

分离纯化报告

样品信息																																																																		
样品名称	二磷酸酯	项目编号	20231012-962-2																																																															
样品性状	黄色液体	样品重量	/																																																															
收样日期	2023/10/17	测试期间	2023/10/18-2023/12.06																																																															
目标物信息																																																																		
																																																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>峰号</th> <th>化合物名</th> <th>保留时间</th> <th>面积%</th> <th>面积</th> <th>高度</th> <th>分离度 (USP)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td>3.438</td> <td>0.165</td> <td>22249</td> <td>3030</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>三酯</td> <td>4.080</td> <td>2.251</td> <td>303333</td> <td>26382</td> <td>2.740</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td>4.660</td> <td>0.708</td> <td>95401</td> <td>5543</td> <td>1.733</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>四水合辅酶酶</td> <td>7.475</td> <td>85.139</td> <td>11473327</td> <td>430240</td> <td>5.100</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>一酯</td> <td>11.432</td> <td>10.845</td> <td>1461517</td> <td>87061</td> <td>6.973</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>VB1</td> <td>19.678</td> <td>0.250</td> <td>33623</td> <td>1623</td> <td>17.349</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td></td> <td>23.089</td> <td>0.642</td> <td>86475</td> <td>4738</td> <td>6.809</td> </tr> <tr> <td>总计</td> <td></td> <td></td> <td>100.000</td> <td>13475825</td> <td>558617</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				峰号	化合物名	保留时间	面积%	面积	高度	分离度 (USP)	1		3.438	0.165	22249	3030	—	2	三酯	4.080	2.251	303333	26382	2.740	3		4.660	0.708	95401	5543	1.733	4	四水合辅酶酶	7.475	85.139	11473327	430240	5.100	5	一酯	11.432	10.845	1461517	87061	6.973	6	VB1	19.678	0.250	33623	1623	17.349	7		23.089	0.642	86475	4738	6.809	总计			100.000	13475825	558617	
峰号	化合物名	保留时间	面积%	面积	高度	分离度 (USP)																																																												
1		3.438	0.165	22249	3030	—																																																												
2	三酯	4.080	2.251	303333	26382	2.740																																																												
3		4.660	0.708	95401	5543	1.733																																																												
4	四水合辅酶酶	7.475	85.139	11473327	430240	5.100																																																												
5	一酯	11.432	10.845	1461517	87061	6.973																																																												
6	VB1	19.678	0.250	33623	1623	17.349																																																												
7		23.089	0.642	86475	4738	6.809																																																												
总计			100.000	13475825	558617																																																													
目标物保留时间	7.4min	面积归一化含量 (232nm, %)	85%																																																															
实验要求																																																																		
用制备液相纯化目标化合物，一酯含量<0.4%，其他单杂<0.1%，总杂<1.0%																																																																		
试剂信息																																																																		
试剂名称		级别	供应商																																																															
磷酸二氢钠		AR	阿拉丁																																																															
乙酸		AR	阿拉丁																																																															
氢氧化钠		AR	麦克林																																																															
乙腈		色谱级	月旭																																																															
三乙胺		AR	麦克林																																																															
仪器信息																																																																		
仪器名称		仪器型号	仪器厂家																																																															
分析液相		LC-20AD	岛津																																																															
制备液相		Sail1000	月旭																																																															

图 1 粗品分析图



1. 试验过程

1.1. 方法重现

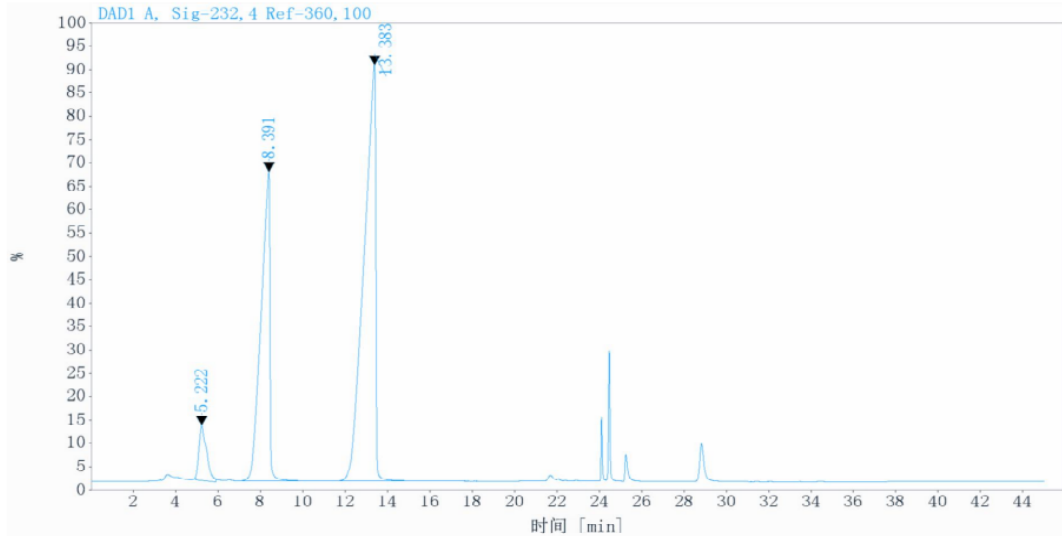
流动相配置：A：0.02M 磷酸二氢钠（pH=5.0） B：乙腈

样品配置：移取 0.5ml 样品，加水稀释至 1ml，再从中移取 100ul，加水稀释至 1ml 即得粗品溶液，称取四水羧辅酶 10mg,加 5ml 水溶解，即得四水羧辅酶单标，按照以下色谱分析方法进行分析：

色谱柱	Ultimate HS-AQ 4.6×250mm, 5μm		
流动相 A	0.02M 磷酸二氢钠（pH=5.0）		
流动相 B	乙腈		
流速	1ml/min		
进样量	10μl		
柱温	30℃		
检测波长	232nm		
梯度洗脱程序	时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
	0	99.7	0.3
	15	97	3
	30	90	10
	35	99.7	0.3
	45	99.7	0.3

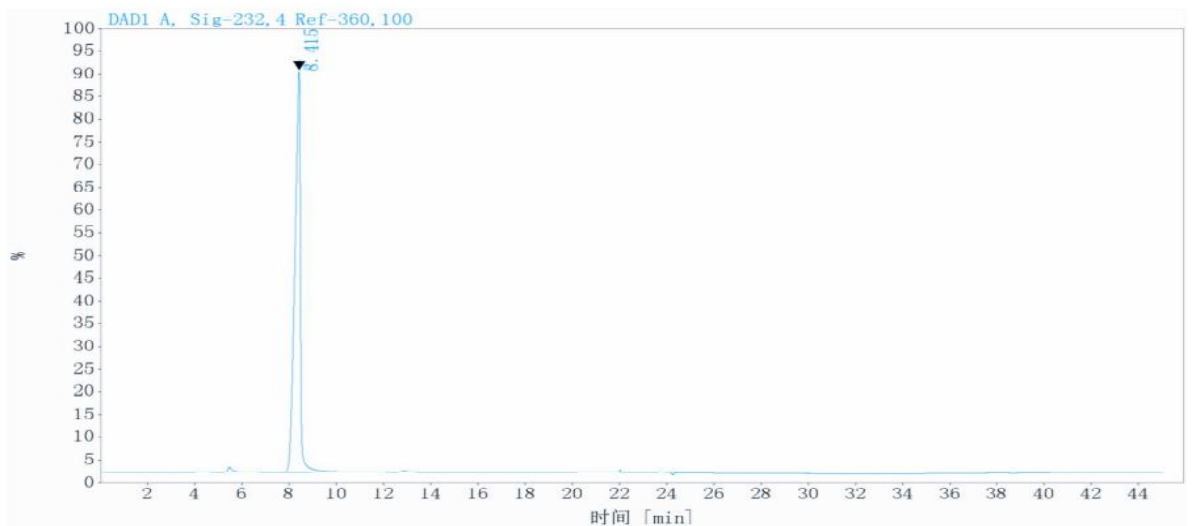
分析图谱如图 2 所示：





名称	保留时间	峰面积	峰面积百分比	峰分离度_USP	峰理论塔板_USP	
	5.22	1295.5414	5.26		1197.42	1.50
	8.39	8404.4736	34.09	4.43	1648.15	0.58
	13.38	14951.0215	60.65	5.13	2289.36	0.56
平均值	8.999	8217.0122				
标准偏	4.114	6829.6699				
RSD	45.723	83.1162				

图2 方法重现图谱



名称	保留时间	峰面积	峰面积百分比	峰分离度_USP	峰理论塔板_USP	
	8.41	2340.9026	100.00		5480.67	0.67
平均值	8.415	2340.9026				
标准偏						
RSD	0.000	0.0000				

图3 四水合辅羧酶（硫胺素二磷酸酯）图谱

结论：通过与图3 进行比较，可以确定 8.39min 为目标物。

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



1.2. 分离纯化过程

1.2.1. 方法开发

2mol/l TEAA：量取 56.1ml 三乙胺和 20ml 乙腈置于 500ml 烧杯中，然后用纯水定容到 200ml，再用冰醋酸调节 pH=8.0，即得

A:用上述 TEAA 溶液与水按照（5:95）的比例混匀，用冰醋酸调节 pH=6.0，配置得到流动相 A

取 4.1 项下的进样小瓶进行分析：

色谱柱	Ultimate HS-AQ 4.6×250mm, 10μm		
流动相 A	2mol/l TEAA 溶液与水按照（5:95）的比例，并用冰醋酸调节 pH=6.0		
流动相 B	/		
流速	1ml/min		
进样量	10μl		
柱温	30℃		
检测波长	232nm		
梯度洗脱程序	时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
	0	100	0
	60	100	0

分析图谱如下图 4 所示：

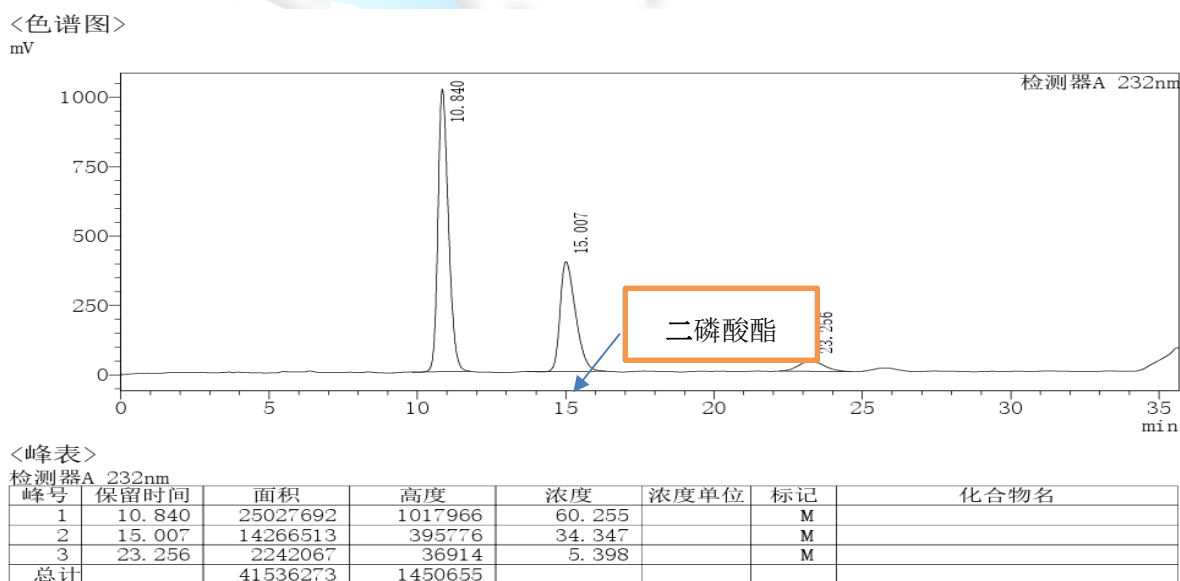


图 4 方法开发分析图谱

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

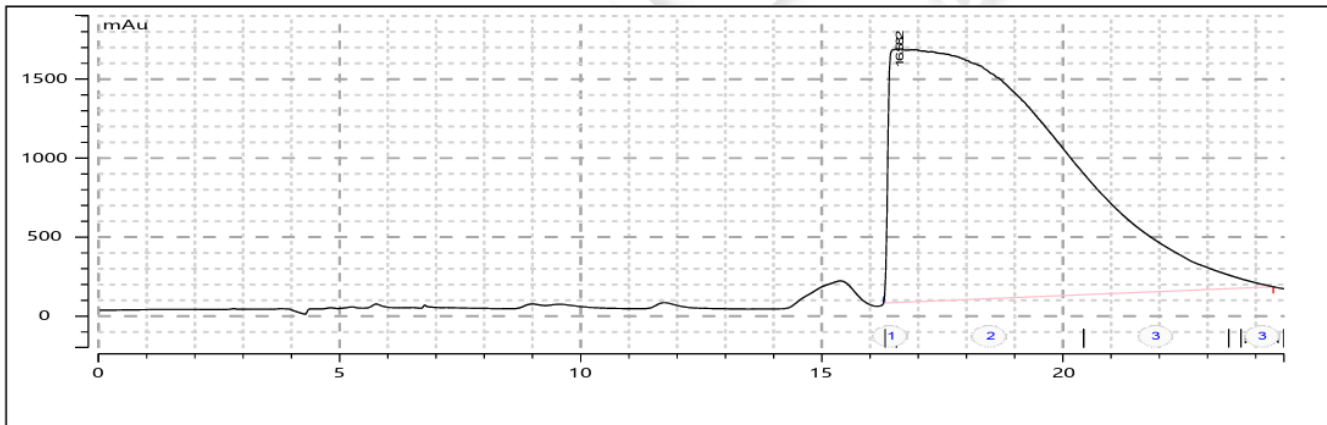


1.2.2. 样品制备

取 1.5ml(新样品纯度为 90%)旋蒸液，制备液相条件如下所示：

色谱柱	Ultimate HS-AQ 21.2×250mm, 10µm		
流动相 A	TEAA 溶液与水按照 (5:95) 的比例，并用醋酸调节 pH=6.0		
流动相 B	/		
流速	20ml/min		
进样量	1.5ml		
柱温	室温		
检测波长	232nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	100	0
	30	100	0

制备图谱如图 5 所示：



峰列表

AQ-C18-TEAA-1.5ML(90%)-113004-(UV-ch1-232)

No	名称	保留时间 (min)	峰面积 (mAu*s)	峰宽 (min)	半峰宽 (min)	峰高 (mAu)	面积百分比 (%)	峰类型	峰纯度	PDA 匹配名称
1	N.A.	16.582	395852.121	4.959	3.969	1606.357	100.000	BB*	0	
2	总计									

图 5 粗品制备图

经过制备，将目标馏分收集到馏分收集瓶中。

1.2.3. 杂质分析

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

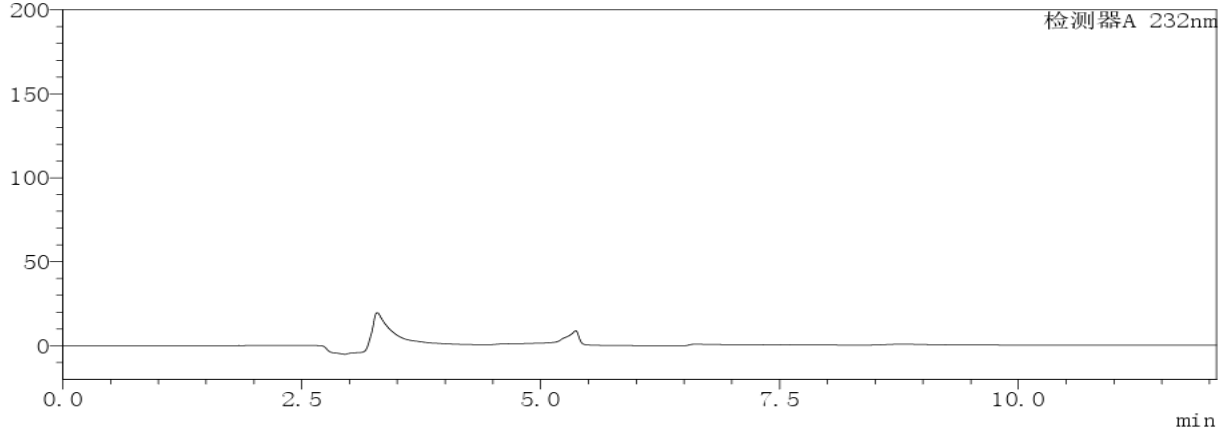
Tel:400-810-6969



将 1.2.2 中馏分 1，馏分 2 合并后从中取 1ml 至进样小瓶，另取一份制备流动相作为空白，进行液相色谱分析，具体分析条件同“步骤 1.1”一致。分析图谱如图 6，图 7 所示：

<色谱图>

mV



<峰表>

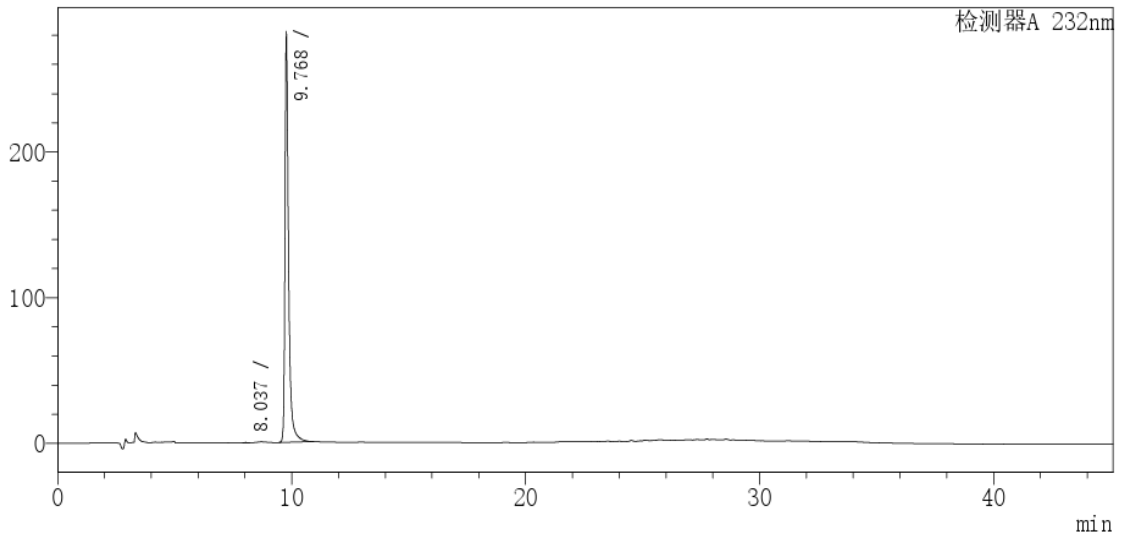
检测器A 232nm

峰号	保留时间	面积	高度	浓度	浓度单位	标记	化合物名
总计							

图 6 空白分析图

<色谱图>

mV



<峰表>

检测器A 232nm

峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	理论塔板数(USP)	拖尾因子	分离度(USP)
1		8.037	650	0.022	32649	0.915	--
2		9.768	3012554	99.978	21871	1.611	7.831
总计			3013204	100.000			

图 7 制备液分析图谱



结论：由图可见制备液面积归一化含量为 99.2%（232nm），其他杂质纯度小于 0.1%，符合客户要求。

2. 结论

使用月旭 Ultimate HS-AQ，21.2×250mm,10μm 在此色谱条件下进行制备，单针上样量为 1.5ml (90%纯度旋蒸液)时，制备收集到的目标物纯度为 99.2%（232nm），其他杂质纯度小于 0.1%，制备结果满足客户要求。

报告人:Ada

审核人: Jim

日期: 2023/12/8



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 7 页 共 7 页

邮编：201600

邮编：321000

邮编：211500

