



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105859721 B

(45)授权公告日 2018.04.17

(21)申请号 201510030091.8

CN 102656173 A,2012.09.05,

(22)申请日 2015.01.22

CN 103626774 A,2014.03.12,

CN 105481862 A,2016.04.13,

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105859721 A

Disclosed Anonymously. "A process for preparing (S)-1-(3-(4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one".《IP.com journal》.2014,第1-3页.

(43)申请公布日 2016.08.17

Disclosed Anonymously. "A process for preparing (S)-1-(3-(4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one".《IP.com journal》.2014,第1-3页.

(73)专利权人 浙江京新药业股份有限公司

地址 312500 浙江省绍兴市新昌县羽林街
道新昌大道800号

专利权人 上海京新生物医药有限公司

上虞京新药业有限公司

(72)发明人 徐苗焕

审查员 马冲

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 102656173 A,2012.09.05,

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种伊布鲁替尼的制备方法

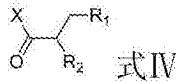
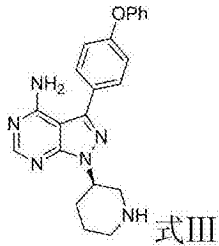
(57)摘要

本发明公开一种伊布鲁替尼的制备方法,包括用于制备伊布鲁替尼的中间体化合物,其具有式II的结构式,本发明还公开了该中间体的制备方法,包括将式III与酰氯衍生物反应,进一步通过反应得到伊布鲁替尼,本发明的方法制备得到的伊布鲁替尼杂质含量显著降低。

1. 一种由化合物式 II 制备伊布鲁替尼式 I 的方法, 其特征在于, 包括使式 II 化合物在碱性条件下, 反应形成伊布鲁替尼式 I; 所述式 II 化合物为 1-[(3R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]-2-氯-丙-1-酮, 或者 1-[(3R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]-2-溴-丙-1-酮。

2. 权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的碱是无机碱或有机碱; 所述无机碱包括氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯中的一种或者几种; 所述有机碱包括三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯中的一种或者几种。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述式 II 由下述方法制得:



将式 III 与式 IV 经反应得到式 II;

其中, 式 IV 为 2-氯丙酰氯或 2-溴丙酰溴。

4. 权利要求 3 的制备方法, 其特征在于, 所述反应在无碱的条件下反应。

5. 权利要求 3 的制备方法, 其特征在于, 所述的反应在有机碱或无机碱的条件下反应。

6. 权利要求 5 的制备方法, 其特征在于, 所述的无机碱包括氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯中的一种或者几种; 所述有机碱包括三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯中的一种或者几种。

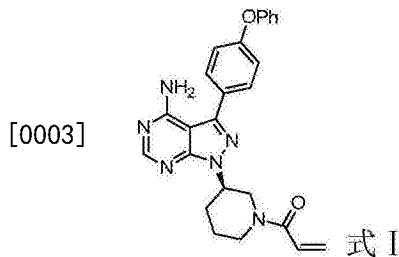
一种伊布鲁替尼的制备方法

技术领域

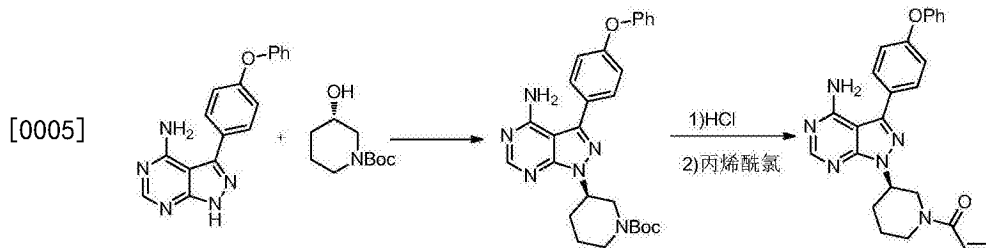
[0001] 本发明涉及药物合成领域,具体涉及一种酪氨酸激酶抑制剂伊布鲁替尼的制备方法。

背景技术

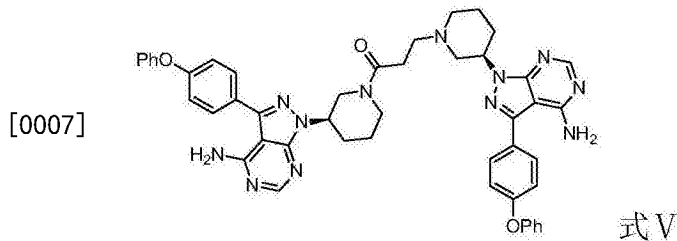
[0002] 伊布鲁替尼(ibrutinib),化学名称为1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮,其具有如式I所示结构。



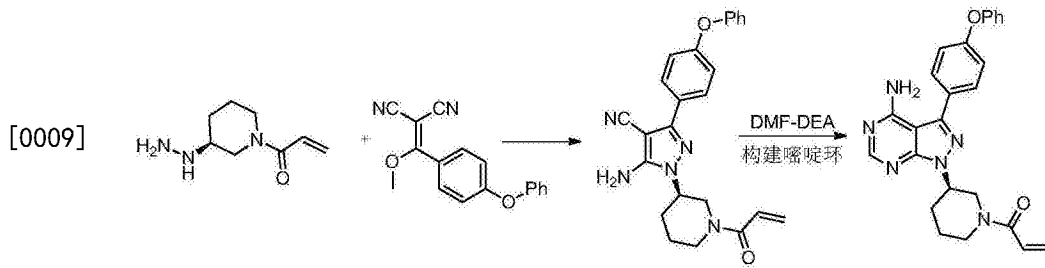
[0004] 伊布鲁替尼由Pharmacyclics公司开发的一种酪氨酸激酶抑制剂,具有治疗套细胞淋巴瘤和慢性细胞白血病功效。在PCT申请W02008039218中公开了伊布鲁替尼的合成方法,具体反应路线如下:



[0006] 该路线的主要缺点为(1)采用丙烯酰氯是有毒有害化学品,对人体呼吸系统、眼睛、鼻部等处的刺激性较强,有催泪性。(2)最后一步酰化反应尚未参与反应的哌嗪化合物,易与产物伊布鲁替尼加成大量副产物式V,该化合物的性质类似于伊布鲁替尼,难于与伊布鲁替尼完全分离。



[0008] 中国专利申请CN103626774公开了,以1-(3R-胍基-1-哌啶基)-2-丙烯-1-酮为起始原料,发生吡唑环化反应,最后与环化剂发生嘧啶环化反应制备伊布鲁替尼,具体反应路线如下:

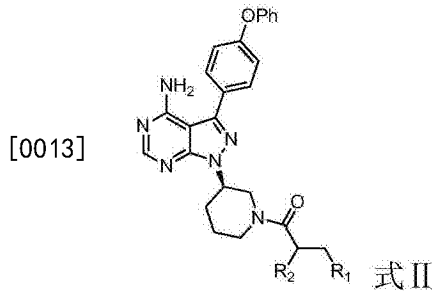


[0010] 该路线在反应初始即引入丙烯酰胺,虽然避免了二聚产物式V的产生,但存在原料获取困难,价格昂贵,且反应条件要求高等缺点。

发明内容

[0011] 为了解决现有技术存在的问题,本发明提供一种原料毒性较小,安全性较高的制备伊布鲁替尼的方法,且反应中生成的式V二聚物杂质大大降低。该路线反应条件温和,毒副作用小,杂质生成小,易于纯化,适合工业化生产。

[0012] 本发明一方面公开一种用于合成伊布鲁替尼的中间体式II化合物,结构如下:



[0014] 其中R₁、R₂独立的选自氢、氯、溴;R₁、R₂至少一个为氢且不能同时为氢。

[0015] 优选的,本发明的式II化合物选自:

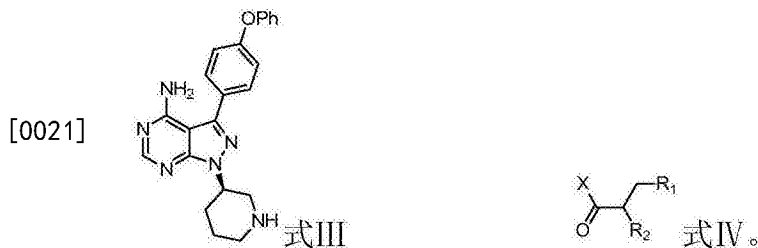
[0016] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]噻啉-1-基)哌啶-1-基)-3-氯-丙-1-酮;

[0017] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]噻啉-1-基)哌啶-1-基)-3-溴-丙-1-酮;

[0018] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]噻啉-1-基)哌啶-1-基)-2-氯-丙-1-酮;

[0019] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]噻啉-1-基)哌啶-1-基)-2-溴-丙-1-酮。

[0020] 本发明再一方面公开一种式II化合物的制备方法,通过使化合物式III与化合物式IV反应制备,其中X为卤素;R₁、R₂与上述的定义范围相同,



[0022] 所述的化合物式III与化合物式IV的反应,反应条件无特别限制,任何在一定程度

上能使反应起始物转化为式II的反应条件都可以在该方法中使用。在某些实施例中,化合物式III与化合物式IV的反应是在碱性条件下进行;在一些实施例中,化合物式III与化合物式IV的反应是无碱性的条件下进行;在一些实施例中,化合物式III与化合物式IV反应的碱是无机碱或有机碱;所述无机碱包括但不限于氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯中的一种或者几种;所述有机碱包括但不限于三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯中的一种或者几种。

[0023] 本发明再一方面公开一种由化合物式II制备伊布鲁替尼式I中的方法,包括使式II化合物在碱性条件下,反应形成伊布鲁替尼式I。

[0024] 所述方法的碱是无机碱或有机碱;所述无机碱包括但不限于氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯中的一种或者几种。所述有机碱包括但不限于三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯中的一种或者几种。

[0025] 本发明再一方面公开一种伊布鲁替尼的制备方法,包括以下步骤:

[0026] (1) 将式III与式IV在反应得到式II;

[0027] (2) 将式II在碱性条件下反应,得到伊布鲁替尼。

[0028] 本发明的一些实施例公开一种伊布鲁替尼的制备方法,包括以下步骤:

[0029] (1) 将式III与3-氯丙酰氯反应得到1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-3-氯-丙-1-酮;

[0030] (2) 将1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-3-氯-丙-1-酮在碱性条件下反应,得到伊布鲁替尼。

[0031] 本发明所述方法的反应溶剂无特别限制,任何在一定程度上能溶解反应起始原料并且不抑制反应的溶剂都可以在该方法中使用。在某些实施例中,式III与式IV的反应可以在卤代烷烃、芳烃、烷烃、醚、水等溶剂中;在某些实施例中,式II在碱性条件下的反应可以在卤代烷烃、芳烃、烷烃、醚、水等溶剂中。

[0032] 本发明所述的方法通过式III与式IV反应,得到式II中间体,并通过进一步反应得到伊布鲁替尼,有效避免现有技术中使用丙烯酰氯的方法。并且意外地发现经由本发明所述方法制备伊布鲁替尼显著的减少了杂质的产生,简化了工艺。

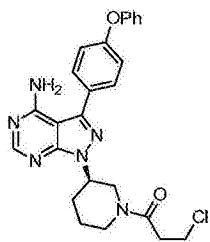
具体实施方式

[0033] 本发明的实施例用于进一步说明本发明而非对本发明的限制,本领域技术人员可以根据本发明的内容,适当更改工艺参数而实现本发明。另外,如无特别说明,本发明的技术术语具有本领域内常规解释,本发明的试剂如无特别说明,均为市售购得。

[0034] 实施例1

[0035] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-3-氯-丙-1-酮

[0036]



[0037] 式III哌啶化合物 (8.0g, 20.7mmol) 加入二氯甲烷 (100毫升) 中, 加入二异丙基乙胺 (2.95g, 22.8mmol), 冰水浴冷却下, 30分钟内滴入3-氯丙酰氯 (2.5g, 19.7mmol) 在20毫升二氯甲烷中的溶液 (氩气保护), 滴毕, 搅拌15分钟, 加入水50毫升, 搅拌至两相澄清, 分去水相, 有机相加20毫升1N盐酸洗1次, 分得有机相后旋干。柱层析, 洗脱剂 (二氯甲烷: 甲醇 = 30:1), 收集产物, 得到标题化合物9.6克, 产率97%。

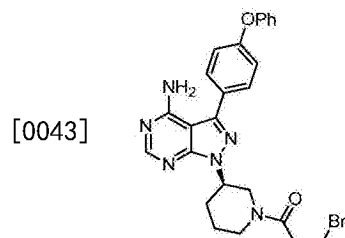
[0038] $^1\text{H NMR}$ (400M Hz, CDCl_3), δ 8.36 (s, 1H), 7.67-7.64 (m, 2H), 7.43-7.38 (m, 2H), 7.29-7.15 (m, 3H), 7.10 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 2H), 5.9 (brs, 2H), 4.88-4.83 (m, 2H), 3.88-3.72 (m, 3H), 3.35-3.33 (m, 2H),

[0039] 2.91-2.80 (m, 2H), 2.27-2.25 (m, 2H), 2.21-1.72 (m, 2H) .

[0040] ESI (M+1) : 477.1

[0041] 实施例2

[0042] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-3-溴-丙-1-酮



[0044] 式III哌啶化合物 (2.0g, 5.18mmol) 加入二氯甲烷 (20毫升, 不溶) 中, 加入二异丙基乙胺 (1.47g, 11.4mmol), 冰水浴冷却下, 15分钟内滴入3-溴丙酰氯 (0.84g, 4.92mmol) 在10毫升二氯甲烷中的溶液 (氩气保护), 滴毕, 搅拌5分钟, 加入水20毫升, 搅拌至两相澄清, 分去上层水相, 有机相加20毫升1N盐酸洗1次, 分得有机相后旋干, 柱层析, 洗脱剂 (二氯甲烷: 甲醇 = 30:1), 收集得到标题化合物2.6克, 产率96.4%。

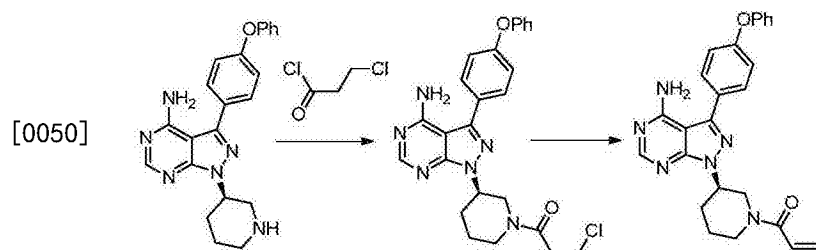
[0045] $^1\text{H NMR}$ (400M Hz, CDCl_3), δ 8.36 (s, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.47-7.36 (m, 2H), 7.29-7.15 (m, 3H), 7.08 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 2H), 5.8 (brs, 2H), 4.88-4.83 (m, 2H), 3.76-3.58 (m, 3H), 3.35-3.33 (m, 2H),

[0046] 2.91-2.80 (m, 2H), 2.31-2.27 (m, 2H), 2.21-1.69 (m, 2H) .

[0047] ESI (M+1) : 523

[0048] 实施例3

[0049] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮



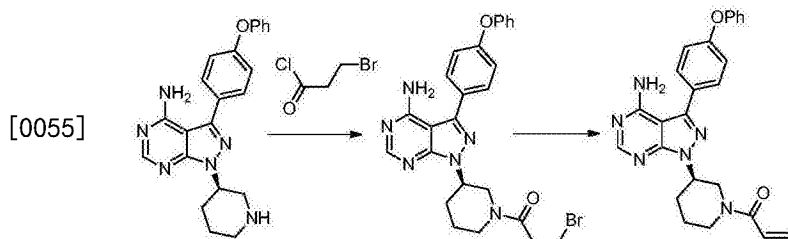
[0051] 式III哌啶化合物 (4.0g, 10.35mmol) 加入二氯甲烷 (40毫升) 中, 加入二异丙基乙胺 (1.47g, 11.4mmol), 冰水浴冷却下, 30分钟内滴入3-氯丙酰氯 (1.25g, 9.83mmol) 在10毫

升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加丙酮40毫升,2.5N氢氧化钠溶液20毫升,室温搅拌30分钟,加乙酸乙酯40毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得标题化合物4.2克,产率92%,式V二聚物杂质含量0.14%。

[0052] 上述粗品中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.5%,式V二聚物杂质0.09%。

[0053] 实施例4

[0054] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮



[0056] 式III哌啶化合物(2.0g,5.18mmol)加入二氯甲烷(20毫升)中,加入三乙胺(0.58g,5.7mmol),冰水浴冷却下,15分钟内滴入3-溴丙酰氯(0.84g,4.92mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加丙酮20毫升,2.5N氢氧化钾溶液10毫升,室温搅拌20分钟,加乙酸乙酯20毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得标题化合物2.1克,产率92.1%,式V二聚物杂质含量0.15%。

[0057] 上述化合物中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.6%,式V二聚物杂质0.1%。

[0058] 实施例5

[0059] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮

[0060] 式III哌啶化合物(4.0g,10.35mmol)加入二氯甲烷(40毫升)中,加入碳酸钾(1.57g,11.4mmol),冰水浴冷却下,30分钟内滴入3-氯丙酰氯(1.25g,9.83mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加四氢呋喃40毫升,二异丙基乙胺2.66g,加热到45到6搅拌60分钟,冷却至室温,加乙酸乙酯80毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得标题化合物4.3克,产率94.3%,式V二聚物杂质含量0.14%。

[0061] 上述化合物中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.3%,式V二聚物杂质0.1%。

[0062] 实施例6

[0063] 式III哌啶化合物(4.0g,10.35mmol)加入甲苯(80毫升,不溶)中,加入1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯(DBU,1.74g,11.4mmol),冰水浴冷却下,30分钟内滴入3-氯丙酰氯(1.25g,9.83mmol)在10毫升甲苯中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加40毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加甲苯80

毫升,加入1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯(3.15g),加入到70到5搅拌60分钟,加甲苯40毫升和40ml水萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得伊布鲁替尼粗品4.22克,产率92.5%,式V二聚物杂质含量0.15%。

[0064] 上述化合物中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.5%,式V二聚物杂质0.1%。

[0065] 实施例7

[0066] 式III哌啶化合物(4.0g,10.35mmol)加入二氯甲烷(40毫升)中,加入二异丙基乙胺(1.47g,11.4mmol),冰水浴冷却下,30分钟内滴入3-氯丙酰氯(1.25g,9.83mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加乙腈40毫升,K₂CO₃(2.86g)的20毫升水溶液,50℃搅拌30分钟,加乙酸乙酯40毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得伊布鲁替尼粗品4.3克,产率94.3%,式V二聚物杂质含量0.13%。

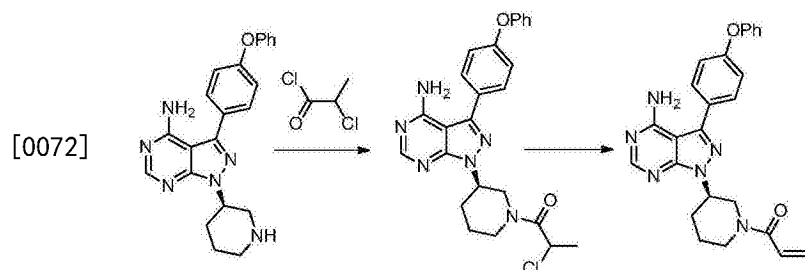
[0067] 上述化合物中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.8%,式V二聚物杂质0.09%。

[0068] 实施例8

[0069] 式III哌啶化合物(2.0g,5.18mmol)溶解于二氯甲烷(20毫升,不溶)中,加入三乙胺(0.58g,5.7mmol),接着加入丙烯酰氯(0.16g)。2小时后终止该反应。该反应混合物用5%(重量)柠檬酸水溶液洗涤,然后用盐水洗涤。有机相经MgSO₄干燥并浓缩。得伊布鲁替尼粗品2.1克,产率92%,式V二聚物杂质含量1.0%。

[0070] 上述粗品中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼1.82克,式V二聚物杂质0.96%。

[0071] 实施例9:



[0073] (a) 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯-丙-1-酮

[0074] 式III哌啶化合物(4.0g,10.35mmol)加入二氯甲烷(40毫升)中,加入二异丙基乙胺(1.47g,11.4mmol),冰水浴冷却下,30分钟内滴入2-氯丙酰氯(1.25g,9.83mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,收集得到标题化合物4.8克,产率97.2%。

[0075] MS:477.1

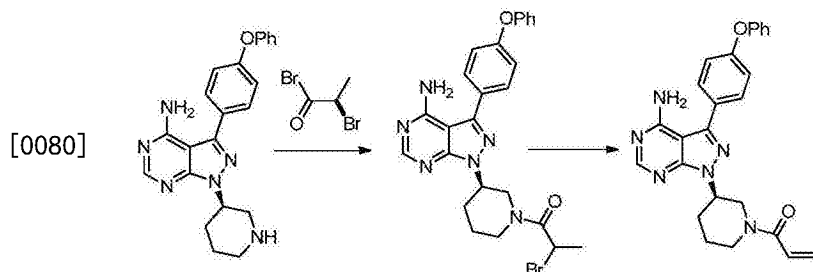
[0076] (b) 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮

[0077] 将上述反应得到的化合物1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]

嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯-丙-1-酮加入丙酮40毫升,2.5N氢氧化钠水溶液20毫升,加热回流搅拌3小时,加乙酸乙酯40毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得到标题化合物4.15克,两步产率91%。

[0078] 上述粗品中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量96.7%,不含式V二聚杂质。

[0079] 实施例10:



[0081] (a) 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴-丙-1-酮

[0082] 式III哌啶化合物(4.0g,10.35mmol)加入二氯甲烷(40mL)中,加入二异丙基乙胺(1.47g,11.4mmol),冰水浴冷却下,30分钟内滴入2-溴丙酰溴氯(2.11g,9.83mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,收集得到标题化合物5.2克,产率96.4%。

[0083] ^1H NMR(400M Hz,CDC13), δ 8.27(s,1H),7.58-7.52(m,2H),7.41-7.31(m,2H),7.29-7.15(m,3H),7.08(d,J=3.6Hz,2H),6.0(brs,2H),4.9(m,1H),3.96-3.58(m,3H),3.51-3.39(m,2H),

[0084] 2.36-2.297(m,2H),2.21-1.69(m,2H),1.97(m,3H)。

[0085] MS:523.1

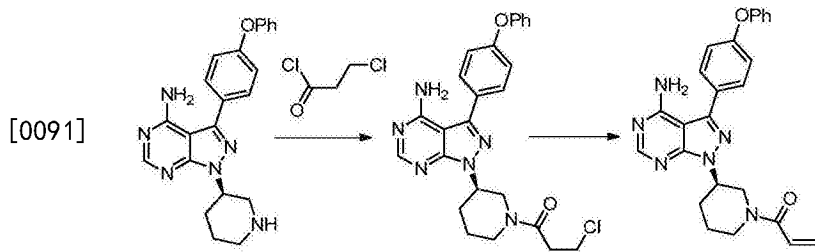
[0086] (b) 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮

[0087] 将上述反应得到的1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴-丙-1-酮加入乙腈40毫升,2.5N氢氧化钾水溶液20毫升,加热回流搅拌3小时,加乙酸乙酯40毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得标题化合物4.2克,两步产率92%。

[0088] 上述粗品中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量96.7%,不含式V二聚杂质。

[0089] 实施例11

[0090] 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮



[0092] 式III吡啶化合物(4.0g, 10.35mmol)加入二氯甲烷(40毫升)中,30分钟内滴入3-氯丙酰氯(1.25g, 9.83mmol)在10毫升二氯甲烷中的溶液(氩气保护),滴毕,搅拌5分钟,加入水20毫升,搅拌至两相澄清,分去上层水相,有机相加20毫升1N盐酸洗1次,分得有机相后旋干,加丙酮40毫升,2.5N氢氧化钠溶液40毫升,室温搅拌30分钟,加乙酸乙酯40毫升萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,旋干,得标题化合物3.7克,产率81%,式V二聚物杂质含量0.13%。

[0093] 上述粗品中加入无水乙醇30毫升,升温到回流后澄清,搅拌下自然降温至室温,搅拌2小时,过滤,烘干,得伊布鲁替尼含量99.5%,式V二聚物杂质0.09%。

[0094] HPLC有关物质检测条件:

[0095] 色谱柱:Phenomenex luna C18 (2) 100A, 4.6mm×250mm, 5 μ m

[0096] 流速:1.0mL/min

[0097] 波长:260nm

[0098] 柱温:40 $^{\circ}$ C

[0099] 溶剂:乙腈

[0100] 流动相A:0.03mol/L乙酸铵溶液:乙腈=900:100 (V/V)

[0101] 流动相B:0.03mol/L乙酸铵溶液:乙腈=50:950 (V/V)

[0102] 梯度程序如下表:

	t/min	A/%	B/%
	0	80	20
	5	65	35
[0103]	15	40	60
	30	20	80
	50	20	80

[0104] Posttime:5min

[0105] 以初始流动相溶解样品。