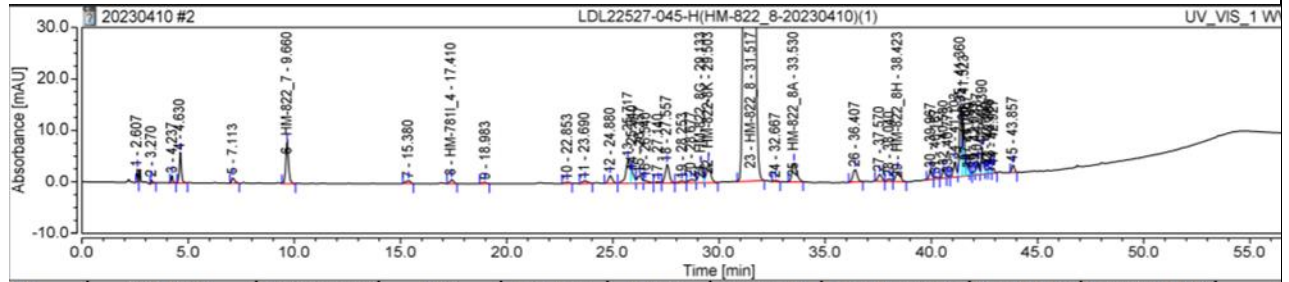


分离纯化报告

样品信息			
样品名称	HM-822	项目编号	20230418-303
样品性状	黄色固体	样品重量	1 g
收样日期	2023/04/21	测试期间	2303/04/21~2023/06/14

目标物信息



No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*s	Rel.Area %	Height mAU	Peak Width min	Tailing factor(USP)	Plates (USP)	Resolution (USP)
1		2.607	6.998	0.034	2.549	0.07	1.2	20532	n.a.
n.a.	DMF	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2		3.270	3.095	0.015	0.727	0.10	1.8	18386	7.8
3		4.237	7.338	0.035	1.453	0.13	1.1	17995	8.7
4		4.630	39.908	0.192	5.955	0.17	1.1	11569	2.6
n.a.	HM-582_10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5		7.113	9.782	0.047	1.112	0.21	1.6	18613	13.0
n.a.	HM-822_104	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6		9.660	73.991	0.357	7.945	0.24	1.2	26152	11.4
n.a.	HM-297Q_8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7		15.380	8.554	0.041	0.534	0.42	0.9	21697	17.4
8		17.410	9.577	0.046	0.798	0.29	1.1	57808	5.7
9		18.983	3.820	0.018	0.252	0.23	0.9	109758	6.1
10		22.853	3.604	0.017	0.212	0.30	1.0	95613	14.7
11		23.690	8.532	0.041	0.512	0.35	1.1	72460	2.6
12		24.880	21.035	0.101	1.554	0.39	1.2	63557	3.2
13		25.717	67.277	0.324	4.535	0.42	n.a.	61079	2.1
14		25.940	20.578	0.099	2.027	0.11	n.a.	873778	0.8
15		26.257	21.288	0.103	1.588	0.39	n.a.	73789	1.3
16		26.540	8.070	0.039	0.521	0.56	n.a.	36115	0.6
17		27.140	3.560	0.017	0.261	0.37	n.a.	87336	1.3
18		27.557	47.947	0.231	3.647	0.34	1.0	105075	1.2
19		28.253	6.438	0.031	0.337	0.39	n.a.	82209	1.9
20		28.677	12.565	0.061	0.625	0.74	n.a.	23979	0.7
21		29.133	45.943	0.222	3.425	0.35	n.a.	110436	0.8
22	HM-822_8G	29.503	51.763	0.250	3.742	0.35	n.a.	111516	1.1
23	HM-822_8K	31.517	19752.391	95.239	1217.315	0.44	0.8	83288	5.1
n.a.	HM-822_8E	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
24		32.667	3.045	0.015	0.290	0.24	1.1	304306	3.4
25		33.530	55.337	0.267	3.674	0.37	1.3	128810	2.8
26		36.407	34.066	0.164	2.503	0.36	1.0	165556	7.9
27		37.570	16.278	0.078	1.329	0.35	1.0	186821	3.3
28		38.040	6.303	0.030	0.495	0.33	n.a.	218102	1.4
29		38.423	30.687	0.148	2.031	0.40	n.a.	151168	1.1
30	HM-822_8H	39.967	15.196	0.073	1.766	0.21	n.a.	554861	5.1
31		40.187	5.020	0.024	0.471	0.23	n.a.	468286	1.0
32		40.580	16.007	0.077	1.917	0.21	n.a.	580901	1.8
33		40.773	3.171	0.015	0.532	0.17	n.a.	939565	1.0
34		41.103	27.759	0.134	3.022	0.22	n.a.	566267	1.7
35		41.360	114.407	0.552	13.952	0.21	n.a.	629126	1.2
36		41.523	58.763	0.283	10.367	0.17	n.a.	1007036	0.9
37		41.667	18.643	0.090	2.385	0.48	n.a.	121156	0.4
38		41.790	5.435	0.026	0.928	0.14	n.a.	1380398	0.4
39		42.027	5.666	0.027	0.952	0.28	n.a.	353185	1.1
40		42.187	21.038	0.101	2.728	0.18	n.a.	838742	0.7
41		42.390	33.392	0.161	5.213	0.15	n.a.	1308733	1.2
42		42.600	6.448	0.031	0.927	0.48	n.a.	125787	0.7
43		42.760	10.300	0.050	1.302	0.24	n.a.	527426	0.4

图 1 客户图谱

目标物保留时间	31.517 min	面积归一化含量 (220 nm, %)	95.239%
---------	------------	---------------------	---------

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园.紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969



实验要求		
筛选正相硅胶填料，流动相为甲醇和二氯甲烷，要求单杂<0.1%，其中 HM-822-8A 杂质<0.5%		
试剂信息		
试剂名称	级别	供应商
乙腈	色谱级	月旭
磷酸	分析级	沪试
二氯甲烷	制备级	DAMAS-BETA
甲醇	制备级	沪试
二氯甲烷	色谱级	月旭
甲醇	色谱级	月旭
磷酸二氢钾	分析级	阿拉丁
仪器信息		
仪器名称	仪器型号	仪器厂家
分析型高效液相色谱仪	Waters 2695	沃特世
分析型高效液相色谱仪	Agilent 1260	安捷伦
分析型高效液相色谱仪	Agilent 1000	安捷伦
分析型高效液相色谱仪	Thermo U3000	赛默飞
制备型高效液相色谱仪	Sail 1000-50ml	月旭

## 1. 试验过程

### 1.1. 方法重现

流动相配置：精密量取 1000 mL 超纯水，加入 500 $\mu$ L 甲酸，混匀即得；

空白溶剂配置：称取磷酸二氢钾 0.27 g，加入 100 mL 超纯水，用磷酸调节 pH 至 3.5，过滤，量取 20 mM 磷酸二氢钾 60 mL，加入色谱级乙腈 40 mL，混匀，超声；

样品配置：称取 10 mg 样品，加入上述空白溶剂 10 mL，超声混匀，过滤即得；

吸取适量样品溶液过滤至进样小瓶中，按照以下色谱分析方法进行分析：

色谱柱	Ultimate XB-Phenyl (4.6 $\times$ 250 mm,5 $\mu$ m)
流动相 A	0.05%磷酸水
流动相 B	色谱级乙腈
流速	1 mL/min

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园.紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969

第 2 页 共 8 页

邮编：201600

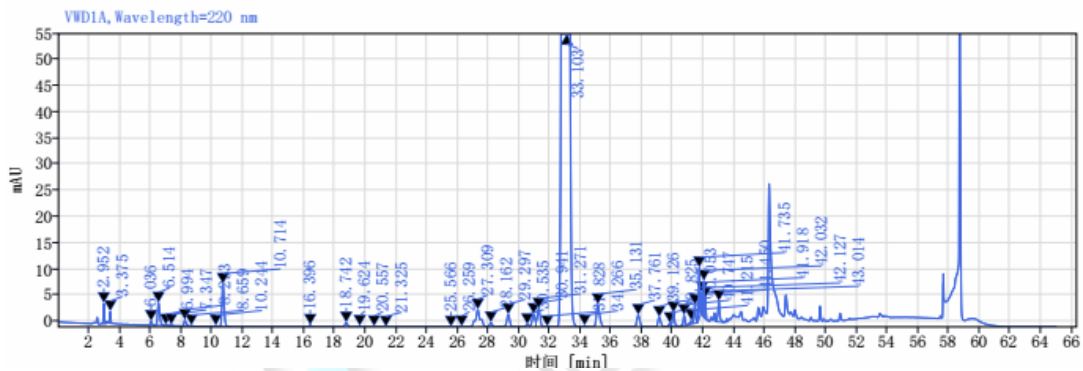
邮编：321000

邮编：211500



进样量	7 $\mu$ L		
柱温	40 $^{\circ}$ C		
检测波长	220 nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	75	25
	35	57.5	42.5
	50	0	100
	55	0	100
	55.1	75	25
	65	75	25

分析图谱如图 2 所示:



保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	峰高	峰面积%
29.297	BB	1.02	35.37	2.43	0.17
30.535	MM m	0.42	9.14	0.62	0.04
30.941	VV	0.40	36.14	2.60	0.17
31.271	VB	0.52	49.85	3.57	0.24
31.828	MM m	0.50	2.44	0.17	0.01
33.103	BB	1.48	20335.67	1236.54	96.24
34.266	MM m	0.43	3.28	0.28	0.02
35.131	BB	0.98	69.83	4.44	0.33
37.761	BB	0.86	35.07	2.38	0.17
39.126	BM m	0.71	28.78	2.02	0.14
39.825	MM m	0.37	7.24	0.68	0.03
40.053	VB	0.53	26.30	2.68	0.12
40.747	BM m	0.48	15.79	1.97	0.07
41.215	MM m	0.36	5.90	0.68	0.03
41.450	MB m	0.31	25.75	3.50	0.12
41.735	BB	0.21	50.19	9.65	0.24
41.918	BV	0.13	20.42	4.33	0.10
42.032	VV	0.13	36.73	6.92	0.17
42.127	VB	0.14	17.75	3.93	0.08
43.014	BB	0.45	30.77	3.94	0.15
<b>总和</b>			<b>21130.35</b>		

图 2 方法重现图谱

声明: 除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

Add: 上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾 (中山) 科技园·紫荆园 10 号楼

Add: 浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add: 江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel: 400-810-6969



结论：通过与图 1 进行比较，可以确定保留时间 33.103 min 处色谱峰为目标物，保留时间 35.131 min 处色谱峰为 HM-822-8A 杂质。

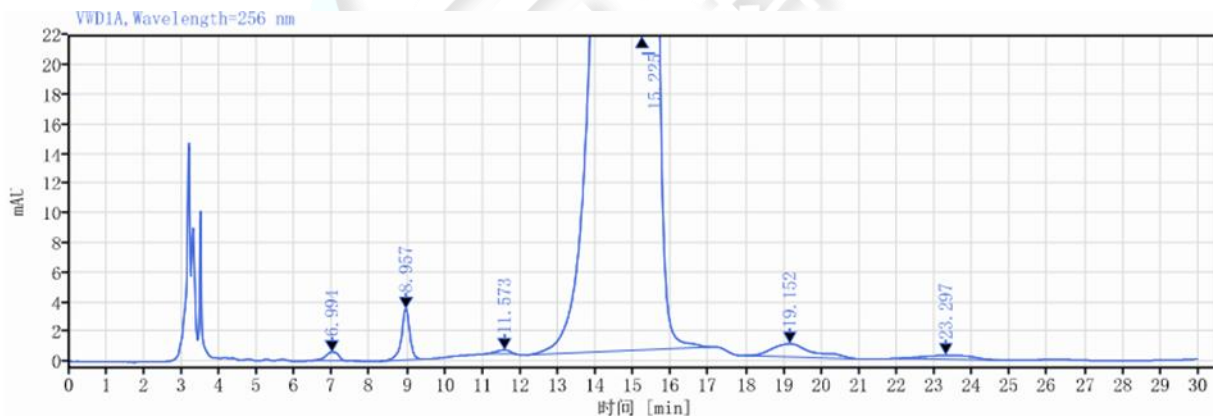
## 1.2. 分离纯化过程

### 1.2.1. 方法开发

样品配置：称取 10 mg 样品，加入 7 mL 二氯甲烷和 3 mL 甲醇，超声混匀，过滤即得：

仪器	Agilent 1100		
色谱柱	Ultimate SiO2 (4.6×250 mm, 5 μm)		
流动相 A	色谱级二氯甲烷		
流动相 B	色谱级甲醇		
流速	1 mL/min		
进样量	10 μL		
柱温	/		
检测波长	220 nm		
洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0-30	92	8

分析图谱如图 3 所示：



信号： VWD1A, Wavelength=256 nm

保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	高度	峰面积%	名称
6.994	MM m	0.32	13.67	0.56	0.09	
8.957	BB	1.18	53.77	3.47	0.34	
11.573	MM m	0.30	6.45	0.26	0.04	
15.225	BB	4.88	15613.60	226.45	98.96	
19.152	MM m	0.89	67.07	0.89	0.43	
23.297	MM m	1.03	22.66	0.26	0.14	
		总和	15777.21			

图 3 方法开发图谱



结论：根据与图 2 比对，15.225 min 处为目标物。

### 1.2.2. 样品制备

样品配置：准确量取 92 mL 二氯甲烷，再量取 8 mL 甲醇，混匀，得正相稀释剂；称量 150 mg 粗品，加入 5 mL 正相稀释剂，配置成 30 mg/mL 的粗品溶液；

仪器	Sail 1000		
色谱柱	Ultimate SiO <sub>2</sub> (21.2×250 mm, 10 μm)		
流动相 A	色谱级二氯甲烷		
流动相 B	色谱级甲醇		
流速	20 mL/min		
进样量	3 mL		
柱温	室温		
检测波长	256 nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0-30	92	8

制备图谱如图 4 所示：

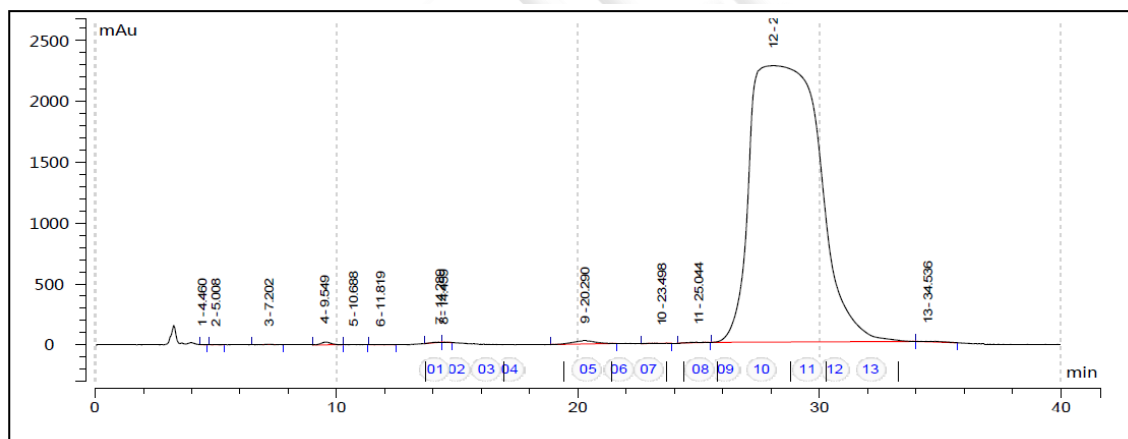


图 4 制备图图谱

经过制备，收集到目标馏分，将馏分 10、11 合并后，氮吹至干，进行分析。

### 1.2.3. 杂质分析

将 1.2.2 中得到的目标物馏分进行液相色谱分析，分析条件同“步骤 1.2.1”一致，分析图谱如图：





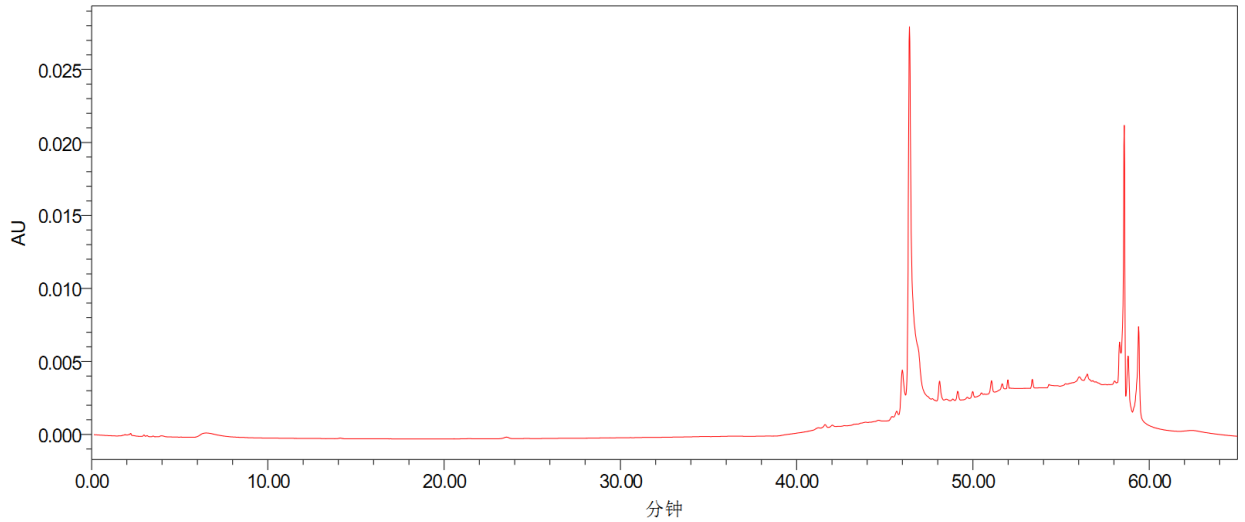
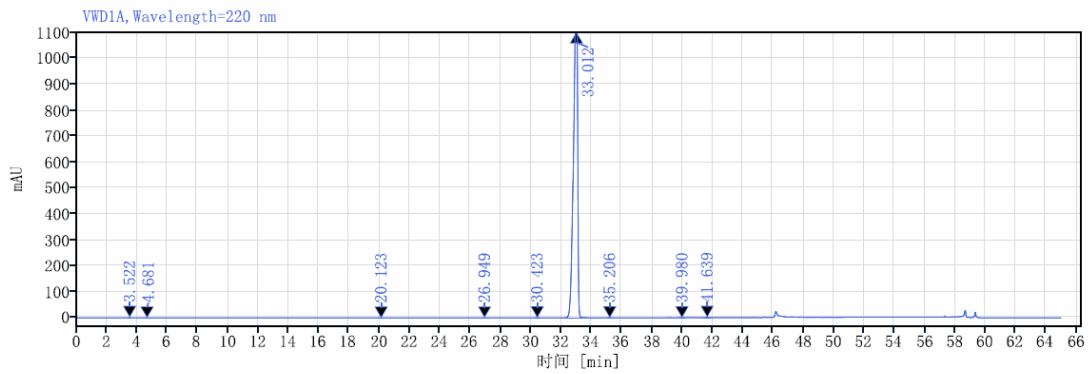


图 5 空白进样分析图谱



信号: VWD1A, Wavelength=220 nm

保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	峰高	峰面积%	名称
3.522	MM m	0.17	14.32	2.80	0.06	
4.681	MM m	0.28	4.85	0.76	0.02	
20.123	MM m	0.47	5.87	0.44	0.02	
26.949	MM m	0.37	4.50	0.39	0.02	
30.423	MM m	0.58	11.80	0.78	0.05	
33.012	BB	2.58	23927.37	1325.60	99.72	
35.206	MM m	0.38	4.34	0.38	0.02	
39.980	MM m	0.33	5.90	0.61	0.02	
41.639	BB	0.44	15.02	1.75	0.06	
总和			23993.96			

图 6 馏分液分析图谱

结论：扣除空白波动，制备液面积归一化含量为 99.72%，符合客户要求。

#### 1.2.4. 增加上样量

制备上样量增加到 400 mg，方法同 1.2.2 制备图谱如图 7 所示：



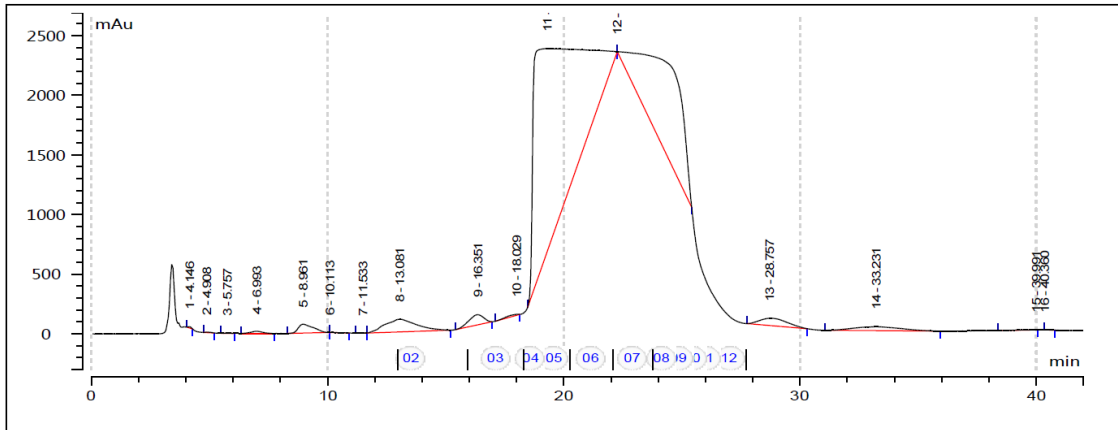
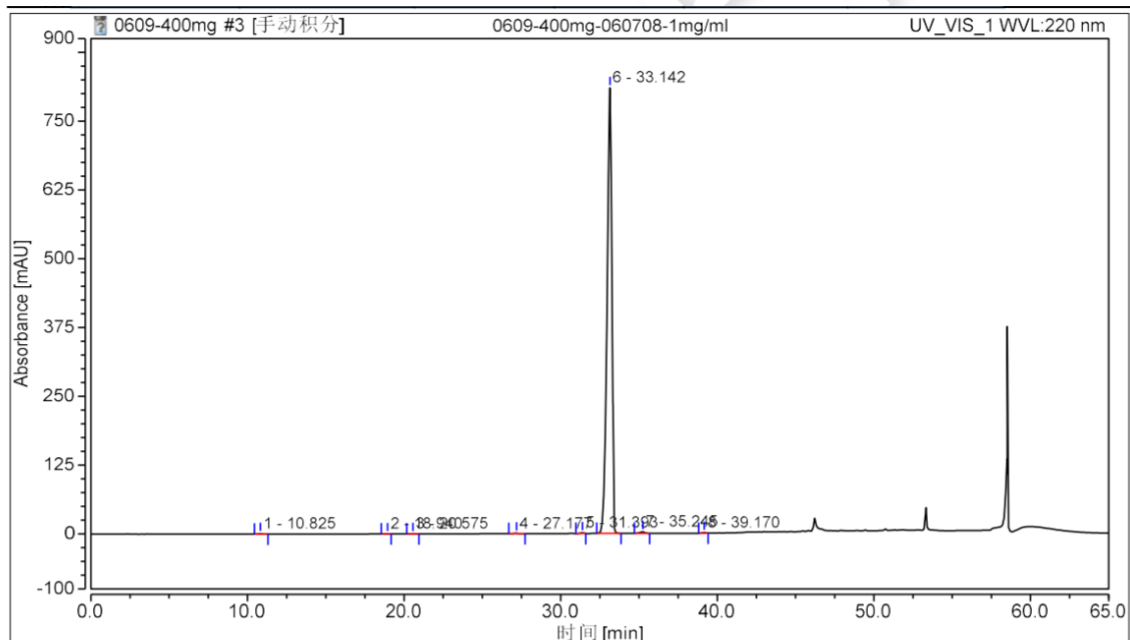


图 7 400 mg 粗品制备图谱

经过制备，收集到目标馏分，将馏分 05、06、07、08 合并，氮吹至干后进行分析，分析图谱如图 8 所示



序号	峰名称	保留时间 min	峰面积 mAU*min	相对峰面积 %	塔板数 (EP)	分离度 (EP)	不对称度 (EP)
1		10.825	0.192	0.06	18506	21.85	0.91
2		18.940	0.057	0.02	31557	3.20	0.79
3		20.575	0.127	0.04	18989	12.53	0.93
4		27.177	0.264	0.09	55957	9.27	0.85
5		31.393	0.272	0.09	76816	3.36	0.81
6		33.142	294.629	99.26	50418	3.77	0.79
7		35.245	0.968	0.33	71549	8.37	0.91
8		39.170	0.306	0.10	143878	n.a.	0.85
<b>总和:</b>			<b>296.815</b>	<b>100.000</b>	<b>467670.00</b>	<b>62.35</b>	

图 6 400mg 制备后馏分液分析图谱

结论：扣除空白波动，制备液面积归一化含量为 99.72%，符合客户要求；合并馏分，称重约为 305 mg，回收率约为 80%。



## 2. 结论

使用月旭 Ultimate® SiO<sub>2</sub> (21.2\*250 mm, 5 μm) 在此色谱条件下, 目标物纯度高于 99%, 单杂均小于 0.1%, 其中 HM-822-8A 小于 0.5%, 满足客户要求; 当上样量为 400 mg 时, 回收率约为 80%, 与客户要求稍有偏差。

报告人: Dido

审核人: Jim

日期: 2023/06/15

