



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113125575 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911410046.X

G01N 30/74(2006.01)

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 济南尚博生物科技有限公司

地址 250204 山东省济南市章丘区刁镇工业开发区圣泉工业园

(72)发明人 唐地源 孟庆文 王武宝 高思国  
任耀辉 刘水莲 时呈凤 魏晓红

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/34(2006.01)

G01N 30/36(2006.01)

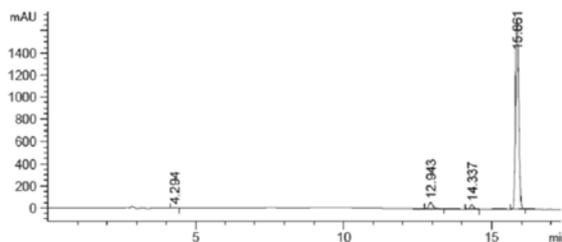
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量分析方法

(57)摘要

本发明涉及一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量分析方法,所述定量分析方法为高效液相色谱法。本发明以三氟乙酸水溶液和甲醇作为流动相对待测样品进行洗脱,洗脱后1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮和杂质的分离度高,采用面积归一化法对谱图进行积分,得到1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮及杂质的定量结果,分析结果准确,能够有效的检测出样品中1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的纯度以及杂质含量。



1. 一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量分析方法,其特征在于,所述定量分析方法为高效液相色谱法;

所述高效液相色谱的流动相包括三氟乙酸水溶液和甲醇的组合。

2. 根据权利要求1所述的定量分析方法,其特征在于,所述三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.03~0.07%,优选0.05%。

3. 根据权利要求1或2所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱法中,采用流动相对样品进行梯度洗脱;

优选地,以流动相中三氟乙酸水溶液的体积分数计,洗脱梯度为:0~15min:55~65%;15~20min:20~30%;20~25min:5~15%;25~30min:55~65%。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,以流动相中三氟乙酸水溶液的体积分数计,洗脱梯度为:0~15min:60%;15~20min:25%;20~25min:10%;25~30min:60%。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述流动相的流速为0.8~1.2mL/min,优选1mL/min。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱法中,柱温为25~35℃,优选30℃。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱法中,检测波长为200~220nm,优选210nm。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱法中,进样体积为8~12μL,优选10μL。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱的固定相包括十八烷基硅烷键合硅胶。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的定量分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱法中,固定相为十八烷基硅烷键合硅胶,流动相为体积浓度为0.03~0.07%的三氟乙酸水溶液和甲醇的组合,采用流动相对样品进行梯度洗脱,洗脱梯度为:0~15min:55~65%;15~20min:20~30%;20~25min:5~15%;25~30min:55~65%;

所述梯度洗脱的条件为:流速0.8~1.2mL/min,柱温为25~35℃,检测波长为200~220nm,进样体积为8~12μL;

优选地,所述高效液相色谱法中,固定相为十八烷基硅烷键合硅胶,流动相为体积浓度为0.05%的三氟乙酸水溶液和甲醇的组合,采用流动相对样品进行梯度洗脱,洗脱梯度为:0~15min:60%;15~20min:25%;20~25min:10%;25~30min:60%;

所述梯度洗脱的条件为:流速1mL/min,柱温为30℃,检测波长为210nm,进样体积为10μL。

## 一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-二酮的定量分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学分析技术领域,尤其涉及一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-二酮的定量分析方法。

### 背景技术

[0002] 1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮是制备elagolix的关键中间体,而elagolix是一种口服促性腺激素释放激素(GnRH)拮抗剂,在减轻3种类型子宫内膜异位症相关疼痛方面表现出优越性。Elagolix已于2018年7月23日获美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,商品名为Orilissa,成为十多年来FDA批准用于治疗嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征(EMs)相关疼痛的首个新产品。作为关键中间体的1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮,其制备及检测方法成为研发及分析人员首要任务。

[0003] 目前并没有相关文献涉及到1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮及有关物质的定量分析方法,只局限于薄层色谱(TLC)检测,鉴于TLC检测的局限性,其定量检测过程比较困难。

[0004] 因此,本领域亟需开发一种操作简单、结果准确的1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量检测方法。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量分析方法。所述定量分析方法操作方便,且结果准确。

[0006] 为达此目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供一种1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的定量分析方法,所述定量分析方法为高效液相色谱法;

[0008] 所述高效液相色谱的流动相包括三氟乙酸水溶液和甲醇的组合。

[0009] 本发明提供了一种采用高效液相色谱法对1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮进行定量分析的方法,以三氟乙酸水溶液和甲醇作为流动相对待测样品进行洗脱,洗脱后1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮和杂质的分离度高,采用面积归一化法对谱图进行积分,得到1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮及杂质的定量结果,分析结果准确,能够有效的检测出样品中1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的纯度以及杂质含量。

[0010] 优选地,所述三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.03~0.07%,例如0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%等,优选0.05%。

[0011] 优选地,所述高效液相色谱法中,采用流动相对样品进行梯度洗脱。

[0012] 优选地,以流动相中三氟乙酸水溶液的体积分数计,洗脱梯度为:0~15min:55~

65%，例如57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%等；15~20min:20~30%，例如21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%等；20~25min:5~15%，例如6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%等；25~30min:55~65%，例如56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、63%等。

[0013] 上述洗脱梯度中，以进样时刻记为0min，且百分比指的是流动相中三氟乙酸水溶液的体积占比，具体地，15min时将三氟乙酸水溶液百分比调节为20~30%，20min时调节为5~15%，25min时调节为55~65%。

[0014] 本发明优选上述特定的洗脱梯度，在该洗脱梯度下，能够进一步提高1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮和杂质的分离程度，从而进一步提高定量分析结果的准确性。

[0015] 优选地，以流动相中三氟乙酸水溶液的体积分数计，洗脱梯度为：0~15min:60%；15~20min:25%；20~25min:10%；25~30min:60%。

[0016] 本发明对洗脱梯度进行进一步的优选，达到最优的效果。

[0017] 优选地，所述流动相的流速为0.8~1.2mL/min，例如0.8mL/min、0.9mL/min、1mL/min、1.1mL/min、1.2mL/min等，优选1mL/min。

[0018] 优选地，所述高效液相色谱法中，柱温为25~35℃，例如26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃等，优选30℃。

[0019] 优选地，所述高效液相色谱法中，检测波长为200~220nm，例如202nm、204nm、206nm、208nm、210nm、212nm、214nm、216nm、218nm等，优选210nm。

[0020] 优选地，所述高效液相色谱法中，进样体积为8~12μL，例如8μL、9μL、10μL、11μL、12μL等，优选10μL。

[0021] 优选地，所述高效液相色谱的固定相包括十八烷基硅烷键合硅胶。

[0022] 优选地，所述高效液相色谱法中，固定相为十八烷基硅烷键合硅胶，流动相为体积浓度为0.03~0.07%的三氟乙酸水溶液和甲醇的组合，采用流动相对样品进行梯度洗脱，洗脱梯度为：0~15min:55~65%；15~20min:20~30%；20~25min:5~15%；25~30min:55~65%；

[0023] 所述梯度洗脱的条件为：流速0.8~1.2mL/min，柱温为25~35℃，检测波长为200~220nm，进样体积为8~12μL。

[0024] 在本发明的优选方案中，选择特定的固定相和流动相，并且通过设置洗脱梯度、柱温、流速、检测波长和进样体积，进一步提升1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮和杂质的分离效果，从而进一步提升定量分析结果的准确性。

[0025] 优选地，所述高效液相色谱法中，固定相为十八烷基硅烷键合硅胶，流动相为体积浓度为0.05%的三氟乙酸水溶液和甲醇的组合，采用流动相对样品进行梯度洗脱，洗脱梯度为：0~15min:60%；15~20min:25%；20~25min:10%；25~30min:60%；

[0026] 所述梯度洗脱的条件为：流速1mL/min，柱温为30℃，检测波长为210nm，进样体积为10μL。

[0027] 进一步优化上述各项参数，以达到最佳的分离效果以及检测准确性。

[0028] 相较于现有技术，本发明具有如下有益效果：

[0029] 本发明提供了一种采用高效液相色谱法对1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基

嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮进行定量分析的方法,以三氟乙酸水溶液和甲醇作为流动相对待测样品进行洗脱,洗脱后1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮和杂质的分离度高,采用面积归一化法对谱图进行积分,得到1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮及杂质的定量结果,分析结果准确,能够有效的检测出样品中1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的纯度以及杂质含量。检测误差可以控制在0.40%以内,甚至1%以内,最低可达0.22%。

### 附图说明

[0030] 图1是实施例1中通过高效液相色谱法检测得到的谱图。

[0031] 图2是实施例2中通过高效液相色谱法检测得到的谱图。

### 具体实施方式

[0032] 为便于理解本发明,本发明列举实施例如下。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例提供一种采用高效液相色谱法对1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮进行定量分析的方法,具体如下:

[0035] (1)配置标准溶液:

[0036] 称取50.0mg的1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮,加溶剂(乙腈:水,体积比80:20)溶解定容至50mL,再用溶剂稀释成浓度为0.5mg/mL的标准溶液。

[0037] (2)检测仪器:安捷伦1260系列液相色谱仪。

[0038] (3)固定相:十八烷基硅烷键合硅胶;流动相:溶剂A为体积浓度为0.05%的三氟乙酸水溶液,溶剂B为甲醇。

[0039] (4)洗脱梯度如下表所示(表中时间为变更体积比的时间节点):

	溶剂A和溶剂B的体积比
0min	60:40
5min	60:40
15min	25:75
20min	10:90
22min	10:90
25min	60:40
30min	60:40

[0041] (5)洗脱参数设置:

[0042] 流速1mL/min,柱温为30℃,检测波长为210nm,进样体积为10μL。

[0043] (6)数据分析:

[0044] 上述测试结果如图1所示,图中流出时间最大的即为1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的峰,从谱图上可以看出,1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮与杂质间分离度较高,出峰位置适中,峰形好。

[0045] 实施例2

[0046] 与实施例1的区别在于,洗脱梯度如下表所示(表中时间为变更体积比的时间节点):

	溶剂A和溶剂B的体积比
0min	45:55
5min	45:55
15min	10:90
20min	10:90
20.1min	45:55
26min	45:55

[0048] 实施例2的测试结果如图2所示,图中流出时间最大的即为1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的峰,峰形较好,但是与实施例1相比,1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮与杂质的分离程度相对较低,且出峰位置靠前。

[0049] 实施例3

[0050] 与实施例1的区别在于,洗脱梯度如下表所示(表中时间为变更体积比的时间节点):

	溶剂A和溶剂B的体积比
0min	65:35
5min	65:35
15min	30:70
20min	15:85
22min	15:85
25min	65:35
30min	65:35

[0052] 实施例4

[0053] 与实施例1的区别在于,洗脱梯度如下表所示(表中时间为变更体积比的时间节点):

	溶剂A和溶剂B的体积比
0min	55:45
5min	55:45
15min	20:80
20min	5:95
22min	5:95
25min	55:45
30min	55:45

[0055] 实施例5

[0056] 与实施例1的区别在于,流速为0.8mL/min。

[0057] 实施例6

- [0058] 与实施例1的区别在于,流速为1.2mL/min。  
[0059] 实施例7  
[0060] 与实施例1的区别在于,流速为0.6mL/min。  
[0061] 实施例8  
[0062] 与实施例1的区别在于,流速为1.4mL/min。  
[0063] 实施例9  
[0064] 与实施例1的区别在于,柱温为25℃。  
[0065] 实施例10  
[0066] 与实施例1的区别在于,柱温为35℃。  
[0067] 实施例11  
[0068] 与实施例1的区别在于,柱温为23℃。  
[0069] 实施例12  
[0070] 与实施例1的区别在于,柱温为37℃。  
[0071] 实施例13  
[0072] 与实施例1的区别在于,检测波长为200nm。  
[0073] 实施例14  
[0074] 与实施例1的区别在于,检测波长为220nm。  
[0075] 实施例15  
[0076] 与实施例1的区别在于,检测波长为190nm。  
[0077] 实施例16  
[0078] 与实施例1的区别在于,检测波长为230nm。  
[0079] 实施例17  
[0080] 与实施例1的区别在于,进样体积为8 $\mu$ L。  
[0081] 实施例18  
[0082] 与实施例1的区别在于,进样体积为12 $\mu$ L。  
[0083] 实施例19  
[0084] 与实施例1的区别在于,进样体积为7 $\mu$ L。  
[0085] 实施例20  
[0086] 与实施例1的区别在于,进样体积为13 $\mu$ L。  
[0087] 实施例21  
[0088] 与实施例1的区别在于,三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.03%。  
[0089] 实施例22  
[0090] 与实施例1的区别在于,三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.07%。  
[0091] 实施例23  
[0092] 与实施例1的区别在于,三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.02%。  
[0093] 实施例24  
[0094] 与实施例1的区别在于,三氟乙酸水溶液中三氟乙酸的体积浓度为0.08%。  
[0095] 对比例1  
[0096] 与实施例1的区别在于,将0.05%的三氟乙酸水溶液替换为PH=2.5磷酸水溶液。

[0097] 对比例2

[0098] 与实施例1的区别在于,将甲醇替换为乙腈。

[0099] 数据分析:

[0100] 采用面积归一法对上述实施例和对比例得到的谱图进行积分,计算得到被测样品中1-(2-氟-6-(三氟甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的浓度,并计算与实际浓度的误差(%),如表1所示。

[0101] 表1

	误差
对比例 1	0.41%
对比例 2	0.40%
实施例 1	0.22%
实施例 2	0.38%
实施例 3	0.31%
实施例 4	0.32%
实施例 5	0.28%
[0102] 实施例 6	0.26%
实施例 7	0.37%
实施例 8	0.36%
实施例 9	0.32%
实施例 10	0.31%
实施例 11	0.37%
实施例 12	0.36%
实施例 13	0.32%
实施例 14	0.33%

[0103]

实施例 15	0.39%
实施例 16	0.38%
实施例 17	0.32%
实施例 18	0.31%
实施例 19	0.36%
实施例 20	0.37%
实施例 21	0.30%
实施例 22	0.31%
实施例 23	0.36%
实施例 24	0.35%

[0104] 由表1可知,本发明提供的定量分析方法的准确度高,误差在0.40%及以下,甚至0.35%以下,最低可达0.22%。

[0105] 对比例1和对比例2与实施例1相比分别替换其中一种流动相,其误差相较于实施例1明显升高,准确度降低,由此证明,本发明是通过采用特定的流动相对待测样品进行洗脱以实现有效的分离,得到准确的测试结果,改变两种流动相中的任何一种,均不能获得本发明的技术效果。

[0106] 对比实施例1~4可知,在本发明的优选洗脱梯度范围内(实施例1、3和4),测试的准确度更高,特别是实施例1的洗脱梯度效果最佳。

[0107] 对比实施例1、5~20可知,流速、柱温、检测波长和体积均会对最终测试结果的准确性造成影响,当上述四项均满足本发明的优选条件(流速0.8~1.2mL/min,柱温为25~35℃,检测波长为200~220nm,进样体积为8~12μL)时(实施例1、5、6、9、10、13、14、17、18),各项参数与洗脱梯度相互配合,能够进一步提高准确性,将流速、柱温、检测波长和进样体积中的任一项参数调整至优选范围之外(实施例7、8、11、12、15、16、19、20),均会使准确度降低。

[0108] 对比实施例1、21~24可知,选用体积浓度为0.03~0.07%的三氟乙酸水溶液作为流动相之一(实施例1、21和22),能够进一步提高检测结果的准确性,浓度过低(实施例23)或者过高(实施例24)均会使准确性有所降低。

[0109] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细工艺设备和工艺流程,但本发明并不局限于上述详细工艺设备和工艺流程,即不意味着本发明必须依赖上述详细工艺设备和工艺流程才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的

保护范围和公开范围之内。

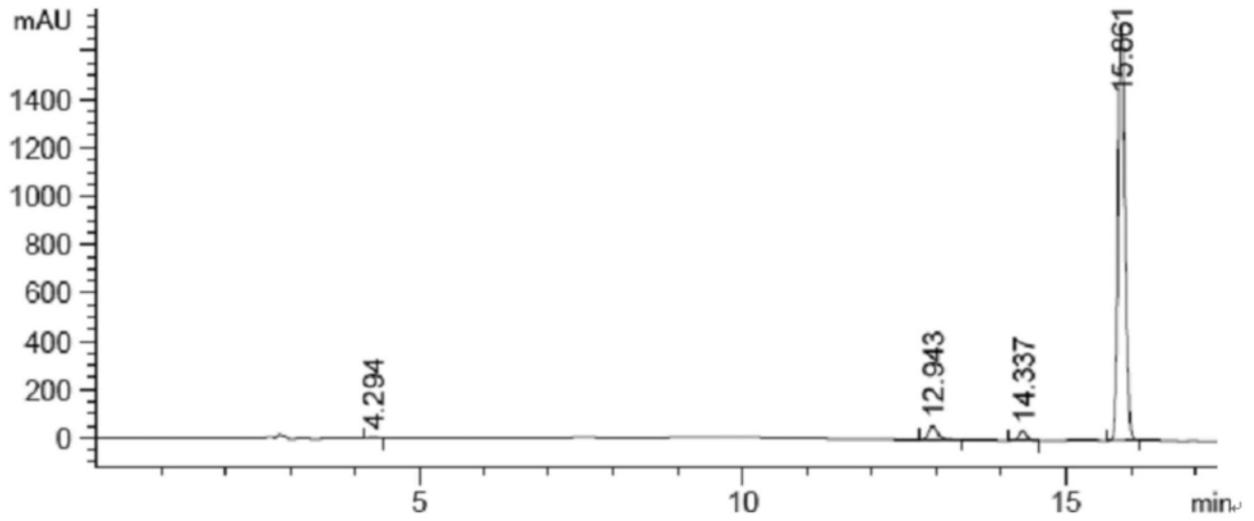


图1

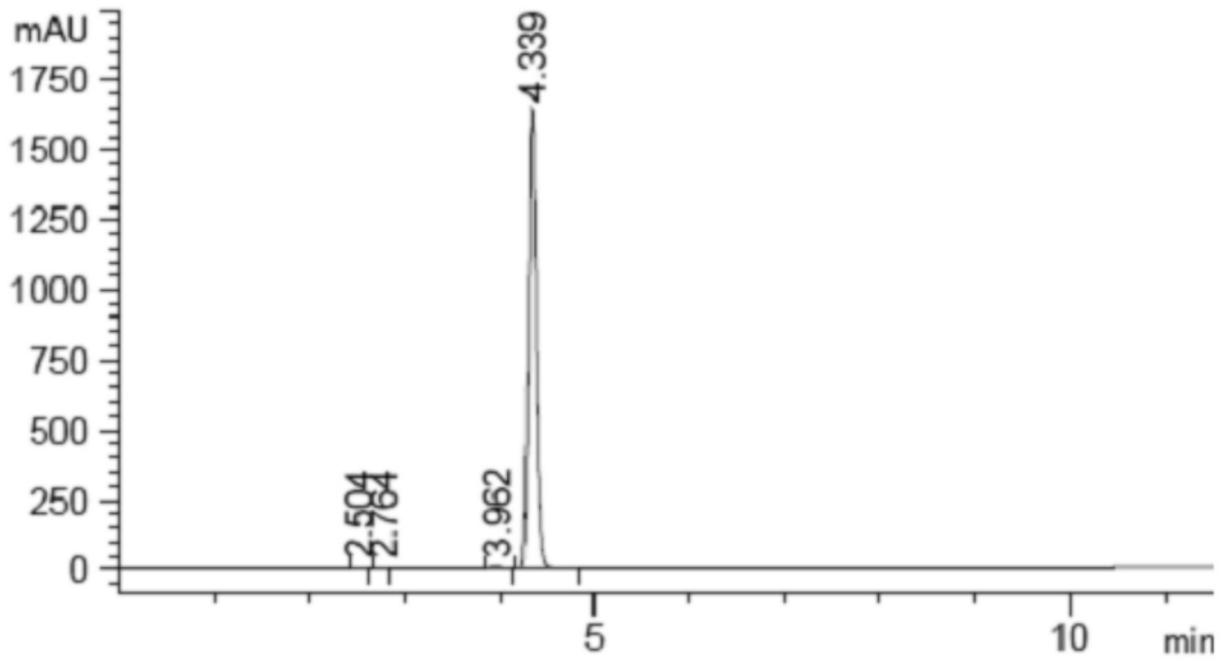


图2