

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D309/30

C07D405/06 B01D 15/08



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99811076.0

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1186335C

[22] 申请日 1999.9.17 [21] 申请号 99811076.0

[30] 优先权

[32] 1998.9.18 [33] SI [31] P-9800241

[86] 国际申请 PCT/IB1999/001553 1999.9.17

[87] 国际公布 WO2000/017182 英 2000.3.30

[85] 进入国家阶段日期 2001.3.16

[71] 专利权人 莱克制药与化学公司

地址 斯洛文尼亚卢布尔雅那

[72] 发明人 罗克·格拉海克

杜尚·米利沃耶维奇

安德烈·巴斯塔达

审查员 刘文霞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 得到高纯度 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方法

[57] 摘要

洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、美伐他汀、atorvastatin 及其衍生物和类似物已知是 HMG-CoA 还原酶抑制剂，而且被用做抗高胆固醇血药。它们中的大多数是通过不同物种的微生物发酵而生产的，这些物种属于曲霉属、红曲属、诺卡氏菌属、拟无枝酸菌属、毛霉菌属或青霉菌属，一些是通过使用化学合成的方法处理发酵产物而得到，或者它们是全化学合成的产物。活性成分的纯度是生产安全有效的药物的重要因素，特别是如果该药物产品必须在治疗或预防高血浆胆固醇中长期使用。低纯度药物中的杂质的累积在医疗中可能会引起许多副作用。本发明涉及使用所谓“顶替色谱法”分离 HMG-CoA 还原酶抑制剂的一种新的工业方法。使用本发明能够得到高纯度的 HMG-CoA 还原酶抑制剂，而且收率高，生产成本低，适合生态平衡。

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1. 得到 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方法，特征在于在纯化粗 HMG-CoA 还原酶抑制剂的过程中的一个步骤包括顶替色谱法，包括用于顶替 HMG-CoA 还原酶抑制剂的顶替剂的使用，其中顶替色谱法包括以下步骤：

- a) 用流动相调节色谱柱，
- b) 将溶解在流动相中的 HMG-CoA 还原酶抑制剂进样，
- c) 引入从柱子上顶替 HMG-CoA 还原酶抑制剂的顶替剂，以及
- d) 得到纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

2. 根据权利要求 1 的方法，特征在于 HMG-CoA 还原酶抑制剂选自自由美伐他汀、普伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀组成的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，特征在于 HMG-CoA 还原酶抑制剂是内酯的形式或其酸或盐的形式。

4. 根据权利要求 1 的方法，特征在于纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂通过以下途径得到：

- d1) 收集组分，以及
- d2) 用分析 HPLC 分析组分并根据纯度质量合并组分。

5. 根据权利要求 1 的方法，特征在于顶替色谱法另外包括接着的步骤：

- e) 通过用醇/水混合物冲洗柱子洗脱掉顶替剂而再生色谱柱。

6. 根据权利要求 1 的方法，特征在于流动相选自自由水、乙腈/水溶液或 $C_1 \sim C_4$ 醇水溶液，以及有机酸、卤代有机酸或无机酸与碱金属阳离子、氨或胺的稀缓冲液组成的溶剂组。

7. 根据权利要求 6 的方法，特征在于流动相是水、乙腈/水溶液或 $C_1 \sim C_4$ 醇水溶液中的任一种。

8. 根据权利要求1的方法,特征在于所用流动相的pH值在4.5到10.5之间。
9. 根据权利要求8的方法,特征在于所用流动相的pH值在6.5到8之间。
10. 根据权利要求9的方法,特征在于所用流动相的pH值为7。
11. 根据权利要求1的方法,特征在于流动相通过色谱柱的流速在1.5到30 ml/(min cm²)之间。
12. 根据权利要求1的方法,特征在于所用流动相/顶替剂混合物通过色谱柱的流速在3到15 ml/(min cm²)之间。
13. 根据权利要求5的方法,特征在于色谱结束后,用20-100% v/v的C₁~C₄醇水溶液再生固定相。
14. 根据权利要求1的方法,特征在于固定相为反相。
15. 根据权利要求14的方法,特征在于固定相为天然的反相,其为带有不同长度烷基链的硅胶。
16. 根据权利要求14的方法,特征在于固定相为具有8或18个碳原子的烷基链的固定相。
17. 根据权利要求14的方法,特征在于固定相为合成交联聚合物基质。
18. 根据权利要求17的方法,特征在于交联聚合物基质为苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物。
19. 根据权利要求1的方法,特征在于固定相粒径在3到20 μm之间。
20. 根据权利要求19的方法,特征在于固定相粒径在7-15 μm之间。
21. 根据权利要求1的方法,特征在于顶替剂选自具有至少4个碳原子的烷基链的醇、具有至少4个碳原子的烷基链的羧酸、具有至少4个碳原子的烷基链的铵盐、芳香族二羧酸酯、羰基合成醇和

二羰基合成醇、聚亚烷基聚乙二醇醚和聚芳基醚以及聚亚烷基聚芳基醚组成的组。

22. 根据权利要求 1 的方法, 特征在于流动相中顶替剂的浓度在 1% v/v 到 35% v/v 之间。

23. 根据权利要求 22 的方法, 特征在于流动相中顶替剂的浓度在 2-20% v/v 之间。

24. 权利要求 1 的方法用以生产 HPLC 纯度超过 99.7%的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的用途。

25. 权利要求 4 的方法用以生产 HPLC 纯度超过 99.7%的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的用途。

得到高纯度 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方法

技术领域

洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、美伐他汀、atorvastatin 及其衍生物和类似物已知是 HMG-CoA 还原酶抑制剂，而且被用做抗高胆固醇血药。它们中的大多数是通过不同物种的微生物发酵而生产的，这些物种属于曲霉属、红曲属、诺卡氏菌属、拟无枝酸菌属、毛霉菌属或青霉菌属，一些是通过使用化学合成的方法处理发酵产物而得到，或者它们是全化学合成的产物。

活性成分的纯度是生产安全有效的药物的重要因素，特别是如果该药物产品必须在治疗或预防高血浆胆固醇中长期使用。低纯度药物中的杂质的累积在医疗中可能会引起许多副作用。

本发明涉及使用所谓“顶替色谱法”分离 HMG-CoA 还原酶抑制剂的一种新的工业方法。使用本发明可以得到高纯度的 HMG-CoA 还原酶抑制剂，而且收率高，生产成本低，适合生态平衡。

已有技术

在以前的专利中公开的抗高胆固醇血药的分离和纯化方法包括萃取、色谱、内酯化和结晶方法的各种组合。经过这些过程得到的终产物的纯度遵守 USP 标准，但是期望的产物的收率相对较低。另外，它们不仅需要大量有机溶剂，还需要适合这些量级的巨大设备。

WO 92/16276 中公开的分离方法提供了使用工业 HPLC（高效液相色谱）设备得到纯度高于 99.5% 的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方案。根据 WO 92/16276，纯度 $\geq 85\%$ 的粗 HMG-CoA 还原酶抑制剂被溶解在有机溶剂或有机溶剂和水的溶液中。然后将混合物缓冲至

pH 值在 2-9 之间，并置于 HPLC 柱上。收集所关心的 HMG-CoA 还原酶抑制剂峰后，除去部分溶剂并加入水，或者三分之二的溶剂混合物被除去，HMG-CoA 还原酶抑制剂结晶。最后，通过该方法得到的产物的纯度至少为 99.5%，收率约 90%。

WO 92/16276 中公开的方法能得到高纯度的 HMG-CoA 还原酶抑制剂，收率相对较高，该方法与常规色谱柱相比的缺点是相对小的每根 HPLC 柱的载样量。加在柱子上的小量样品也与为得到足够的期望的物质而增加的分离操作的次数，以及导致更高生产成本的大量溶剂的使用有关。

本发明的基础—顶替色谱法与以前所用的色谱方法没有本质区别。

顶替色谱法是基于加在柱上的样品中的组分对固定相上活性位点的竞争。样品中的各组分象火车(train)一样相互顶替，与固定相有非常高亲和性而在过柱时落在所加样品的后面的顶替剂，驱动与顶替剂移动速度相同的样品组分成为单室区带(one-compartment zones)。各组分的浓缩与纯化同时进行。

顶替色谱法的原理相对比较古老，它从 1943 年开始就为人所知，但是由于缺少有效的柱子，它直到 1981 年才被引入实际应用 (Cs. Horvath et al., J. Chromatogr., 215(1981)295; J. Chromatogr., 330 (1985) 1; J. Chromatogr. 440 (1988) 157)。这些文章引入本文作参考，它们描述了使用反相高效液相色谱柱，以顶替模式进行生物活性肽和多粘菌素抗生素（多肽）的分析和制备的分离和纯化。对于多粘菌素，使用 250×4.6 mm 的十八烷基硅胶柱，粒径 5 μm，10%乙腈在水中作为流动相，不同的卤化四烷基季铵作为顶替剂。

在顶替色谱法领域的最近的研究 (S.M. Cramer et al., Enzyme Microb. Technol., 11 (1989) 74; Prep. Chromatogr., 1 (1988) 29; J. Chromatogr., 394 (1987) 305; J. Chromatogr., 439 (1988) 341; J.

Chromatogr., 454 (1988) 1 (理论优化); A. Felinger et al., J. Chromatogr., 609 (1992) 35 (理论优化), 所有文章引入本文作参考) 中, 使用了相似的柱子, 流动相为甲醇在磷酸盐缓冲液中, 顶替剂为乙腈中的 2-(2-叔丁氧乙氧基)乙醇 (BEE), 蛋白质和抗生素头孢菌素 C 用作样品。

美国专利第 5,043,423 号 (27.08.1991) 和 EP 416. 416 分别描述了用顶替离子交换色谱法纯化某种低分子的 (低于 1000 道尔顿) 肽 (特别是, 促吞噬素及其合成的衍生物) 的方法, 使用阳离子交换树脂做为固定相, 迁移溶剂(transporter solvent)为水或各种强酸的稀溶液, 所用的顶替剂为不同浓度的三亚乙基季铵盐。在还未公开的美国专利申请第 08/875,422 号中, 描述了使用顶替色谱法分离和纯化万古霉素。

技术方案

有时得到大量高纯度的活性物质是困难的, 因为很多适合于实验室规模的技术从其使用而言在大规模生产操作中是不够经济的, 或者未达到环境标准。以上事实迫使工业上寻找新的技术, 它提供既是高质量又是经济和生态上可接受的产品。

本发明解决了从较早的专利和其它文献中得到的方法的缺点, 因为它能够得到纯 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 另外, 该纯化方法本身是省时的, 提供高收率, 使用小量溶剂。该方法是有利自然的, 另外, 它不需要大的空间和能量, 因而能够大规模经济生产。

发明描述

本发明提供使用顶替色谱法纯化 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方法。即, 该粗 HMG-CoA 还原酶抑制剂的纯化方法中至少一步包括顶替色谱法。

要纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂是, 例如, 选自由美伐他汀、

普伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、 atorvastatin 组成的组。选择的用顶替色谱法进行纯化的抑制剂可以是内酯的形式或酸或其盐的形式。

作为本发明特征的顶替色谱法优选包括以下步骤：

- a) 用合适的流动相调节色谱柱，
- b) 将溶解在流动相中的粗 HMG-CoA 还原酶抑制剂进样，
- c) 引入从柱子上顶替 HMG-CoA 还原酶抑制剂的顶替剂，以及
- d) 得到纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂优选通过以下途径得到：

- d1) 收集组分，以及
- d2) 用分析 HPLC 分析组分以及根据纯度质量合并组分。

得到纯化的 HMG-CoA 还原酶抑制剂以后，色谱柱可以通过用醇/水混合物冲洗以洗脱掉顶替剂而再生。

然后，用本文描述的方式得到的 HMG-CoA 还原酶抑制剂根据从已有技术的陈述中已知的方法从流动相中分离，例如通过冷冻干燥，或者优选地，通过结晶得到内酯的形式、酸的形式或盐的形式（优选是碱或碱土盐）。

除了杂质还含有很高百分比 HMG-CoA 还原酶抑制剂的组分可以用该方法再处理，使总收率超过 95%。

所使用的固定相为反相固定相，天然的（带有不同长度烷基链的硅胶）或合成的（C-8 或 C-18）有机的固定相是合适的。优选地，使用苯乙烯和二乙烯基苯的合成交联聚合物基质。固定相的粒径在 3 到 20 μm 之间是合适的，优选在 7-15 μm 之间。

所用的流动相优选选自水、乙腈/水溶液和低级（优选是 $\text{C}_1\text{-C}_4$ ）醇水溶液、有机酸、卤代有机酸或无机酸的稀缓冲液如，蚁酸、醋酸、丙酸、盐酸、硼酸、磷酸、碳酸或硫酸与碱金属阳离子、氨或胺。水、乙腈的水溶液，特别是甲醇或乙醇的水溶液是特别优选的，

且水溶液中有有机溶剂含量优选是 80%或更低, 更优选是 45%或更低, 特别是 30%或更低。因为流动相中毒性的甲醇可以被毒性较低的乙醇代替, 或者至少部分地被水代替, 而结果较好, 废溶剂的除去更简单, 因而从生态方面而言, 与已有技术相比, 本发明是显著进步的。

所用的流动相的 pH 值优选在 4.5 到 10.5 之间, 更优选在 6.5 到 8 之间, 特别是约 7。流动相通过柱子的流速被适当地调节在 1.5 到 30 ml/(min cm²)之间, 优选在 3 到 15 ml/(min cm²)之间。当顶替剂通过与流动相混合被引入色谱柱的同时, 流速优选调节在 1.5 到 15 ml/(min cm²)之间, 特别是在 3 到 10 ml/(min cm²)之间, 因为更高的流速会导致要收集的样品的稀释, 而且分离也会变差。

合适的顶替剂是具有两亲结构的化合物, 如表面活性剂、洗涤剂等。顶替剂的例子是长链醇、长链羧酸、长链烷基铵盐、芳香族二羧酸酯、羰基合成醇和二羰基合成醇(dioxo-alcohols)、聚亚烷基聚乙二醇醚如二亚乙基乙二醇单(或二)烷基醚、聚芳基醚或聚亚烷基聚芳基醚如 Triton[®]X-100 等。前述的“长链”指含有至少 C₄-链, 优选是至少 C₁₀-链, 更优选是至少 C₁₄ 链或更长的烷基链。

流动相中顶替剂的浓度适当地调节在 1%到 35%之间, 优选是 2-20%, 特别是 7-14%。

在控制从色谱柱洗脱下来地的各组分的纯度质量的优选的实施方案中, 用于要分析的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的分析 HPLC 方法可以如下进行。

要分析的样品用含有 20 mM NH₄HCO₃ 溶液和乙腈(乙腈的比例调节到使分析物的保留因子在 5 到 10 之间)的流动相稀释 100 倍。10 μl 该样品被加到 Hypersil ODS 柱(Hypersil, 英国, 粒径 3 μm, 柱尺寸 50×4.6 mm)进行高效液相色谱分析。柱子用流动相在 2 ml/min 的流速下冲洗。在 235 nm 测定吸光度。样品的 HPLC 纯度用色谱图

上各峰面积的比来计算。

完成色谱后，固定相优选进行再生，例如用 20-100%低级醇的水溶液做流动相。

本方法用以下实施例说明，但不限于这些实施例。

实施例

实施例 1

粗普伐他汀钠盐（1.0 g，HPLC 纯度 88%，分析 85%）溶解在 10 ml 流动相 A（蒸馏水）中，用 0.2 M NaOH 水溶液调节 pH 值到 7，过滤。色谱柱用流动相 A 平衡。用上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱（Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国）上，粒径 11 μm ，柱尺寸 250×10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 7%的二亚乙基乙二醇单丁醚，流速为 4.5 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 0.5 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 70%的甲醇冲洗柱子。得到的组分用本文上述的 HPLC 分析方法分析。纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并后的组分(7 ml)的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 2

粗普伐他汀钠盐（0.4 g，HPLC 纯度 88%，分析 85%）溶解在 5 ml 流动相 A（蒸馏水）中，用 0.2 M NaOH 水溶液调节 pH 值到 7，过滤。色谱柱用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Kromasil 100 C-18 柱（EKA, Chemical AB, 瑞典）上，粒径 10 μm ，柱尺寸 200×10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 7% 的 Triton X-100，流速为 1 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 0.5 ml 组分。得到的组分用上述 HPLC 分析方法分析。纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分(3 ml)的

HPLC 纯度为 99.7%。

实施例 3

0.6 g 粗普伐他汀钠盐溶解在 5 ml 蒸馏水中。除了所用的流动相（30%甲醇水溶液）之外，使用实施例 1 中描述的方案，得到 HPLC 纯度 99.8%的合并的组分。

实施例 4

重复实施例 3 中描述的方法，其中流动相中顶替剂的浓度为 14%。在合并的组分中，根据实施例 1 中描述的标准，HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 5

普伐他汀内酯（0.4 g，HPLC 纯度 85%）溶解在 33 ml 含有 45% 甲醇的流动相 A 中。柱子用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱（Grom Analytic + HPLC GmbH，德国）上，粒径 11 μ m，柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 2% 的二亚乙基乙二醇二丁醚，流速为 4.5 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号下降时，用 25 ml 70%的甲醇冲洗柱子。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.7%。

实施例 6

普伐他汀内酯（0.3 g，HPLC 纯度 85%）溶解在 80 ml 含有 30% 甲醇的流动相 A 中。柱子用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Licrosphere RP 18 柱上，粒径 12 μ m，柱尺寸 200 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 5%的二亚乙基

乙二醇单正己醚，流速为 4.5 ml/min。在 235 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 90%的甲醇冲洗柱子。得到的组分用上述 HPLC 分析方法分析。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并后的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 7

普伐他汀内酯（0.3 g，HPLC 纯度 85%）溶解在 25 ml 含有 35% 乙腈的流动相 A 中。色谱柱用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Licrosphere RP 18 柱上，粒径 12 μ m，柱尺寸 200 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 1%的二亚乙基乙二醇二丁醚，流速为 4.5 ml/min。在 235 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 90%的甲醇冲洗柱子。得到的组分用上述 HPLC 分析方法分析。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 8

重复实施例 7 中描述的方法，其中流动相 B 是流动相 A 中含 0.85%的邻二苯甲酸二乙酯。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 9

辛伐他汀内酯（0.42 g，HPLC 纯度 87%）溶解在 6 ml 66%的乙腈中，并用 1.2 mmol 的氢氧化钠水解。除去乙腈，pH 值用稀 H_3PO_4 调节到 7。色谱柱用含有 14%甲醇的流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱（Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国）上，粒径 11 μ m，柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动

相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 6.7%的二亚乙基乙二醇单正己醚，流速为 4.5 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 0.5 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 甲醇冲洗柱子。

纯度 $\geq 99.5\%$ 的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 10

辛伐他汀内酯（0.5 g，HPLC 纯度 87%）溶解在 20 ml 含有 70% 甲醇的流动相中。柱子用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱（Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国）上，粒径 11 μm ，柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 3%的癸酸，流速为 4.5 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 0.75 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 甲醇冲洗柱子。得到的组分用本文上述的方法分析。纯度 $\geq 99.5\%$ 的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.7%。

实施例 11

辛伐他汀内酯（0.5 g，HPLC 纯度 87%）溶解在 20 ml 含有 60% 乙腈的流动相中。柱子用流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱（Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国）上，粒径 11 μm ，柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗，流动相 B 是流动相 A 中含有 2%的溴化四（癸基）铵，流速为 4.5 ml/min。在 260 nm 测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 甲醇冲洗柱子。

纯度 $\geq 99.5\%$ 的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 12

洛伐他汀内酯（0.5 g，HPLC 纯度 87%）溶解在 60 ml 75%的甲

醇中。柱子用含有 70%甲醇的流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱 (Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国) 上, 粒径 11 μm , 柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗, 流动相 B 是流动相 A 中含有 70%的甲醇和 4.5%的癸酸, 流速为 6 ml/min。在 260 nm 测定吸光度, 从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号降低时, 用 25 ml 甲醇冲洗柱子。得到的组分用上述 HPLC 分析方法分析。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.9%。

实施例 13

洛伐他汀内酯 (0.42 g, HPLC 纯度 87%) 溶解在 8 ml 50%的乙腈中, 并用 1.5 mmol 的氢氧化钠水解。除去乙腈, pH 值用稀 H_3PO_4 调节到 7。柱子用含有 14%甲醇的流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱 (Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国) 上, 粒径 11 μm , 柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗, 流动相 B 是流动相 A 中含有 6.7% 的二亚乙基乙二醇单正己醚, 流速为 1 ml/min。在 260 nm 测定吸光度, 从吸光度开始上升时收集 0.25 ml 组分。当信号降低时, 用 25 ml 甲醇冲洗柱子。

得到的组分用实施例 9 中描述的方法分析。纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。

实施例 14

美伐他汀内酯 (0.5 g, HPLC 纯度 85%) 溶解在 150 ml 含有 70%甲醇的流动相 A 中。色谱柱流动相 A 平衡。通过上述方式得到的样品被加到 Grom-Sil 120-ODS HE 柱 (Grom Analytic + HPLC GmbH, 德国) 上, 粒径 11 μm , 柱尺寸 250 $\times$ 10 mm。柱子用流动相 B 冲洗, 流动相 B 是流动相 A 中含有 4.5%的癸酸, 流速为 6 ml/min。在 260 nm

测定吸光度，从吸光度开始上升时收集 1 ml 组分。当信号降低时，用 25 ml 甲醇冲洗柱子。

得到的组分用上述 HPLC 分析方法分析。

纯度 $\geq$ 99.5%的组分被合并。合并的组分的 HPLC 纯度为 99.8%。