抗细胞凋亡功能。

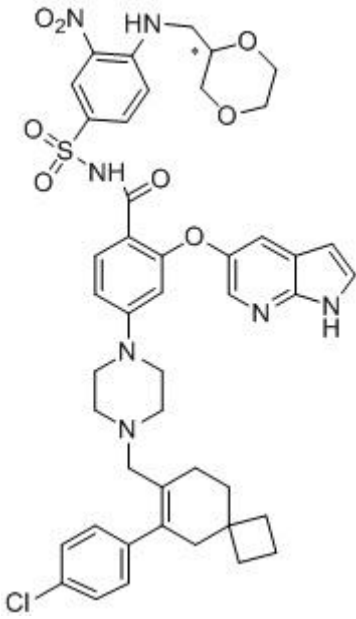
[0003] Bcl-2蛋白的第一亚组含有具有全部四个同源结构域的蛋白质,即BH1、BH2、BH3和BH4。它们的一般作用是抗细胞凋亡,即保护细胞免于开始细胞死亡过程。诸如Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xL、Mcl-1和Bfl-1/A1的蛋白质是该第一亚组的成员。属于Bcl-2蛋白的第二亚组的蛋白质含有三个同源结构域BH1、BH2和BH3,并具有促凋亡作用。第二个亚组的两个主要代表性蛋白质是Bax和Bak。Bcl-2蛋白的第三个亚组由仅含有BH3结构域的蛋白质组成,该亚组的成员通常被称为“仅BH3蛋白质”。它们对细胞的生物学作用是促细胞凋亡的。Bim、Bid、Bad、Bik、Noxa、Hrk、Bmf和Puma是第三个蛋白质亚家族的例子。

[0004] 失调的凋亡途径涉及许多重要疾病的病理学,例如神经变性病症(上调的细胞凋亡),例如阿尔茨海默氏病;和增殖性疾病(下调的细胞凋亡),例如癌症、自身免疫疾病和促血栓形成病症。

[0005] 下调的细胞凋亡(更具体地,Bcl-2蛋白质家族)可能参与癌性恶性肿瘤的发作。研究表明,例如,抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xL在许多癌细胞类型中过表达。参见Zhang,Nature Reviews Drug Discovery 1:101(2002);Kirkin等,Biochimica et Biophysica Acta 1644:229-249(2004);和Amundson等,Cancer Research 60:6101-6110(2000)。这种失调的作用是改变细胞的存活,否则细胞会在正常条件下发生细胞凋亡。与不受调节的增殖相关的这些缺陷的重复被认为是癌症进化的起点。这些发现使得用于靶向癌症的药物发现成为可能的策略。

[0006] W02018/027097A1公开了用于治疗对Bcl-2蛋白抑制有反应的疾病、障碍或病症(例如癌症)的N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺及相关化合物,并具体公开了代表性化合物:N-((4-(((1,4-二噁烷-2-基)甲基)氨基)-3-硝基苯基)磺酰基)-2-((1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基)氧基)-4-(4-((6-(4-氯苯基)螺[3.5]壬-6-烯-7-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰胺(下称式1化合物),其结构式如下:

[0007]



[0008] 式I化合物

[0009] 该化合物在苯胺处含有一个手性中心,含有一对有效对映体。药物一般是通过与靶点之间的识别和匹配发挥药理活性,在许多情况下,手性化合物的一对对映体在生物体内的药理活性、代谢过程、代谢速率及毒性等存在显著的差异。另外在吸收、分布和排泄等方面也存在差异,还有对映体之间也有可能相互转化。从已知药效方面考虑,可能存在四种不同的情况:

[0010] 1) 只有一种对映体具有所要求的药理活性,而另一种对映体没有药理作用,例如: β -受体阻断剂普萘洛尔(propranolol)的两个对映异构体的体外活性相差98倍,非甾体抗炎药萘普生(naproxen)的(S)-构型对映体的活性比其对映体的活性强35倍。又如天然的尼古丁(nicotine)的毒性要比其非天然的对映体的毒性大得多。

[0011] 2) 一对对映体中的两个化合物都有同等的或近乎同等的药理活性;

[0012] 3) 两种对映体具有不同的药理活性;

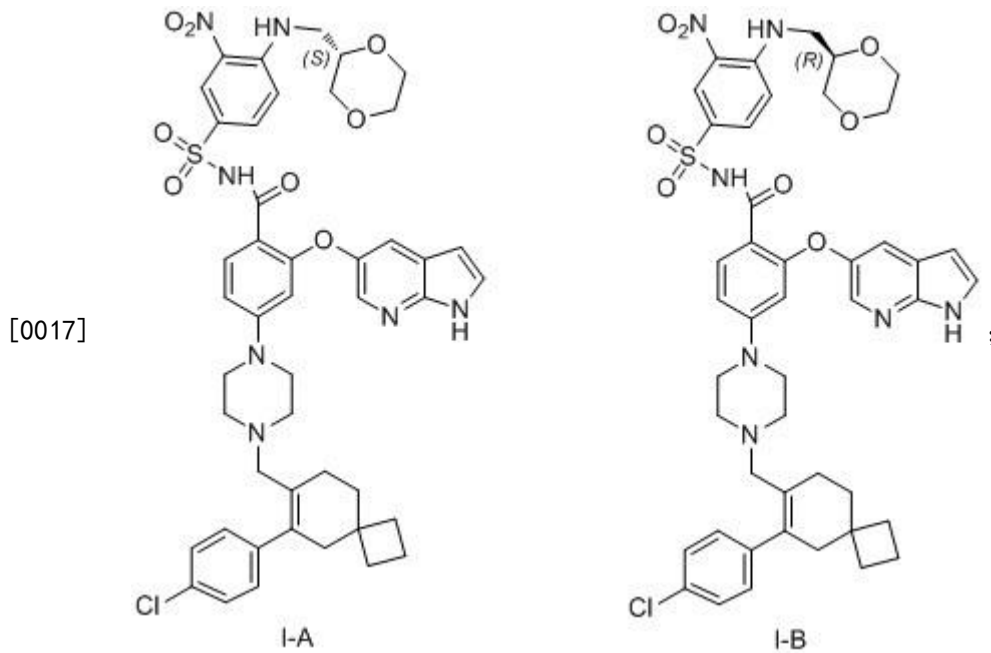
[0013] 4) 各对映体药理活性相同但不相等。

[0014] 为了保证式I化合物的研发和生产质量,需要对原料药及其制剂的质量进行控制。因此,研究获得一种式I化合物的异构体检查和含量测定的检测方法,对控制药品生产质量具有重要意义。

发明内容

[0015] 本发明的目的在于克服现有技术中缺少式I化合物的分离检测技术,而提供N-(苯基磺酰基)苯甲酰胺化合物的HPLC分析方法,该方法能够分离异构体,并能够准确测定异构体的纯度。

[0016] 本发明提供了一种物质X的HPLC分析方法;所述的物质X为如式I-A和/或I-B所示化合物;



[0018] 所述的HPLC分析方法包括以下步骤:手性色谱柱中,用流动相对物质X进行洗脱,即可;所述的手性色谱柱为多糖衍生物耐溶剂型手性色谱柱;所述的手性色谱柱的柱温为25-35℃;所述的洗脱为等度洗脱;所述的洗脱的流速为0.5-3 ml/min;所述HPLC分析方法的检测波长为200-300 nm;

[0019] 所述的流动相包括烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂,

[0020] 按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为600-800份,所述的醇类溶剂为50-350份,所述的卤代烃类溶剂为30-100份,所述的醚类溶剂为50-200份。

[0021] 在本发明某些实施方案中,所述的烷烃类溶剂可为本领域常规的烷烃类溶剂,又可为C₅-C₁₀烷烃类溶剂,例如正己烷。

[0022] 在本发明某些实施方案中,所述的醇类溶剂可为本领域常规的醇类溶剂,又可为C₁-C₃醇类溶剂,例如乙醇和/或异丙醇,优选异丙醇。

[0023] 在本发明某些实施方案中,所述的卤代烃类溶剂可为本领域常规的卤代烃类溶剂,例如二氯甲烷。

[0024] 在本发明某些实施方案中,所述的醚类溶剂可为本领域常规的醚类溶剂,例如四氢呋喃。

[0025] 在本发明某些实施方案中,按体积份数计,所述的烷烃类溶剂可为650-750份,例如700份。

[0026] 在本发明某些实施方案中,按体积份数计,所述的醇类溶剂可为60-300份,例如70份、100份、130份或300份,优选60-110份,例如60-80份或90-110份。

[0027] 在本发明某些实施方案中,按体积份数计,所述的卤代烃类溶剂可为40-90份,例如50份或80份,优选40-60份或70-90份。

[0028] 在本发明某些实施方案中,按体积份数计,所述的醚类溶剂可为70-160份,例如80份、120份或150份,优选140-160份。

[0029] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相还可进一步包括羧酸类溶剂。所述的羧酸类溶剂可为醋酸。按体积份数计,所述的羧酸类溶剂可为0.5-2.5份,又可为0.5-1.5份,

例如1份。

[0030] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相还可进一步包括有机胺。所述的有机胺可为二乙胺和/或三乙胺,优选二乙胺。按体积份数计,所述的有机胺可为0.1-4份,又可为0.1-2.5份,例如0.2份、0.5份、1份和2份,优选0.1-1.5份,又可为0.1-0.3份。当所述的有机胺为二乙胺和三乙胺时,所述的二乙胺和三乙胺的体积比可为1:0.5-1:1.5,例如1:1。

[0031] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成。

[0032] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-300份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为70-160份。

[0033] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂和醚类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-110份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为140-160份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃。

[0034] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份。

[0035] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份。

[0036] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为600-800份,所述的醇类溶剂为50-350份,所述的卤代烃类溶剂为30-100份,所述的醚类溶剂为50-200份,所述的羧酸类溶剂为0.5-2.5份。

[0037] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-300份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为70-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份。

[0038] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和羧酸类溶剂组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-80份,所述的卤代烃类溶剂为70-90份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃,所述的羧酸类溶剂为醋酸。

[0039] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷00份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份。

[0040] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为600-800份,所述的醇类溶剂为50-350份,所述的卤代烃类溶剂为30-100份,所述的醚类溶剂为50-200份,所述的有机胺为0.1-4份。

[0041] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-300份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为70-160份,所述的有机胺为0.1-2.5份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃,所述的有机胺为二乙胺和/或三乙胺。

[0042] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为90-110份,所述的卤代烃类溶剂为40-60份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的有机胺为0.1-1.5份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;所述的有机胺为二乙胺。

[0043] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇130份、二氯甲烷50份、四氢呋喃120份、二乙胺1份、三乙胺1份。

[0044] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份、二乙胺1份、三乙胺1份。

[0045] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇150份、异丙醇150份、二氯甲烷50份、四氢呋喃80份、二乙胺1份。

[0046] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇100份、二氯甲烷50份、四氢呋喃150份、二乙胺1份。

[0047] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、乙醇130份、二氯甲烷50份、四氢呋喃120份、二乙胺2份。

[0048] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为600-800份,所述的醇类溶剂为50-350份,所述的卤代烃类溶剂为30-100份,所述的醚类溶剂为50-200份,所述的羧酸类溶剂为0.5-2.5份,所述的有机胺为0.1-4份。

[0049] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-300份,所述的卤代烃类溶剂为40-90份,所述的醚类溶剂为70-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份,所述的有机胺为0.1-2.5份。

[0050] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-80份,所述的卤代烃类溶剂为70-90份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份,所述的有机胺为0.1-1.5份;所述的烷烃类溶剂为正己烷,所述的醇类溶剂为乙醇和/或异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;所述的羧酸类溶剂为醋酸,所述的有机胺为二乙胺和/或三乙胺。

[0051] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由烷烃类溶剂、醇类溶剂、卤代烃类溶剂、醚类溶剂、羧酸类溶剂和有机胺组成;按体积份数计,所述的烷烃类溶剂为650-750份,所述的醇类溶剂为60-80份,所述的卤代烃类溶剂为70-90份,所述的醚类溶剂为140-160份,所述的羧酸类溶剂为0.5-1.5份,所述的有机胺为0.1-0.3份;所述的烷烃类溶剂为正己

烷,所述的醇类溶剂为异丙醇,所述的卤代烃类溶剂为二氯甲烷,所述的醚类溶剂为四氢呋喃;所述的羧酸类溶剂为醋酸,所述的有机胺为二乙胺。

[0052] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份、二乙胺0.2份。

[0053] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份醋酸1份、二乙胺0.5份。

[0054] 在本发明某些实施方案中,所述的流动相由下述组分组成;按体积份数计,正己烷700份、异丙醇70份、二氯甲烷80份、四氢呋喃150份、醋酸1份、二乙胺1份。

[0055] 在本发明某些实施方案中,所述的物质X可以以溶液的形式添加到所述的手性色谱柱上。所述的物质X的溶液的制备方法可为方法一或方法二:

[0056] 方法一:将物质X溶于溶剂,即可;

[0057] 方法二:提取含物质X的制剂,即可。

[0058] 所述的提取可通过本领域常规的手段进行提取。

[0059] 所述的溶液中的溶剂可与所述的流动相相同,或为卤代烃类溶剂和所述的流动相的混合溶剂,所述的卤代烃类溶剂和所述的流动相的体积比可为0.5:1-2:1,例如1:1。所述的卤代烃类溶剂可为二氯甲烷。

[0060] 在本发明某些实施方案中,所述的手性色谱柱可为多糖衍生物耐溶剂型手性色谱柱(其通过化学键合型结合的方式将多糖衍生物固定在硅胶上),又可为硅胶表面键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基甲酸酯)的糖衍生物耐溶剂型手性色谱柱,例如Daicel Chiralpak IC手性色谱柱,又例如Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0061] 在本发明某些实施方案中,所述的手性色谱柱的柱温可为本领域常规的柱温,又可为25-35℃,例如33℃。

[0062] 在本发明某些实施方案中,所述的物质X的溶液的进样体积可为本领域常规的进样体积,又可为1-30 μL,又可为10-20 μL。

[0063] 在本发明某些实施方案中,所述的洗脱可为等度洗脱。

[0064] 在本发明某些实施方案中,所述的洗脱的流速可为本领域常规的流速,又可为0.5-3 ml/min,又可为1-2 ml/min。

[0065] 在本发明某些实施方案中,所述HPLC分析方法的检测波长可为本领域常规的检测波长,又可为200-300 nm,又可为260-290 nm,例如265 nm、282 nm或287 nm。

[0066] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0067] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0068] 本发明的积极进步效果在于:本发明所提供的式I化合物的HPLC分析方法具有使用可靠,稳定性较好,数据重现性强的优点,可以很好地将异构体分离,并能够准确测定异构体的纯度。

附图说明

[0069] 图1是实施例1中(R)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。

[0070] 图2是实施例1中(S)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。

- [0071] 图3是实施例1中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0072] 图4是实施例1中供试品溶液I的HPLC谱图。
- [0073] 图5是实施例2中(R)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0074] 图6是实施例2中(S)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0075] 图7是实施例2中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0076] 图8是实施例3中(R)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0077] 图9是实施例3中(S)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0078] 图10是实施例3中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0079] 图11是实施例3中供试品溶液的HPLC谱图。
- [0080] 图12是实施例4中(R)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0081] 图13是实施例4中(S)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0082] 图14是实施例4中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0083] 图15是实施例5中(R)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0084] 图16是实施例5中(S)-式I化合物定位溶液的HPLC谱图。
- [0085] 图17是实施例5中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0086] 图18是实施例6中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0087] 图19是实施例7中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0088] 图20是实施例8中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0089] 图21是实施例9中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0090] 图22是实施例10中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0091] 图23是实施例11中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0092] 图24是对比例1中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0093] 图25是对比例2中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0094] 图26是对比例3中式I化合物分离度溶液的HPLC谱图。
- [0095] 图27是实施例1供试品溶液II的HPLC谱图。

具体实施方式

[0096] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0097] 下述实施例中,(R)-式I化合物参照专利申请CN109311871A制得。(S)-式I化合物、式I化合物(R和S构型的混合物)参照(R)-式I化合物的制备方法进行制备,换用原料即可。本发明通过本领域常规的手段制得式I化合物的片剂。

[0098] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm),购买厂家:江苏明捷科学仪器有限公司;生产厂家:大赛璐(Daicel)。

[0099] 实施例1:式I化合物手性纯度的测定

[0100] 高效液相色谱条件:

[0101] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0102] 流动相体积配比:正己烷/异丙醇/二氯甲烷/四氢呋喃/醋酸/二乙胺=700/70/80/

150/1/0.2。

[0103] 检测波长:282nm。

[0104] 流速:2.0ml/min。

[0105] 柱温33℃。

[0106] 进样体积:20 μ l。

[0107] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积配比1:1。

[0108] 实验步骤

[0109] 溶液配制:取式I化合物约20mg,精密称定置于10ml量瓶中,加入5ml二氯甲烷,待样品完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液I;

[0110] 取式I化合物的片剂1片研磨成细粉,转移至10ml容量瓶中,加入5ml二氯甲烷,超声5min,用流动相稀释至刻度,经有机滤膜过滤,取滤液作为供试品溶液II;

[0111] 称量(S)-式I化合物对照品约20mg,置于100ml量瓶中,加入50 ml二氯甲烷,待完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,再从此溶液中精密量取1ml置于100ml量瓶中,加稀释剂至刻度,摇匀,作为(S)-式I化合物定位溶液;

[0112] 称量(R)-式I化合物对照品约20mg,置于100ml量瓶中,加50ml二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,再从此溶液中精密量取1ml置100ml量瓶中,加稀释剂至刻度,摇匀,作为(R)-式I化合物定位溶液;

[0113] 分别称量(S)-式I化合物对照品约20mg、(R)-式I化合物对照品约1mg置于同一10ml量瓶中,加5ml二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。

[0114] 精密量取(S)-式I化合物定位溶液、(R)-式I化合物定位溶液、分离度溶液、供试品溶液各20 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表1)。

[0115] 表1 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
(R)-式I化合物定位溶液	15.494	/	/
(S)-式I化合物定位溶液	/	19.450	/
分离度溶液	15.264	18.919	1.9
供试品溶液 I	15.339	18.869	1.8
供试品溶液 II	15.330	18.782	1.8

[0117] 根据表1及图1-图4、图27可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以得到有效分离,分离度为1.9,峰形良好,峰纯度良好,符合标准。

[0118] 本发明所提供的分析方法,根据中国药典2015版,完成方法学验证,验证系统适用性、专属性、灵敏度、线性和范围、精密度、准确度、重现性以及溶液稳定性实验。经过这些验证,本发明提供的分析方法使用可靠,稳定性较好。

[0119] 实施例2:式I化合物手性纯度的测定

[0120] 高效液相色谱条件:

- [0121] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。
- [0122] 流动相体积配比:二乙胺/三乙胺/四氢呋喃/乙醇/二氯甲烷/正己烷=1/1/120/130/50/700。
- [0123] 检测波长:287nm。
- [0124] 流速:1.0ml/min。
- [0125] 柱温:33℃。
- [0126] 进样体积:20μl。
- [0127] 稀释剂:组成同流动相。
- [0128] 实验步骤
- [0129] 溶液配制:取式I化合物约20mg,精密称定置于50ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;
- [0130] 取(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于50ml量瓶中,用稀释剂溶解后稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml溶液置20ml量瓶,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取1ml此溶液置20ml量瓶,用稀释液稀释至刻度,摇匀,作为(S)-式I化合物定位溶液;
- [0131] 取(R)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于50ml量瓶中,用稀释剂溶解后稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml溶液置20ml量瓶,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取1ml此溶液置20ml量瓶,用稀释液稀释至刻度,摇匀,作为(R)-式I化合物定位溶液;
- [0132] 取(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定,置50ml量瓶中,量取(R)-式I化合物定位溶液原液1ml,稀释剂溶解后,稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取(S)式I化合物定位溶液、(R)-式I化合物定位溶液、分离度溶液各20μl注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表2)。
- [0133] 表2 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
[0134] (R)-式I化合物定位溶液	36.792	/	/
(S)-式I化合物定位溶液	/	41.576	/
分离度溶液	36.801	40.539	1.0

- [0135] 根据表2及图5-图7可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以分离,分离度为1.0,峰纯度良好。
- [0136] 实施例3:式I化合物手性纯度的测定
- [0137] 高效液相色谱条件:
- [0138] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。
- [0139] 流动相体积配比:四氢呋喃/乙醇/二氯甲烷/正己烷=150/100/50/700。
- [0140] 检测波长:282nm。
- [0141] 流速:1.0ml/min。
- [0142] 柱温:33℃。
- [0143] 进样体积:10μl。

[0144] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积比为1:1。

[0145] 实验步骤

[0146] 溶液配制:取式I化合物约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml 二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0147] 取(S)-式I化合物对照品约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml 二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液1ml至50ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取此溶液1ml置20ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(S)-式I化合物定位溶液;

[0148] 取(R)-式I化合物对照品约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml DCM溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液1ml至50ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取此溶液1ml置20ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(R)-式I化合物定位溶液;

[0149] 取(S)-式I化合物约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,量取(R)-式I化合物定位溶液原液2ml,加10ml 二氯甲烷溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取(S)-式I化合物定位溶液、(R)-式I化合物定位溶液、分离度溶液、供试品溶液各10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表3)

[0150] 表3 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
[0151] (R)-式I化合物定位溶液	7.567	/	/
(S)-式I化合物定位溶液	/	9.992	/
分离度溶液	7.517	9.667	1.7
供试品溶液	7.550	9.908	1.7

[0152] 根据表3及图8-图11可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以得到有效分离,分离度为1.7,峰纯度良好,符合标准。

[0153] 实施例4:式I化合物手性纯度的测定

[0154] 高效液相色谱条件:

[0155] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。

[0156] 流动相体积配比:正己烷/异丙醇/二氯甲烷/四氢呋喃=700/70/80/150。

[0157] 检测波长:282nm。

[0158] 流速:2.0ml/min。

[0159] 柱温:33 $^{\circ}$ C。

[0160] 进样体积:10 μ l。

[0161] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积比为1:1。

[0162] 实验步骤

[0163] 溶液配制:取式I化合物约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,加入10ml二氯甲烷,待样品完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0164] 取(S)-式I化合物约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,加入10ml二氯甲烷,待样品完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液1ml至50ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取此溶液1ml置20ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(S)-式I化合物定位溶液;

[0165] 取(R)-式I化合物约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,加入10ml二氯甲烷,待样品完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液2ml至10ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(R)-式I化合物定位溶液;

[0166] 取(S)-式I化合物约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,量取(R)-式I化合物定位溶液原液0.5ml,加10ml二氯甲烷溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取(S)-式I化合物定位溶液、(R)-式I化合物定位溶液、分离度溶液各10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表4)

[0167] 表4 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
[0168] (R)-式I化合物定位溶液	11.333	/	/
(S)-式I化合物定位溶液	/	15.817	/
分离度溶液	12.033	15.767	1.8

[0169] 根据表4及图12-图14可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以分离,分离度为1.8,峰形良好,峰纯度良好,符合标准。

[0170] 实施例5:式I化合物手性纯度的测定

[0171] 高效液相色谱条件:

[0172] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。

[0173] 流动相体积配比:正己烷/异丙醇/二氯甲烷/四氢呋喃/醋酸=700/70/80/150/1。

[0174] 检测波长:282nm。

[0175] 流速:2.0ml/min。

[0176] 柱温33 $^{\circ}$ C。

[0177] 进样体积:20 μ l。

[0178] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积比为1:1。

[0179] 实验步骤

[0180] 溶液配制:取式I化合物约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml 二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0181] 取(S)-式I化合物对照品约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml 二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取溶液1ml至50ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精密量取此溶液1ml置20ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(S)-式I化合物定位溶液;

[0182] 取(R)-式I化合物对照品约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,用10ml二氯甲烷溶解后,用流动相稀释,摇匀,精密量取溶液1ml至50ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,再精

密量取此溶液1ml置20ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为(R)-式I化合物定位溶液;

[0183] 取(S)-式I化合物约30mg,精密称定置于20ml量瓶中,量取(R)-式I化合物定位溶液原液2ml,加10ml 二氯甲烷溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取(S)-式I化合物定位溶液、(R)-式I化合物定位溶液、分离度溶液各10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表5)。

[0184] 表5 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)式I化合物	
(S)-式I化合物定位溶液	/	15.777	/
(R)-式I化合物定位溶液	11.796	/	/
分离度溶液	11.728	15.024	2.1

[0185] 根据表5及图15-图17可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以得到有效分离,分离度为2.1,峰形良好,峰纯度良好,符合标准。

[0186] 实施例6:式I手性纯度的测定

[0187] 高效液相色谱条件:

[0188] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。

[0189] 流动相体积配比:正己烷/异丙醇/二氯甲烷/四氢呋喃/醋酸/二乙胺=700/70/80/150/1/1.0。

[0190] 检测波长:282nm。

[0191] 流速:2.0ml/min。

[0192] 柱温:33 $^{\circ}$ C。

[0193] 进样体积:20 μ l。

[0194] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积配比1:1。

[0195] 实验步骤

[0196] 溶液配制:取式I化合物约20mg,精密称定置于10ml量瓶中,加入5ml DCM,待样品完全溶解后,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0197] 分别称量(S)-式I化合物对照品约20mg、(R)-式I化合物对照品约1mg置同一10ml量瓶中,加5ml DCM溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取分离度溶液20 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表6)。

[0198] 表6 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	30.656	37.414	1.6

[0199] 根据表6及图18可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以得到有效分离,分离度为1.6,峰形良好,峰纯度良好,符合标准。

[0200] 实施例7:式I化合物手性纯度的测定

[0201] 高效液相色谱条件:

[0202] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0203] 流动相体积配比:正己烷/异丙醇/二氯甲烷/四氢呋喃/醋酸/二乙胺=700/70/80/150/1/0.5。

[0204] 检测波长:282nm。

[0205] 流速:2.0ml/min。

[0206] 柱温:33℃。

[0207] 进样体积:20μl。

[0208] 稀释剂:二氯甲烷与流动相体积配比1:1。

[0209] 实验步骤

[0210] 溶液配制:取式I化合物约20mg,精密称定置于10ml量瓶中,加入5ml 二氯甲烷,待样品完全溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0211] 分别称量(S)-式I化合物对照品约20mg、(R)-式I化合物对照品约1mg置同一10ml量瓶中,加5ml 二氯甲烷溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。精密量取分离度溶液20μl注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表7)。

[0212] 表7 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	23.839	29.683	1.8

[0213] 根据表7及图19可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以得到有效分离,分离度为1.8,峰形良好,峰纯度良好,符合标准。

[0214] 实施例8:式I化合物手性纯度的测定

[0215] 高效液相色谱条件:

[0216] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0217] 流动相体积配比:四氢呋喃/异丙醇/二氯甲烷/正己烷/二乙胺/三乙胺=150/100/50/700/1/1。

[0218] 检测波长:265nm。

[0219] 流速:1.0ml/min。

[0220] 柱温:33℃。

[0221] 进样体积:10μl。

[0222] 稀释剂:组成同流动性。

[0223] 实验步骤

[0224] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品约2mg和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,摇匀,作为分离度溶液。

[0225] 精密量取分离度溶液10μl注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表8)

[0226] 表8 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	41.832	46.453	1.1

[0227] 根据表8及图20可以看出, (R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以分离, 分离度为1.1。

[0228] 实施例9: 式I化合物手性纯度的测定

[0229] 高效液相色谱条件:

[0230] 色谱柱: Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0231] 流动相体积配比: 四氢呋喃/乙醇/异丙醇/二氯甲烷/正己烷/二乙胺=80/150/150/50/700/1。

[0232] 检测波长: 265nm。

[0233] 流速: 1.0ml/min。

[0234] 柱温: 33℃。

[0235] 进样体积: 10μl。

[0236] 稀释剂: 组成同流动性。

[0237] 实验步骤

[0238] 溶液配制: 分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg, 精密称定置于20ml量瓶中, 用稀释剂溶解后稀释至刻度, 摇匀, 作为分离度溶液。

[0239] 精密量取分离度溶液10μl注入液相色谱仪, 记录液相色谱图, 按照面积归一化法计算(参见表9)

[0240] 表9 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	40.033	45.842	1.3

[0241] 根据表9及图21可以看出, (R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以分离, 分离度为1.3。

[0242] 实施例10: 式I化合物手性纯度的测定

[0243] 高效液相色谱条件:

[0244] 色谱柱: Daicel Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

[0245] 流动相体积配比: 四氢呋喃/异丙醇/二氯甲烷/正己烷/二乙胺=150/100/50/700/1。

[0246] 检测波长: 265nm。

[0247] 流速: 1.0ml/min。

[0248] 柱温33℃。

[0249] 进样体积: 10μl。

[0250] 稀释剂: 组成同流动性。

[0251] 实验步骤

[0252] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,摇匀,作为分离度溶液。

[0253] 精密量取分离度溶液10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表10)

[0254] 表10 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	73.428	91.423	2.0

[0255] 根据表10及图22可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以很好的分离,分离度为2.0。

[0256] 实施例11:式I手性纯度的测定

[0257] 高效液相色谱条件:

[0258] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。

[0259] 流动相体积配比:四氢呋喃/乙醇/二氯甲烷/正己烷/二乙胺=120/130/50/700/2。

[0260] 检测波长:265nm。

[0261] 流速:1.0ml/min。

[0262] 柱温:33 $^{\circ}$ C。

[0263] 进样体积:10 μ l。

[0264] 稀释剂:组成同流动性。

[0265] 实验步骤

[0266] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,用稀释剂溶解后稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。

[0267] 精密量取分离度溶液10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表11)

[0268] 表11 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	40.182	45.870	1.5

[0269] 根据表11及图23可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物可以分离,分离度为1.5。

[0270] 对比例1:式I化合物手性纯度的测定

[0271] 流动相体积配比:乙醇/正己烷/二乙胺=300/700/1。

[0272] 检测波长:265nm。

[0273] 流速:1.0ml/min。

[0274] 柱温:33 $^{\circ}$ C。

- [0275] 进样体积:10 μ l。
- [0276] 稀释剂:组成同流动相。
- [0277] 实验步骤
- [0278] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,用稀释剂溶解后稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液。
- [0279] 精密量取分离度溶液10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算。
- [0280] 根据图24可以看出,(R)-式I化合物和(S)-式I化合物该条件下120min皆未出峰,该条件不合适。
- [0281] 对比例2:式I化合物手性纯度的测定
- [0282] 高效液相色谱条件:
- [0283] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。
- [0284] 流动相体积配比:正己烷/乙醇/二氯甲烷/二乙胺=600/200/200/1。
- [0285] 检测波长:265nm。
- [0286] 流速:1.0ml/min。
- [0287] 柱温:33 $^{\circ}$ C。
- [0288] 进样体积:20 μ l。
- [0289] 稀释剂:组成同流动相。
- [0290] 实验步骤
- [0291] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于50ml量瓶中,摇匀,作为分离度溶液。
- [0292] 精密量取分离度溶液20 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表12)
- [0293] 表12 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	27.705	29.680	N/A

- [0294] N/A表示已检测,由于分离度差而无法计算获得。
- [0295] 根据表12及图25可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物分离较差。
- [0296] 对比例3:式I化合物手性纯度的测定
- [0297] 高效液相色谱条件:
- [0298] 色谱柱:Daicel Chiralpak IC (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)。
- [0299] 流动相体积配比:四氢呋喃/乙醇/正己烷/二乙胺=80/250/650/1。
- [0300] 检测波长:265nm。
- [0301] 流速:1.0ml/min。
- [0302] 柱温:33 $^{\circ}$ C。
- [0303] 进样体积:10 μ l。
- [0304] 稀释剂:组成同流动相。

[0305] 实验步骤

[0306] 溶液配制:分别取(R)-式I化合物对照品和(S)-式I化合物对照品约20mg,精密称定置于20ml量瓶中,摇匀,作为分离度溶液。

[0307] 精密量取分离度溶液10 μ l注入液相色谱仪,记录液相色谱图,按照面积归一化法计算(参见表13)

[0308] 表13 系统适用性测试结果

名称	保留时间 (min)		分离度 (R)
	(R)-式I化合物	(S)-式I化合物	
分离度溶液	19.842	22.043	N/A

[0309] N/A表示已检测,由于分离度差而无法计算获得。

[0310] 根据表13及图26可以看出,(R)-式I化合物与(S)-式I化合物分离度较差。

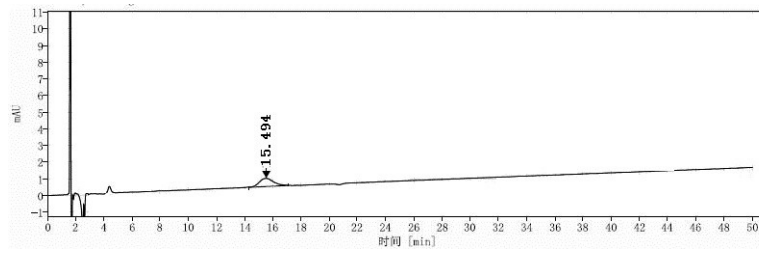


图1

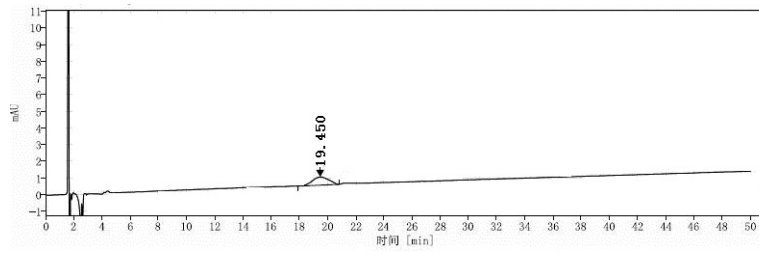


图2

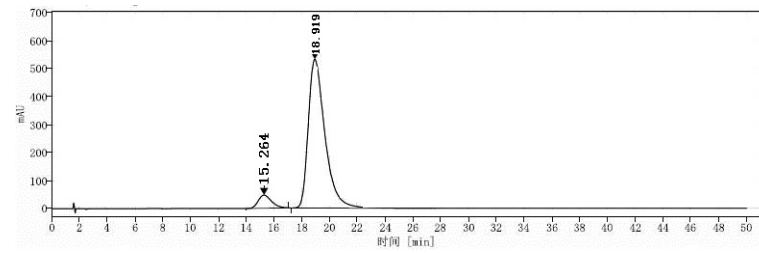


图3

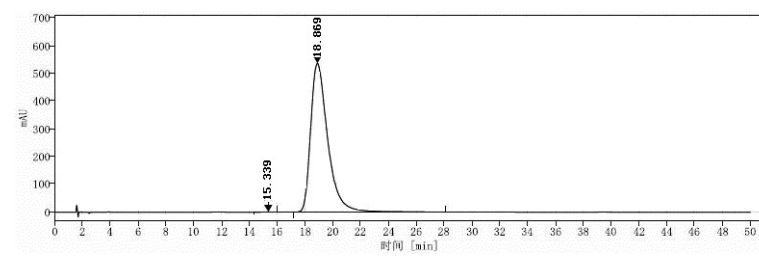


图4

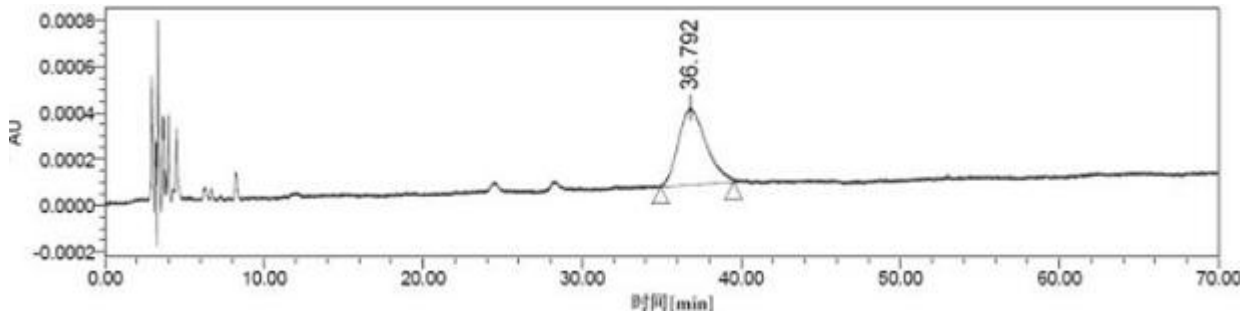


图5

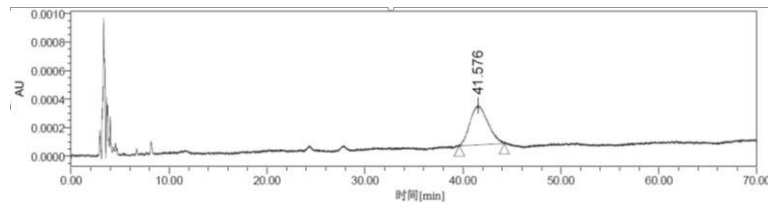


图6

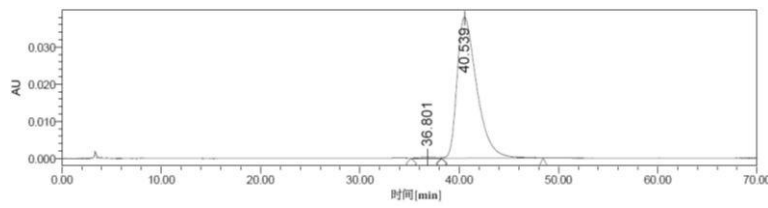


图7

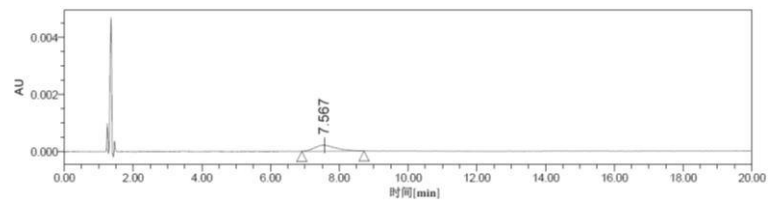


图8

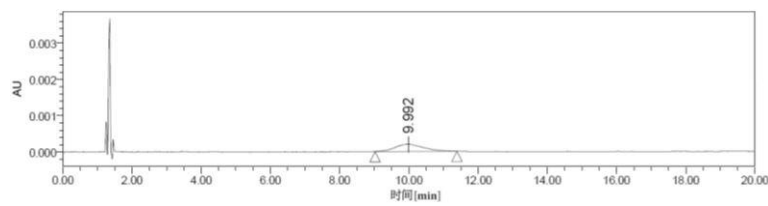


图9

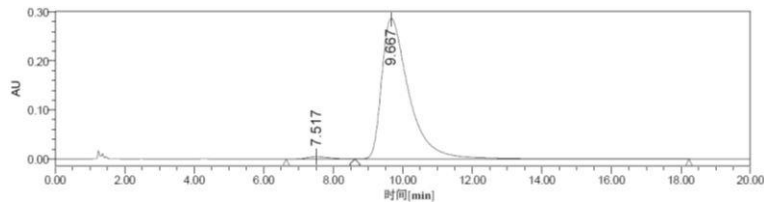


图10

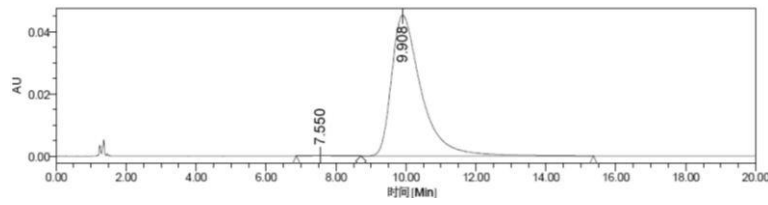


图11

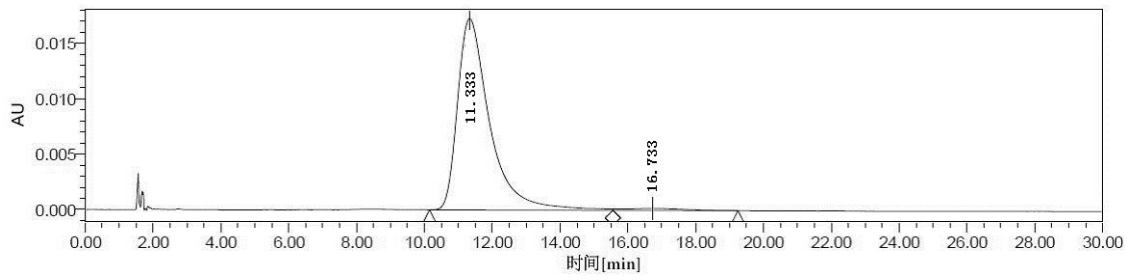


图12

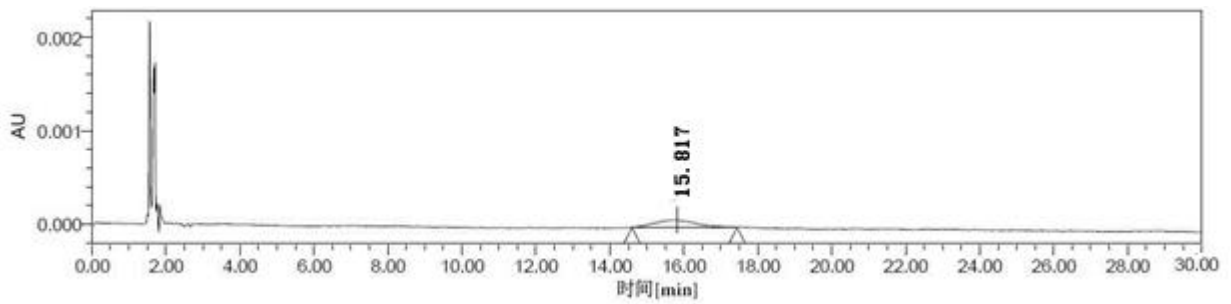


图13

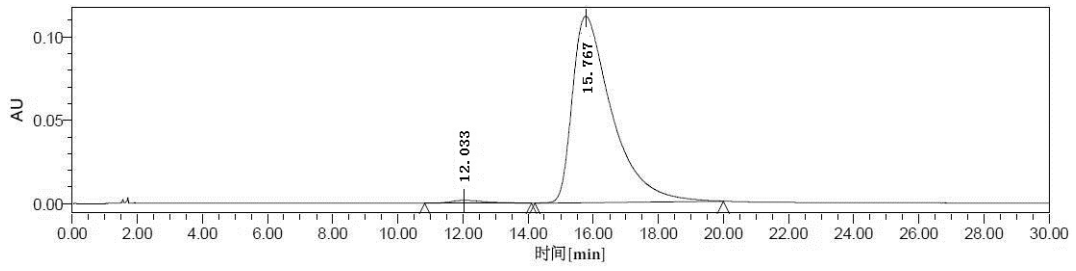


图14

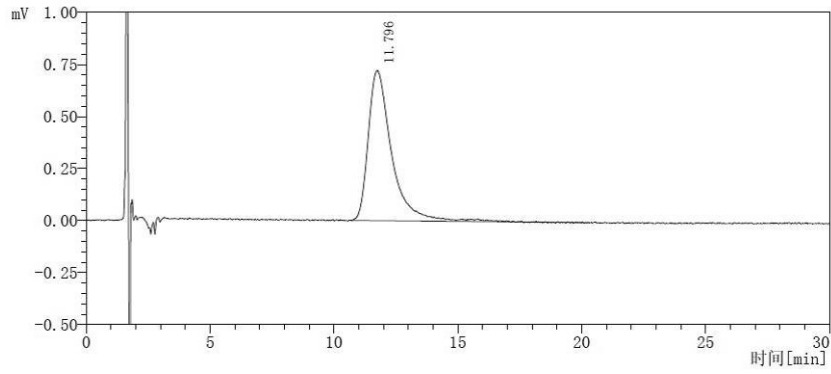


图15

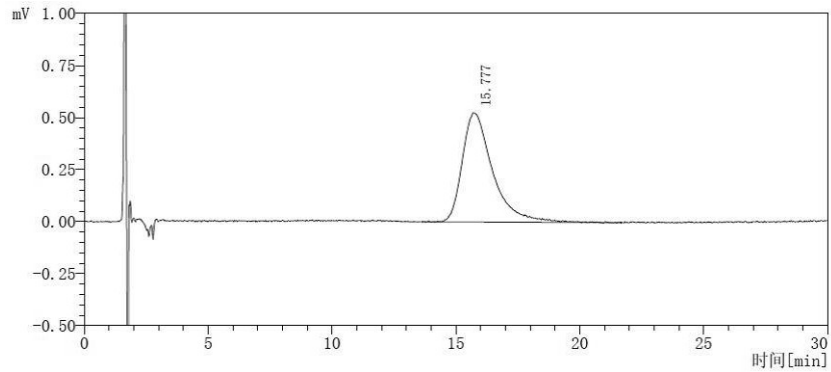


图16

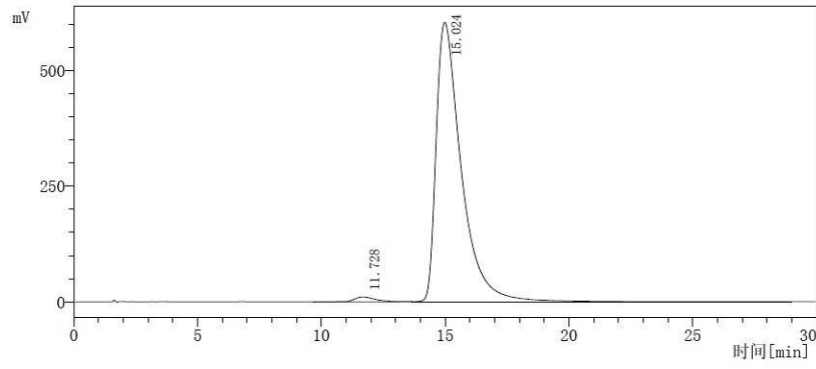


图17

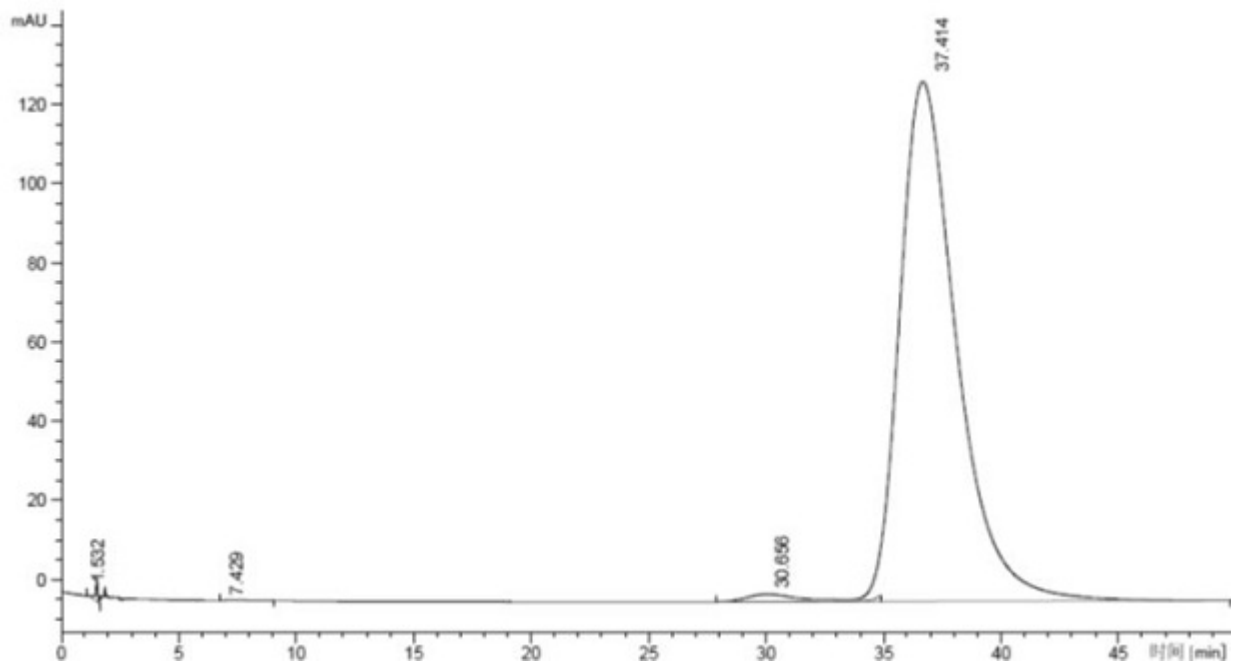


图18

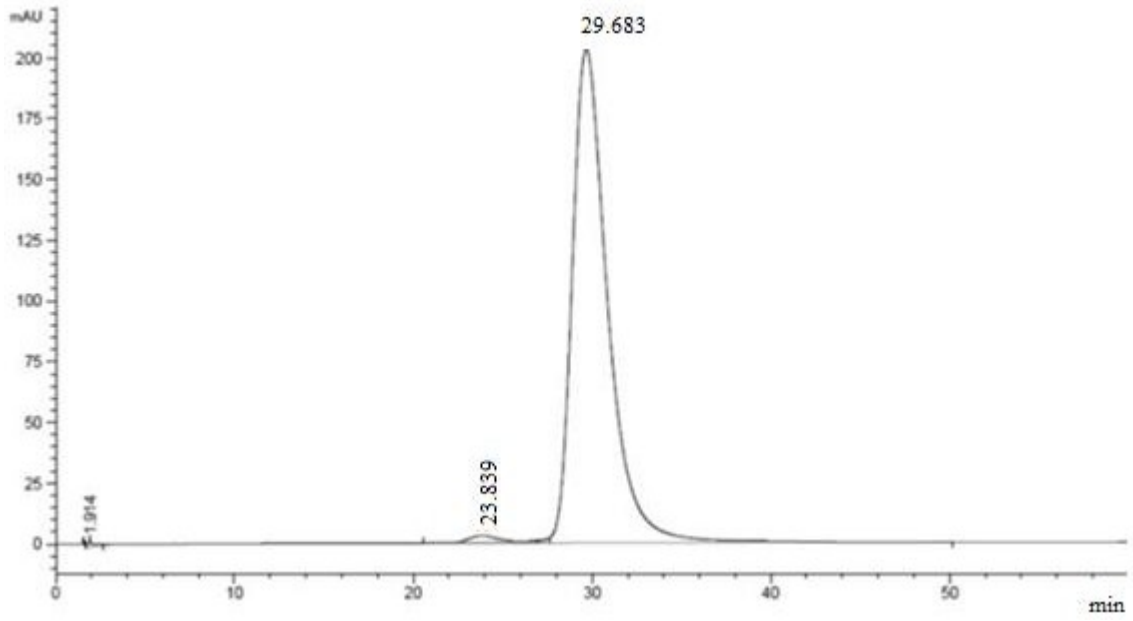


图19

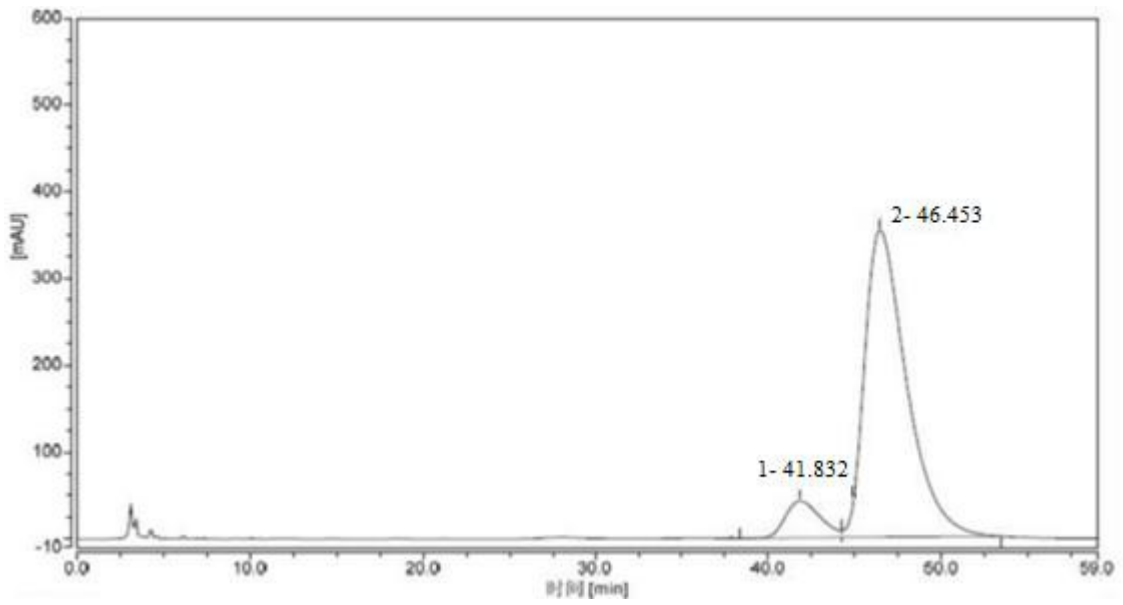


图20

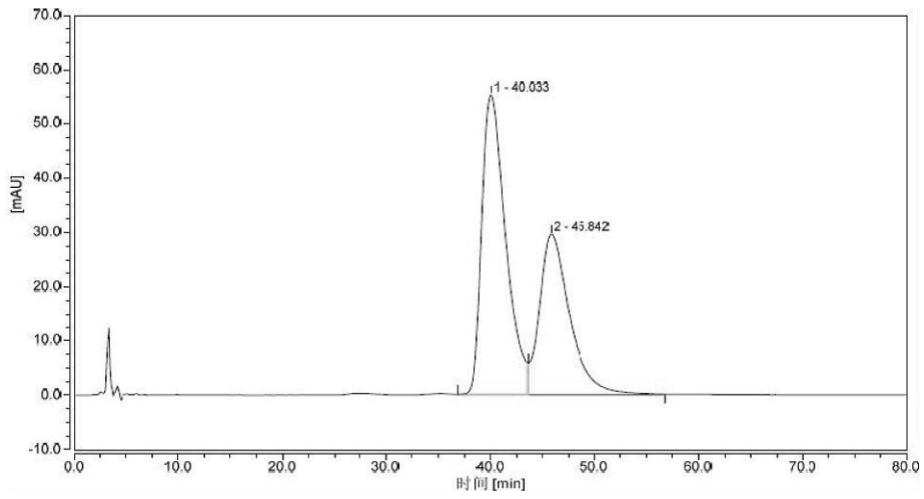


图21

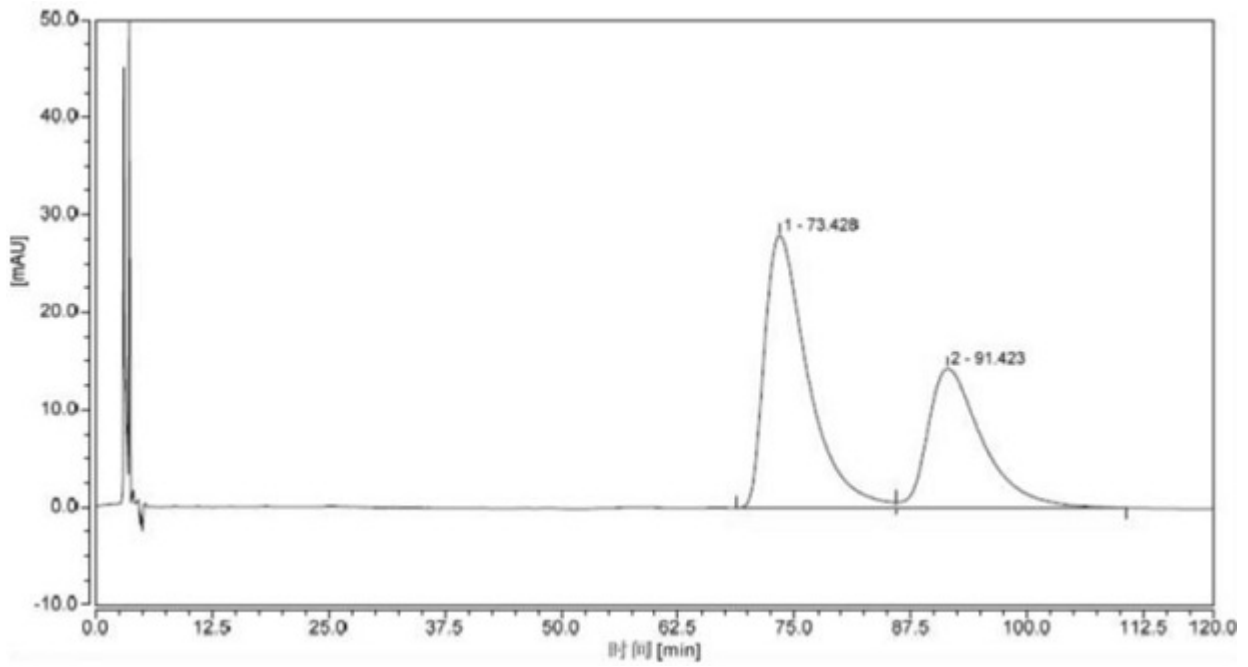


图22

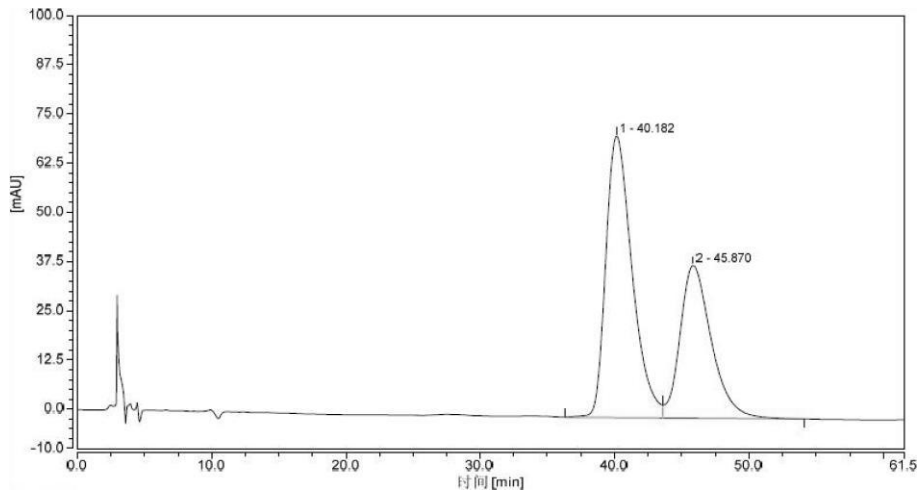


图23

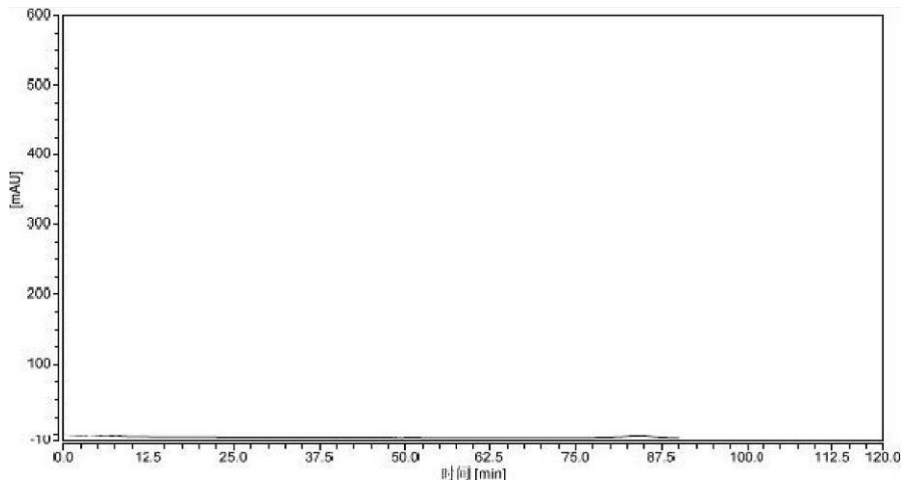


图24

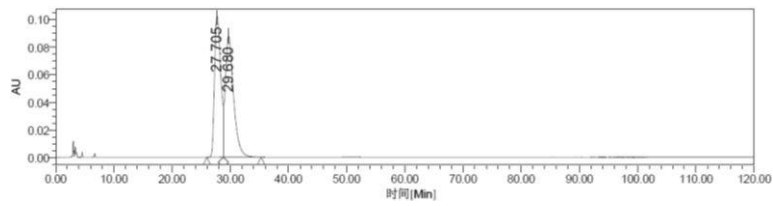


图25

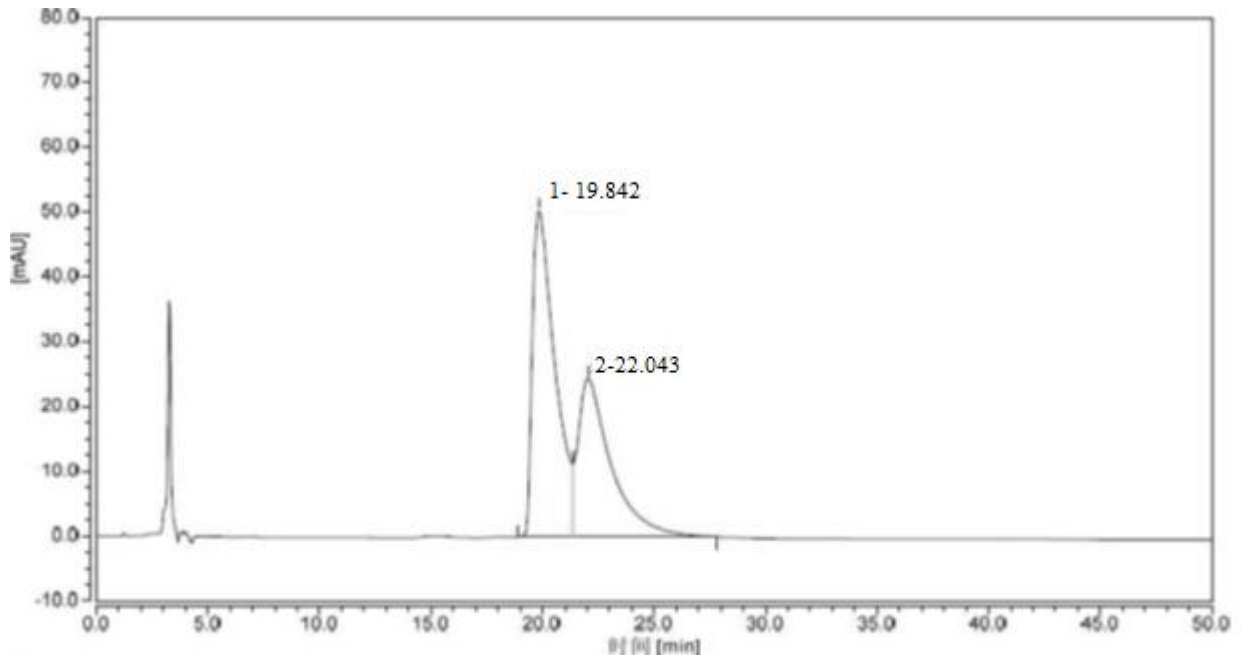


图26

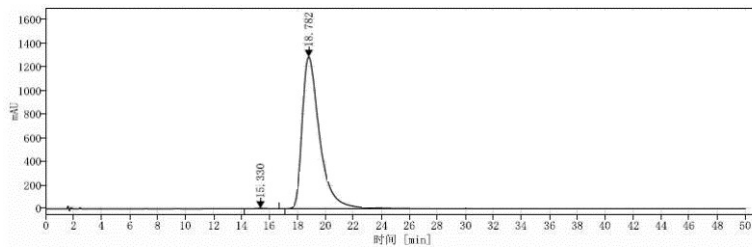


图27